**Académie d'Orléans –Tours**
**Université François-Rabelais**
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**Année 2015-2016** **N°**

**Thèse**
**pour le**
**DOCTORAT EN MEDECINE**
**Diplôme d'Etat**
**Par**

***STACOFFE Marion***
***née le 04/05/1987 à Tours (37)***

**Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2016**

# Etude de l'hétérogénéité des cancers du sein triple négatif et de l'impact de l'infiltration tumorale par les lymphocytes (TILs), des lymphocytes T CD4+, CD8+, des lymphocytes T régulateurs et des macrophages sur le pronostic de 105 patientes traitées en situation adjuvante au CHU de Tours

**Jury**

**Président de Jury :** **Monsieur le Professeur Claude Linassier**
**Membres du jury :** **Monsieur le Professeur Gilles Body**
**Madame le Professeur Isabelle Barillot**
**Madame le Professeur Gaëlle Fromont-Hankard**
**Madame le Docteur Flavie Arbion**
**Madame le Docteur Hélène Vegas**

**Académie d'Orléans –Tours**
**Université François-Rabelais**
**FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

**Année 2015-2016** **N°**

**Thèse**
**pour le**
**DOCTORAT EN MEDECINE**
**Diplôme d'Etat**
**Par**

***STACOFFE Marion***
***née le 04/05/1987 à Tours (37)***

**Présentée et soutenue publiquement le 23 septembre 2016**

# Etude de l'hétérogénéité des cancers du sein triple négatif et de l'impact de l'infiltration tumorale par les lymphocytes (TILs), des lymphocytes T CD4+, CD8+, des lymphocytes T régulateurs et des macrophages sur le pronostic de 105 patientes traitées en situation adjuvante au CHU de Tours

**Jury**

**Président de Jury :** **Monsieur le Professeur Claude Linassier**
**Membres du jury :** **Monsieur le Professeur Gilles Body**
**Madame le Professeur Isabelle Barillot**
**Madame le Professeur Gaëlle Fromont-Hankard**
**Madame le Docteur Flavie Arbion**
**Madame le Docteur Hélène Vegas**

FACULTÉ DE MÉDECINE
TOURS

**UNIVERSITE FRANCOIS RABELAIS FACULTE DE MEDECINE DE TOURS**

## DOYEN

**Professeur Patrice DIOT**

## VICE-DOYEN

Professeur Henri MARRET

### ASSESSEURS

Professeur Denis ANGOULVANT, *Pédagogie*
Professeur Mathias BUCHLER, *Relations internationales*
Professeur Hubert LARDY, *Moyens – relations avec l'Université*
Professeur Anne-Marie LEHR-DRYLEWICZ, *Médecine générale*
Professeur François MAILLOT, *Formation Médicale Continue*
Professeur Philippe ROINGEARD, *Recherche*

### SECRETAIRE GENERALE

Madame Fanny BOBLETER

********

## DOYENS HONORAIRES

Professeur Emile ARON (†) – *1962-1966*
Directeur de l'Ecole de Médecine - 1947-1962
Professeur Georges DESBUQUOIS (†)- *1966-1972*
Professeur André GOUAZÉ - *1972-1994*
Professeur Jean-Claude ROLLAND – *1994-2004*
Professeur Dominique PERROTIN – *2004-2014*

## PROFESSEURS EMERITES

Professeur Alain AUTRET
Professeur Catherine BARTHELEMY
Professeur Jean-Claude BESNARD
Professeur Philippe BOUGNOUX
Professeur Patrick CHOUTET
Professeur Etienne DANQUECHIN-DORVAL
Professeur Guy GINIES
Professeur Olivier LE FLOCH
Professeur Etienne LEMARIE
Professeur Chantal MAURAGE
Professeur Léandre POURCELOT
Professeur Michel ROBERT
Professeur Jean-Claude ROLLAND

### PROFESSEURS HONORAIRES

P. ANTHONIOZ – A. AUDURIER – P. BAGROS – G. BALLON – P.BARDOS – J.L. BAULIEU – C. BERGER – P. BEUTTER – C. BINET – P. BONNET – M. BROCHIER – P. BURDIN – L. CASTELLANI – B. CHARBONNIER – J.P. FAUCHIER – F. FETISSOF – B. GRENIER – A. GOUAZE – M. JAN – J.P. LAMAGNERE – F. LAMISSE – J. LANSAC – Y. LANSON – J. LAUGIER – P. LECOMTE – G. LELORD – G. LEROY – Y. LHUINTRE – M. MARCHAND – C. MERCIER – J. MOLINE – C. MORAINE – J.P. MUH – J. MURAT – H. NIVET – P. RAYNAUD – A. ROBIER – A. SAINDELLE – J.J. SANTINI – D. SAUVAGE – J. THOUVENOT – B. TOUMIEUX – J. WEILL

## PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|---|---|---|
| MM. | ALISON Daniel | Radiologie et imagerie médicale |
| | ANDRES Christian | Biochimie et biologie moléculaire |
| | ANGOULVANT Denis | Cardiologie |
| | ARBEILLE Philippe | Biophysique et médecine nucléaire |
| | AUPART Michel | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | BABUTY Dominique | Cardiologie |
| | BALLON Nicolas | Psychiatrie ; addictologie |
| Mme | BARILLOT Isabelle | Cancérologie ; radiothérapie |
| MM. | BARON Christophe | Immunologie |
| | BERNARD Louis | Maladies infectieuses et maladies tropicales |
| | BODY Gilles | Gynécologie et obstétrique |
| | BONNARD Christian | Chirurgie infantile |
| Mme | BONNET-BRILHAULT Frédérique | Physiologie |
| MM. | BRILHAULT Jean | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | BRUNEREAU Laurent | Radiologie et imagerie médicale |
| | BRUYERE Franck | Urologie |
| | BUCHLER Matthias | Néphrologie |
| | CALAIS Gilles | Cancérologie, radiothérapie |
| | CAMUS Vincent | Psychiatrie d'adultes |
| | CHANDENIER Jacques | Parasitologie, mycologie |
| | CHANTEPIE Alain | Pédiatrie |
| | COLOMBAT Philippe | Hématologie, transfusion |
| | CONSTANS Thierry | Médecine interne, gériatrie |
| | CORCIA Philippe | Neurologie |
| | COSNAY Pierre | Cardiologie |
| | COTTIER Jean-Philippe | Radiologie et imagerie médicale |
| | COUET Charles | Nutrition |
| | DE LA LANDE DE CALAN Loïc | Chirurgie digestive |
| | DE TOFFOL Bertrand | Neurologie |
| | DEQUIN Pierre-François | Thérapeutique |
| | DESTRIEUX Christophe | Anatomie |
| | DIOT Patrice | Pneumologie |
| | DU BOUEXIC de PINIEUX Gonzague | Anatomie & cytologie pathologiques |
| | DUCLUZEAU Pierre-Henri | Médecine interne, nutrition |
| | DUMONT Pascal | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| | EL HAGE Wissam | Psychiatrie adultes |
| | EHRMANN Stephan | Réanimation d'urgence |
| | FAUCHIER Laurent | Cardiologie |
| | FAVARD Luc | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | FOUQUET Bernard | Médecine physique et de réadaptation |
| | FRANCOIS Patrick | Neurochirurgie |
| | FROMONT-HANKARD Gaëlle | Anatomie & cytologie pathologiques |
| | FUSCIARDI Jacques | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale ; médecine d'urgence |
| | GAILLARD Philippe | Psychiatrie d'adultes |
| | GOGA Dominique | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| | GOUDEAU Alain | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| | GOUPILLE Philippe | Rhumatologie |
| | GRUEL Yves | Hématologie, transfusion |
| | GUERIF Fabrice | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| | GUILMOT Jean-Louis | Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire |
| | GUYETANT Serge | Anatomie et cytologie pathologiques |
| | GYAN Emmanuel | Hématologie, transfusion |
| | HAILLOT Olivier | Urologie |
| | HALIMI Jean-Michel | Thérapeutique |

| | | |
|---|---|---|
| | HANKARD Régis | Pédiatrie |
| | HERAULT Olivier | Hématologie, transfusion |
| | HERBRETEAU Denis | Radiologie et imagerie médicale |
| Mme | HOMMET Caroline | Médecine interne, gériatrie |
| MM. | HUTEN Noël | Chirurgie générale |
| | LABARTHE François | Pédiatrie |
| | LAFFON Marc | Anesthésiologie et réanimation chirurgicale, médecine d'urgence |
| | LARDY Hubert | Chirurgie infantile |
| | LAURE Boris | Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie |
| | LEBRANCHU Yvon | Immunologie |
| | LECOMTE Thierry | Gastroentérologie, hépatologie |
| | LESCANNE Emmanuel | Oto-rhino-laryngologie |
| | LINASSIER Claude | Cancérologie, radiothérapie |
| | LORETTE Gérard | Dermato-vénéréologie |
| | MACHET Laurent | Dermato-vénéréologie |
| | MAILLOT François | Médecine interne, gériatrie |
| | MARCHAND-ADAM Sylvain | Pneumologie |
| | MARRET Henri | Gynécologie-obstétrique |
| Mme | MARUANI Annabel | Dermatologie-vénéréologie |
| MM. | MEREGHETTI Laurent | Bactériologie-virologie ; hygiène hospitalière |
| | MORINIERE Sylvain | Oto-rhino-laryngologie |
| Mme | MOUSSATA Driffa | Gastro-entérologie |
| MM. | MULLEMAN Denis | Rhumatologie |
| | ODENT Thierry | Chirurgie infantile |
| | PAGES Jean-Christophe | Biochimie et biologie moléculaire |
| | PAINTAUD Gilles | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| | PATAT Frédéric | Biophysique et médecine nucléaire |
| | PERROTIN Dominique | Réanimation médical, médecine d'urgence |
| | PERROTIN Franck | Gynécologie-obstétrique |
| | PISELLA Pierre-Jean | Ophtalmologie |
| | QUENTIN Roland | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| | REMERAND Francis | Anesthésiologie et réanimation, médecine d'urgence |
| | ROINGEARD Philippe | Biologie cellulaire |
| | ROSSET Philippe | Chirurgie orthopédique et traumatologique |
| | ROYERE Dominique | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| | RUSCH Emmanuel | Epidémiologie, économie de la santé et prévention |
| | SALAME Ephrem | Chirurgie digestive |
| | SALIBA Elie | Biologie et médecine du développement et de la reproduction |
| Mme | SANTIAGO-RIBEIRO Maria | Biophysique et médecine nucléaire |
| MM. | SIRINELLI Dominique | Radiologie et imagerie médicale |
| | THOMAS-CASTELNAU Pierre | Pédiatrie |
| Mme | TOUTAIN Annick | Génétique |
| MM. | VAILLANT Loïc | Dermato-vénéréologie |
| | VELUT Stéphane | Anatomie |
| | VOURC'H Patrick | Biochimie et biologie moléculaire |
| | WATIER Hervé | Immunologie |

## PROFESSEUR DES UNIVERSITES DE MEDECINE GENERALE

| | |
|---|---|
| M. | LEBEAU Jean-Pierre |
| Mme | LEHR-DRYLEWICZ Anne-Marie |

## PROFESSEURS ASSOCIES

| | | |
|---|---|---|
| MM. | MALLET Donatien | Soins palliatifs |
| | POTIER Alain | Médecine Générale |
| | ROBERT Jean | Médecine Générale |

## MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

| | | |
|---|---|---|
| Mme | ANGOULVANT Théodora | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| M. | BAKHOS David | Physiologie |
| Mme | BERNARD-BRUNET Anne | Cardiologie |
| M. | BERTRAND Philippe | Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication |
| Mme | BLANCHARD Emmanuelle | Biologie cellulaire |
| | BLASCO Hélène | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. | BOISSINOT Éric | Physiologie |
| Mme | CAILLE Agnès | Biostatistiques, informatique médical et technologies de communication |
| M. | DESOUBEAUX Guillaume | Parasitologie et mycologie |
| Mmes | DOMELIER Anne-Sophie | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| | DUFOUR Diane | Biophysique et médecine nucléaire |
| | FOUQUET-BERGEMER Anne-Marie | Anatomie et cytologie pathologiques |
| M. | GATAULT Philippe | Néphrologie |
| Mmes | GAUDY-GRAFFIN Catherine | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| | GOUILLEUX Valérie | Immunologie |
| | GUILLON-GRAMMATICO Leslie | Biostatistiques, Informatique médical et Technologies de Communication |
| MM. | HOARAU Cyrille | Immunologie |
| | HOURIOUX Christophe | Biologie cellulaire |
| Mmes | LARTIGUE Marie-Frédérique | Bactériologie-virologie, hygiène hospitalière |
| | LE GUELLEC Chantal | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |
| | MACHET Marie-Christine | Anatomie et cytologie pathologiques |
| MM. | PIVER Eric | Biochimie et biologie moléculaire |
| | ROUMY Jérôme | Biophysique et médecine nucléaire |
| | PLANTIER Laurent | Physiologie |
| Mme | SAINT-MARTIN Pauline | Médecine légale et droit de la santé |
| MM. | SAMIMI Mahtab | Dermatologie-vénéréologie |
| | TERNANT David | Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique |

## MAITRES DE CONFERENCES

| | | |
|---|---|---|
| Mmes | AGUILLON-HERNANDEZ Nadia | Neurosciences |
| | ESNARD Annick | Biologie cellulaire |
| M. | LEMOINE Maël | Philosophie |
| Mme | MONJAUZE Cécile | Sciences du langage - orthophonie |
| M. | PATIENT Romuald | Biologie cellulaire |
| Mme | RENOUX-JACQUET Cécile | Médecine Générale |

## MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE

M. IVANES Fabrice.....Cardiologie

## CHERCHEURS INSERM - CNRS - INRA

M. BOUAKAZ Ayache.....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
Mmes BRUNEAU Nicole.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
CHALON Sylvie.....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM. CHARBONNEAU Michel.....Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
COURTY Yves.....Chargé de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
GAUDRAY Patrick.....Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
GILOT Philippe.....Chargé de Recherche INRA – UMR INRA 1282
GOUILLEUX Fabrice.....Directeur de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
Mmes GOMOT Marie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
GRANDIN Nathalie.....Chargée de Recherche CNRS – UMR CNRS 7292
HEUZE-VOURCH Nathalie.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
MM. KORKMAZ Brice.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100
LAUMONNIER Frédéric.....Chargé de Recherche INSERM - UMR INSERM 930
LE PAPE Alain.....Directeur de Recherche CNRS – UMR INSERM 1100
Mme MARTINEAU Joëlle.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 930
MM. MAZURIER Frédéric.....Directeur de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
MEUNIER Jean-Christophe.....Chargé de Recherche INSERM – UMR INSERM 966
RAOUL William.....Chargé de Recherche INSERM – UMR CNRS 7292
Mme RIO Pascale.....Chargée de Recherche INSERM – UMR INSERM 1069
M. SI TAHAR Mustapha.....Directeur de Recherche INSERM – UMR INSERM 1100

## CHARGES D'ENSEIGNEMENT

***Pour l'Ecole d'Orthophonie***
Mme DELORE Claire .....Orthophoniste
MM. GOUIN Jean-Marie.....Praticien Hospitalier
MONDON Karl.....Praticien Hospitalier
Mme PERRIER Danièle.....Orthophoniste

***Pour l'Ecole d'Orthoptie***
Mme LALA Emmanuelle.....Praticien Hospitalier
M. MAJZOUB Samuel.....Praticien Hospitalier

# Remerciements :

Monsieur le Professeur Linassier, je vous remercie d'avoir dirigé mon travail, et d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Merci pour votre patience et vos conseils. C'est un honneur que d'avoir travaillé avec vous. J'espère que ce n'est que le début d'une longue collaboration.

Madame le Professeur Barillot, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de faire partie de ce jury. Mon semestre au CORAD m'a permis de mieux comprendre votre spécialité. Je vous en remercie.

Madame le Professeur Fromont, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de faire partie de ce jury. Je vous remercie de m'avoir acceptée dans votre service, de m'avoir fait découvrir votre spécialité qui est essentielle et complémentaire à l'oncologie médicale. J'espère en avoir tiré des enseignements.

Monsieur le Professeur Body, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail et de faire partie de ce jury.

Flavie, je ne sais comment te remercier pour toute ton aide, ton efficacité, tes conseils qui ont permis à ce travail d'aboutir. Merci de faire partie de ce jury. En espérant pouvoir longtemps collaborer avec toi.

Hélène, merci d'avoir accepté d'enfiler pour la première fois ta robe de Docteur. Merci pour tout ce que tu m'as appris et continues de m'apprendre, merci d'avoir été une chef de clinique en or, disponible, consciencieuse et d'avoir fait partie avec Armelle d'un semestre dont on se souviendra ! C'est un honneur pour moi que tu sois dans ce jury, en tant que PH et surtout en tant qu'amie.

Bérengère, comment ne pas te citer dans ces remerciements. Merci pour tout ce que tu m'as enseigné. Ta rapidité et ton efficacité m'impressionneront toujours. Merci pour ton soutien dans les moments de stress. C'est un honneur que de continuer à travailler à tes côtés.

Catherine, notre maman à tous, merci pour ces beaux moments en hôpital de jour, qui me donnent envie d'y retourner dès novembre ! Merci pour ton calme, ta sagesse, toute ton expérience. Merci enfin de supporter mes longs récits de rêves, chaque matin... et je crois que ce n'est pas prêt de s'arrêter !

Morgane, une belle rencontre ! J'ai beaucoup aimé travailler avec toi ces quelques semaines en hôpital de jour..Merci pour ta gentillesse, ta douceur, ta disponibilité...quelle idée de repartir en novembre... Reste ! Tu as encore le temps de changer d'avis...

Ma-By, merci pour ton efficacité, tes conseils, ta fraîcheur. Une chef de clinique dynamique !

Comment ne pas citer mes co-internes, qui m'ont supportée pendant cet internat interminable : Clémentine, Eric, Benjamin, Emeline, Lauriane, Nath, Cyriac, Junien, Benoît, Guillaume, et pour ce dernier semestre l'équipe féminine de choc avec Mathilde, Chloé, et Hélène !!! Merci les filles pour tout votre soutien, et surtout pendant ces moments difficiles... Je n'y serais pas arrivée sans vous.

Mathilde, quelques mots pour toi...tu as été d'un précieux soutien. Je me souviendrai de ce dimanche soir de stress, fait de corrections et de mise en pages. Merci encore infiniment.

Sophie, Catherine, Bribri, Françou, vous êtes une équipe mobile en or. Pour les patients avant tout, mais aussi pour nous ! Merci de toute votre aide au quotidien. Merci pour tout votre soutien dans les moments difficiles, et pour tes « séances », Bribri, qui m'ont fait énormément de bien. Je suis heureuse de continuer à collaborer avec vous tous.

Une pensée pour toute l'équipe de l'USP de Luynes, Mr Mallet, Nolwenn, Valérie : merci de m'avoir fait grandir, merci pour ce semestre qui m'a fait me découvrir, mieux me connaître, et qui me permet, je crois, de mieux prendre soin de mes patients désormais.

Caroline et Damien, merci de m'avoir accueillie et de m'avoir fait découvrir votre spécialité. L'oncologie ne vivrait pas sans vous alors merci !

Roseline, un énorme merci pour ton aide et ta gentillesse pendant ce semestre en anapath plein de découverte !

Jacqueline et Joce, des secrétaires en or, vous m'avez connue dès mes premiers pas en couche culotte sur le pôle. Merci de votre efficacité et de votre gentillesse. C'est avec plaisir que je continuerai de travailler avec vous.

Merci à toute l'équipe des services d'oncologie : l'hospitalisation complète, l'hôpital de semaine, l'hôpital de jour... Vous m'avez vu évoluer, grandir et je suis heureuse de continuer de travailler avec vous.

Une pensée pour le CORAD : Sophie, Amandine, Guillemette, ….: merci pour ce semestre. Merci d'avoir intégré l'oncologue médicale que je suis dans le cercle VIP de la radiothérapie. Je ne pense pas avoir été une pro du contourage, mais j'ai appris à vos côtés et la radiothérapie me paraît moins obscure grâce à vous.

Armelle, par où commencer ? Une co-interne, puis une amie, une co-maman et bientôt une co-chef. Il ne nous a pas fallu longtemps pour nous comprendre, vraiment nous connaître et créer avec Las Vegas « l'onco's team » ! Merci pour ton aide, tes conseils et ta disponibilité qui m'ont permis de venir à bout de cette année et de ces échéances.

Line, Cam, Dup, Toin, Lapin : vous êtes mes amis de plus longue date. Merci d'avoir supporté ces longues études qui ont dû vous paraître interminables. Lorsque j'arrive au bout de ce chemin, je pense à vous, à nos années-lycée, au chemin parcouru.

Alice, ma Théron qui me manque tant aujourd'hui. Merci ma minouckette pour ton amitié, ton soutien, tous tes conseils. Tu sais toujours trouver les mots pour me rassurer, me conseiller, me faire rire. C'est une qualité digne des plus grands amis. Ce ne sont pas des milliers de kilomètres qui vont nous séparer. J'ai tellement hâte que tu rentres et que tu me présentes Philippine.

Papa, Maman, ma Laura, merci pour votre soutien inconditionnel, merci d'être présents à mes côtés tous les jours, de m'avoir tant soutenue. Vous êtes une famille en or. Je vous aime fort.

Antoine, merci d'être qui tu es, merci de ton soutien et du bonheur que tu m'apportes chaque jour. Je t'aime.

Paul, mon crapaud d'amour, merci de me combler de bonheur tous les jours. Je t'aime.

# SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté,
de mes chers condisciples
et selon la tradition d'Hippocrate,
je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur
et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuits à l'indigent,
et n'exigerai jamais un salaire au-dessus de mon travail.

Admis dans l'intérieur des maisons, mes yeux
ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira
les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas
à corrompre les mœurs ni à favoriser le crime.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres,
je rendrai à leurs enfants
l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

Que les hommes m'accordent leur estime
si je suis fidèle à mes promesses.
Que je sois couvert d'opprobre
et méprisé de mes confrères
si j'y manque.

# Table des matières :

Abréviations....12
Résumé : ....13
I. Introduction :....14
1 Epidémiologie : ....14
2 Classification des CSTN : ....14
3 Le micro-environnement tumoral : ....15
II. Patients et méthodes :....16
1 Patients :....16
a Type d'étude : ....16
b Critères d'inclusion et critères d'exclusion : ....16
c Critères cliniques et anatomopathologiques :....17
2 Méthodes : ....17
a Relecture histologique des tumeurs et évaluation des TILS : ....17
b Constitution des blocs de Tissue Microarray (TMA): ....17
c Immunohistochimie : ....17
d Analyse statistique :....18
III. Résultats : ....19
1 Diagramme de consort : ....19
2 Caractéristiques de la cohorte :....19
3 Analyses biologiques :....21
a Classification des CSTN en immunohistochimie : ....21
b TILs : ....22
c Régression linéaire entre les données intra-tumorales et stromales de l'infiltration lymphocytaire :....22
4 Analyses de survie :....24
a Survie sans récidive et survie globale de la cohorte : ....24
b Analyse univariée : ....25
c Analyse multivariée : ....30
IV. Discussion : ....30
V. Conclusion :....32
VI. Références bibliographiques :....32

# Abréviations

**CK5-6** : cytokératine 5-6
**CSTN** : cancer du sein triple négatif
**DPP** : dossier personnalisé partagé
**EGFR** : récepteur à l'*epidermal growth factor*
**FOXp3 :** forkhead box P3
**grade SBR :** grade histopronostique de Scarff-Bloom et Richardson
**HES :** Hématoxyline-Eosine-Safran
**HR :** Hazard Ratio
**iCD4** : infiltrat intra-tumoral en CD4
**iCD8** : infiltrat intra-tumoral en CD8
**iFOXp3 :** infiltrat intra-tumoral en FOXp3
**IC95 :** intervalle de confiance à 95%
**IHC** : immunohistochimie
**M1 :** macrophage M1
**M2 :** macrophage M2
**RA** : récepteur des androgènes
**sCD4** : infiltrat stromal en CD4
**sCD8 :** infiltrat stromal en CD8
**sFOXp3 :** infiltrat stromal en FOXp3
**SG :** survie globale
**SSR :** survie sans récidive
**TILS** : « tumor-infiltrating lymphocytes » = infiltration lymphocytaire du stroma tumoral
**TMA** : *Tissue Micro-Array*

# Résumé :

**Introduction :** Les CSTN représentent 10 à 20% des cancers du sein et ont un pronostic défavorable. L'entité clinique, définie par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de HER2, est constituée d'un groupe hétérogène de tumeurs. Nous avons développé à Tours une classification immunohistochimique des CSTN à partir de la caractérisation moléculaire de cellules épithéliales malignes. Par ailleurs, une valeur pronostique du type d'infiltration leucocytaire du stroma a été suggérée. Nous avons étudié ces deux paramètres sur une cohorte de patientes traitées à visée curative pour CSTN au CHU de Tours.

**Objectifs :** L'objectif primaire était d'évaluer l'impact pronostique en termes de survie sans récidive et survie globale de la classification immunohistochimique des cellules épithéliales malignes. Les objectifs secondaires étaient de caractériser le type d'infiltrat immunologique intra-tumoral et stromal et d'évaluer le retentissement en univarié et multivarié sur la survie sans récidive et la survie globale.

**Patients et méthodes :** Il s'agissait d'une étude rétrospective monocentrique, portant sur 105 cas de CSTN, traités entre 2003 et 2013. L'analyse en immunohistochimie (IHC) sur « *Tissue Micro-Array* » (TMA) de l'expression du récepteur des androgènes (RA), des cytokératines 5 et 6 (CK5-6) et du récepteur à l' *epidermal growth factor* (EGFR) a permis de distinguer 4 sous-types de CSTN : 1/ groupe RA positif ; 2/ groupe « *basal-like »* ; 3/ groupe « phénotype triple négatif » ; 4 /groupe « mixte ». L'infiltration lymphocytaire totale a été quantifiée pour chaque tumeur sur lame HES (Hématoxyline-Eosine-Safran). L'analyse en IHC sur *TMA* a ensuite permis de quantifier les cellules exprimant CD4, CD8, FOXp3 (spécifique des lymphocytes T régulateurs) et CD163 (spécifique des macrophages M2). Ces données ont été corrélées aux caractéristiques cliniques et anatomopathologiques standards. Les durées de survie ont été calculées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du Log Rank pour l'analyse univariée et par un modèle de Cox pour l'analyse multivariée.

**Résultats :** 105 patientes consécutives ont été étudiées avec un suivi médian de 56.3 mois [6-155]. L'âge médian était de 54 ans [29-80]. 57,1% des tumeurs étaient classées pT1, 39% pT2, 1,9% pT3, et 1,9% pT4. Il existait dans 41,9% des cas un envahissement ganglionnaire. 100% des patientes ont reçu de la chimiothérapie adjuvante. 18 récidives métastatiques ont été constatées. 17 patientes sont décédées. 12 patientes ont été classées dans le groupe « RA positif », 35 dans le groupe « basal-like », 45 dans le groupe « phénotype triple négatif » et 13 dans le groupe « mixte ». Le pronostic de ces 4 sous-types était similaire en termes de SSR (p=0,98) et de SG (p=0,86). Dans l'analyse univariée, les facteurs de pronostic favorable identifiés en termes de SSR étaient : la taille tumorale pT1, l'absence d'envahissement ganglionnaire, l'absence d'embole tumoral, et un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8. Les facteurs de pronostic favorable identifiés en termes de SG étaient : la taille tumorale pT1, l'absence d'embole tumoral, et un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8 et FOXp3. Dans l'analyse multivariée, en termes de SG, il existait une tendance positive en faveur d'un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8. Il n'a pas été retrouvé d'impact pronostique sur la survie des macrophages M2.

**Conclusion** : La classification en 4 sous-types IHC des CSTN ne semble pas avoir d'impact sur le pronostic en SSR et en SG. Cependant, il se distingue des facteurs pronostiques anatomopathologiques et il semble exister un impact de certains infiltrats lymphoïdes. Le nombre d'événements étant limité, un recul plus important est nécessaire, pour obtenir des résultats plus matures.



Mots clés : cancer du sein triple négatif, classification IHC, récepteur androgène, basal-like, TILs, CD8, FOXp3, SSR, SG.

# Abstract :

**Introduction:** Triple negative breast cancers (TNBCs) account for 10 to 20% of all breast cancers and have a poor prognosis. TNBC is characterized by the absence of hormone receptors and HER2 expression but is composed of a heterogenous group of tumors. Following recent molecular sub-classifications, we developed an immunohistochemical (IHC) classification of TNBC, in Tours. Moreover, recent data suggest that tumor infiltrating leukocytes (TILs) might have prognostic value. We investigated both parameters in a cohort of TNBC patients, treated with curative purpose, in Tours University Hospital.
**Objectives:** The primary objective was to evaluate the prognostic impact in terms of disease-free survival (DFS) and overall survival (OS) of our IHC classification of malignant epithelial cells. Secondary objectives were to characterize the immune infiltrate of tumor and stroma, and to evaluate the impact on both DFS and OS, in univariate and multivariate analyses.
Patients and methods: This was a single-center retrospective study of 105 TNBC patients, treated from 2003 to 2013. Expression of androgen receptor (AR), cytokeratin 5-6 (CK5-6) and epidermal growth factor receptor (EGFR) were studied by IHC method on tissue micro-array (TMA). We identified four tumor subtypes: 1 / AR positive; 2 / basal-like; 3 / triple-negative phenotype; 4 / mixed group. Total leukocyte infiltration was quantified after hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining. Cells positive for CD4, CD8, Foxp3 (Reg T cells) and CD163 (M2 macrophages) were quantified by IHC on TMA. Biological findings were correlated with clinical and pathological patients' characteristics. Survival data were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by the log-rank test in univariate analysis. The Cox model was used for multivariate analysis.
**Results:** 105 consecutive patients were studied with a median follow up of 56.3 months [6-155]. The median age was 54 years [29-80]. 57.1% were stage pT1, 39% pT2, 1.9% pT3, and 1.9% pT4. Lymph nodes were involved in 41.9% of the cases. 100% of the patients received adjuvant chemotherapy. 18 developed metastatic relapse. 17 patients died. 11 patients were classified as "positive RA," 35 as "basal-like", 46 as "triple-negative phenotype" and 13 as "mixed" group. The prognosis of the four subtypes was similar in terms of DFS ($p = 0.98$) and OS ($p = 0.86$). In univariate analysis, favorable prognostic factors in terms of SSR were: tumor size pT1, no lymph node involvement, lack of tumor emboles and high proportion of tumor infiltrating CD8 cells. Favorable prognostic factors in terms of OS were: tumor size pT1, lack of tumor emboles and high number of tumor infiltrating CD8 and FOXP3 cells. In multivariate analysis, in terms of SG, we found a trend favoring large number of tumor infiltrating CD8 cells. M2 macrophages had no impact on survival.
**Conclusion:** Our IHC sub-classification of TNBCs into four subtypes had no prognostic impact in terms of DFS and OS. Tumor infiltrating lymphocytes patterns seem to be associated with different prognostic subgroups. However, the number of events in our cohort was too limited and a longer follow-up is necessary.



**Keywords:** triple negative breast cancer, immunohistochemistry classification, androgen receptor, basal-like, TILs, CD8, FOXP3, disease-free survival, overall sutvival.

# I. Introduction :

## *1 Epidémiologie :*

Le cancer du sein est le plus fréquent des cancers chez la femme et représente la première cause de mortalité en France. L'incidence est de 54062 nouveaux cas/an responsables de 11913 décès/an (données INCA 2015).
Le sous-type triple négatif dans le cancer du sein, caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et l'absence d'amplification du gène HER 2, a été rapporté pour la première fois dans la littérature en 2006, et fait depuis l'objet de nombreuses publications[1–4].
Les cancers du sein triple négatif (CSTN) représentent 10 à 20% des cancers du sein et sont de pronostic défavorable. Ce sont des tumeurs plus agressives, atteignant plus fréquemment des femmes de moins de 50 ans ou afro-américaines, et ont une évolution métastatique rapide[1–3]. Les traitements actuels sont décevants. Malgré une chimio-sensibilité initiale importante, il existe une grande fréquence de récidive locale et de métastases, notamment viscérales[5]. La survie sans progression et la survie globale (SG) sont plus courtes, à grade et âge identiques. La SG à 5 ans est de 70%, contre 80% pour les autres types[6].

## *2 Classification des CSTN :*

Regroupés dans une entité clinique unique, les CSTN sont en réalité très hétérogènes[7–11]. Historiquement, les cancers du sein triple négatif ont d'abord été assimilés aux cancers du sein type « basal like », caractérisés par l'expression de marqueurs membranaires : CK5, 14, 17, et EGFR dans plus de 50% des cas[12]. Ils représentent plus de 70% des CSTN. Il existe une sur-expression d'EGFR dans 65% à 80% des CSTN « basal-like ». Il s'agit d'un critère d'agressivité de la maladie, souvent associé au grade 3 ou à l'invasion ganglionnaire. La sur-expression d'EGFR est corrélée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie et à une diminution de la survie sans récidive (SSR) et de la SG. Par la suite, différents sous-types histologiques des CSTN ont été identifiés : infiltrant non spécifique, indifférencié, médullaire, lobulaire infiltrant, mixte, apocrine, ...
Plusieurs études ont montré, à l'aide de modèles moléculaires, l'existence de plusieurs sous-types de CSTN, aux pronostics différents.
Lehmann et al en 2011[13] a identifié six sous-types de CSTN (basal-like 1 et 2, immunomodulatory, mesenchymal-like, mesenchymal stem-like, et luminal androgen receptor), et mis en évidence que le sous-groupe « luminal androgen receptor » (10% des CSTN) avait un pronostic défavorable.
Jezequel et al en 2015[14] a identifié trois sous-types de CSTN : groupe 1 dit luminal androgénique (22%), non basal-like, groupe 2 dit basal-like (45%), et groupe 3, basal enrichi, riche en cellules mésenchymateuses (33%). Il existait une SSR et une SG supérieures dans le groupe 3.
Enfin, Burstein et al[15] a identifié quatre sous-types de CSTN aux pronostics différents : le sous-type « luminal androgen receptor, le sous-type « mesenchymal », le sous-type « basal-like immuno-suppressed », et le sous-type « basal-like immune-activated » . Le sous-type basal-like immune-activated était corrélé dans l'étude à un meilleur pronostic (meilleure SSR et meilleure SG) comparativement au sous-type basal-like immuno-suppressed de pronostic défavorable. Le tableau 1 récapitule les caractéristiques principales de chaque sous-type selon les 3 auteurs.

| Référence | Sous-type | Caractéristiques |
|---|---|---|
| Lehmann | BL1 et BL2 | sur-expression de composants impliqués dans le cycle cellulaire et la division cellulaire. |
| | IM | sur-expression de gènes impliqués dans la régulation de la réponse immune et enrichi en gènes responsables des interactions entre l'hôte et le cancer. |
| | M | sur-expression de composants impliqués dans la motilité cellulaire, l'invasion, et la différenciation mésenchymateuse. |
| | MSL | sur-expression de gènes régulateurs de la transition épithélio-mésenchymateuse. |
| | LAR | sur-expression de gènes codant pour la différenciation luminale et pour les régulateurs de la voie de signalisation du récepteur aux androgènes. |
| Jezequel | Groupe 1 | luminal androgénique, non basal-like. |
| | Groupe 2 | basal-like, avec une faible réponse immunitaire et une prédominance de macrophages M2. |
| | Groupe 3 | basal enrichi, riche en cellules mésenchymateuses, avec une importante réponse immunitaire et une faible expression en macrophages M2. |
| Burstein | Sous-type 1 | luminal androgénique. |
| | Sous-type 2 | mésenchymal, enrichi en gènes impliqués dans le cycle cellulaire. |
| | Sous-type 3 | basal-like, avec une faible réponse immunitaire. |
| | Sous-type 4 | basal-like, avec une importante réponse immunitaire. |

Tableau 1 : Caractéristiques principales des différents sous-types de CSTN, selon Lehmann[13], Jezequel[14], et Burstein[15].

Certaines catégories de CSTN pourraient donc avoir soit une valeur pronostique propre, soit être associées à des thérapeutiques spécifiques (valeur prédictive).
Nous avons tenté de développer à Tours une classification immunohistochimique expérimentale basée sur ces modèles moléculaires. Notre objectif était de pouvoir identifier au moins 2 sous-types : le sous-type « récepteur androgène positif » et le sous-type « basal-like », avec les anticorps disponibles sur le CHU de Tours.

### *3 Le micro-environnement tumoral :*

Le micro-environnement tumoral est infiltré par des cellules immunitaires pouvant exercer une action immunosuppressive et pro-tumorale. Toutes ces cellules influencent le développement des cellules tumorales au sein de l'entité conceptuelle de niche cancéreuse.
Les TILs (lymphocytes infiltrant les tumeurs) représentent des cellules de la lignée blanche qui ont quitté la circulation sanguine et ont migré au sein de la tumeur. Ce sont des cellules immunitaires, mononuclées, constitué de différents types de cellules en proportion variable : les leucocytes de la lignée myéloïde, les tumor-associated macrophages avec les macrophages M1 et M2, les sous-types de cellules T helper, les cellules T cytotoxiques, les cellules T régulatrices, les cellules B, les cellules dendritiques et les cellules MDSC (myeloïd-derived suppressor cells). Les TILs régulent un équilibre entre activité pro et anti-tumorale via la production de différentes cytokines et interactions cellulaires[16–20].
Une méta-analyse[21] a suggéré qu'un important infiltrat lymphocytaire, défini par une infiltration de TILs supérieure ou égale à 50%, prédominait dans les cancers du sein agressifs tels que les CSTN, les cancers à grade élevé ou associés à une mutation BRCA et qu'il s'agissait d'un marqueur de bon pronostic.

Les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ sont des cellules de la réponse adaptative. Une partie des lymphocytes T CD4+ sont des cellules helper, les lymphocytes T CD8+ sont des cellules cytotoxiques. Les lymphocytes T CD8+ sont corrélés dans la littérature à un meilleur pronostic[22–26].
Les lymphocytes T régulateurs représentent un sous-type de lymphocytes T. Leur phénotype est CD4+, FOXp3+, et CD25+. L'impact sur la survie des cellules exprimant FOXp3 n'est pas clair et est variable d'une étude à l'autre [22,27–31].
Enfin, les macrophages sont des cellules migratrices recrutées fréquemment sur les sites tumoraux et peuvent constituer jusqu'à la moitié de la masse totale de la tumeur. Les macrophages sont connus pour modifier leur phénotype en fonction des signaux de l'environnement. 2 phénotypes antagonistes sont décrits : le phénotype M1, anti-tumoral, et le phénotype M2, pro-tumoral[32]. Il s'agit du concept de polarisation des macrophages[33–36]. Il existe peu de données actuellement sur les lymphocytes T régulateurs et les tumor-associated macrophages dans le cancer du sein[37–40].

Le but de notre étude était d'une part d'évaluer l'impact pronostique en termes de SSR et de SG de la classification immunohistochimique expérimentale développée au CHU de Tours et d'autre part de caractériser le type d'infiltrat immunologique intra-tumoral et stromal et d'évaluer le retentissement en univarié et multivarié sur la SSR et la SG.

# II. Patients et méthodes :

## *1 Patients :*

### a Type d'étude :

Il s'agit d'une étude de cohorte monocentrique et rétrospective de 105 patientes consécutives traitées au CHU de Tours entre 2003 et 2013. L'ensemble des données cliniques et anatomopathologiques a été extrait du dossier personnalisé partagé du CHU (DPP) et de la base de gestion informatique du service d'anatomopathologie de Tours (DIAMIC).

### b Critères d'inclusion et critères d'exclusion :

Entre 2003 et 2013, au CHU de Tours, toutes les patientes traitées en situation adjuvante pour un cancer du sein triple négatif ont été inclues, quels que soient leur âge et leur statut ménopausique. Toutes les patientes avaient eu un traitement local chirurgical (conservateur ou mastectomie) le plus souvent associé à une radiothérapie loco-régionale et à de la chimiothérapie à visée adjuvante.
Les patientes prises en charge en situation néo-adjuvante ou en phase d'emblée métastatique ont été exclues.

### c Critères cliniques et anatomopathologiques :

Nous avons repris les principaux critères cliniques et anatomopathologiques : la taille tumorale, le statut ganglionnaire, le stade TNM, le statut ménopausique, le grade SBR, l'existence ou non d'emboles, le type de chirurgie et le type histologique.
Les tumeurs de stade supérieur à pT1 ont été regroupées pour l'analyse statistique en raison de taux de SSR et SG statistiquement non différents afin de diminuer le nombre de variables dans l'analyse multivariée.
De la même manière, les tumeurs classées N1 ou N2 ont été regroupées en une classe N+.

## *2 Méthodes :*

### a Relecture histologique des tumeurs et évaluation des TILS :

Pour chaque tumeur, la lame HES (Hématoxyline-Eosine-Safran) la plus représentative de la tumeur a été relue par deux personnes : M. Stacoffe et le Dr F. Arbion (anatomopathologiste) pour confirmer le type histologique et le grade histo-pronostique.
Pour chaque tumeur, l'infiltration lymphocytaire stromale a été évaluée par les deux mêmes lecteurs selon les recommandations du groupe de travail international des TILs[41]. Le seuil de positivité a été fixé à 50% selon les données de la littérature[21].

### b Constitution des blocs de *Tissue Microarray* (TMA):

Les blocs de TMA ont été construits à l'aide de l'appareil dédié semi-automatique : le Tissue Arrayeur MTA Booster, Version 1,01, Alphélys. Les zones d'intérêt ont été repérées au préalable par lecture des lames originelles colorées en HES. Pour chaque tumeur, 4 carottes de 1mm de diamètre ont été prélevées, 2 en périphérie de la tumeur et 2 au centre de la tumeur. Le plan de disposition des carottes sur les blocs de TMA a été réalisé grâce à un logiciel (TMA designer 2).

### c Immunohistochimie :

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur des coupes de 4µm des blocs de TMA avec l'automate XT Benchmark, Ventana (kit de révélation Ultraview).
La lecture des immuno-marquages a été réalisée en double aveugle par les deux lecteurs en tenant compte du spot le plus marqué et le plus représentatif de chaque tumeur. Les cas discordants ont été relus en binôme.
Une évaluation semi-quantitative a été réalisée pour les anticorps RA, CK5-6, EGFR. RA, CK5-6 et EGFR étaient considérés positifs quand le marquage (nucléaire pour RA, membranaire pour CK5-6 et EGFR) était supérieur à 10% pour RA, 1% pour CK5-6 et EGFR[14]. Pour CD4, CD8, et FOXp3, le nombre de cellules marquées était compté sur la surface d'un spot (1 $mm^2$). FOXp3 était considéré positif lorsque le nombre de cellules marquées était supérieur à la médiane. Le seuil de positivité de CD4 et CD8 a été fixé

arbitrairement au 25ème percentile (2 pour iCD4, 50 pour sCD4, 2 pour iCD8, 10 pour sCD8). Le CD163 était évalué par la densité d'éléments marqués, de 0 (absent) à 3 (dense). Les caractéristiques détaillées des anticorps (type d'anticorps, dilution, marquage et seuil de positivité) sont récapitulées tableau 2.

| Anticorps | Clone | Fournisseur | Dilution | Marquage IHC | Seuil de positivité |
|---|---|---|---|---|---|
| RA | SP107 | Roche | Pré-dilué | Nucléaire | >10% |
| CK5-6 | D5/16B4 | Dako | 1/50ème | Membranaire | >1% |
| EGFR | 31G7 | BioSd | 1/25ème | Membranaire | >1% |
| CD4 | SP35 | Roche | Pré-dilué | Membranaire | 25ème percentile |
| CD8 | C8/144B | Dako | 1/50ème | Membranaire | 25ème percentile |
| FOXp3 | 236A/E7 | Abcam | 1/20ème | Nucléaire | médiane |
| CD163 | 10D6 | Novocastra | 1/200ème | membranaire | > 2 |

Tableau 2 : Caractéristiques détaillées des anticorps utilisés.
(légende : IHC = immunohistochimie, RA = récepteur androgène, CK5-6 = cytokératine 5-6, EGFR = récepteur à l'*epidermal growth factor* ).

### d Analyse statistique :

Le logiciel SPSS version 18 (SPSS Inc. Released 2009. PASW Statistics for Windows Version 18.0 Chicago. SPSS Inc) a été utilisé pour l'ensemble des statistiques de l'étude. La date d'origine a été définie pour l'ensemble des patients par la date du diagnostic définitif (jour de la tumorectomie ou de la mastectomie). La date de point a été fixée au 1er mars 2016. Les événements survenus après la date de point ont été censurés à droite.
La SG était définie comme le temps entre la date d'origine et la survenue du décès quelle qu'en soit la cause. La SSR était définie comme le délai entre la date d'origine et la survenue d'un événement quel qu'il soit (rechute locale ou métastatique, survenue d'un second cancer du sein ou décès, toutes causes confondues).
Les durées de survie ont été calculées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du Log Rank pour l'analyse univariée (non stratifié et stratifié sur la taille tumorale) et par un modèle de Cox pour l'analyse multivariée. Le risque alpha bilatéral a été fixé à 5% avec un intervalle de confiance de 95%.
Les graphiques ont été réalisés sous R (R development core team 2008).

# III. Résultats :

## *1 Diagramme de consort :*

Entre 2003 et 2013, au CHU de Tours, 1109 patientes ont été traitées pour un cancer du sein tous types histologiques et tous stades confondus. Les patientes prises en charge en situation néo-adjuvante (71) ou métastatique d'emblée (74) ont été exclues. Sur les 964 patientes traitées en situation adjuvante, seules les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif ont été inclues (244). Par manque de données anatomopathologiques (absence de bloc tumoral, absence de lame,...), 139 patientes ont été exclues. Au total, 105 patientes ont été inclues dans notre étude quel que soit leur âge et leur statut ménopausique. (cf figure 1, diagramme de consort).

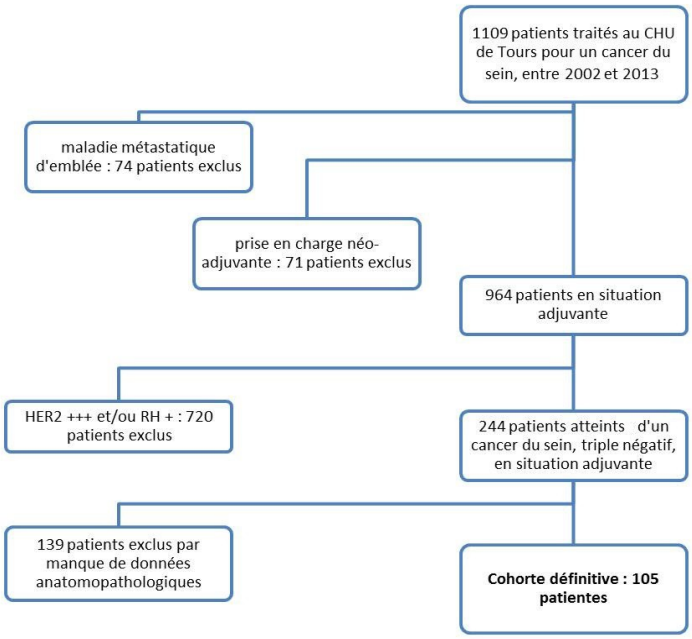


Figure 1 : Diagramme de consort.

## *2 Caractéristiques de la cohorte :*

105 patientes consécutives ont été étudiées avec un suivi médian de 56,3 mois [6 – 155]. L'âge médian était de 54 ans [29 – 80]. 86,7% des patientes avaient un statut de performance OMS 0. 63,8% des patientes étaient ménopausées. Il existait dans 41,9% des cas un envahissement ganglionnaire. 100% des patientes ont reçu de la chimiothérapie adjuvante, et 92,4% une irradiation loco-régionale.
Cinq sous-types histologiques ont été identifiés : infiltrant non spécifique (86,7%), indifférencié (4,8%), médullaire (3,8%), lobulaire infiltrant (2,9%), et plus rarement mixte

(1%), et apocrine (1%). Le volume tumoral moyen était de 23 mm [5 – 78]. Il existait des emboles tumoraux dans 37,1% des cas.
Les caractéristiques détaillées de la cohorte sont exposées dans le tableau 3.

| Caractéristiques | Effectifs | % |
|---|---|---|
| Délai médian de suivi (mois) | 56,3 [6 - 155] | |
| Age médian (années) | 54 [29 - 80] | |
| Statut de performance<br>OMS 0<br>OMS 1 | <br>91<br>14 | <br>86,7<br>13,3 |
| IMC moyen (kg/m2) | 24,7 (17 - 38) | |
| Mutation BRCA1 | 2 | 1,9 |
| Ménopausée<br>Non ménopausée | 67<br>38 | 63,8<br>36,2 |
| Ganglion sentinelle effectué | 68 | 65 |
| Curage axillaire effectué | 70 | 66,7 |
| Envahissement ganglionnaire | 44 | 41,9 |
| Infiltrant non spécifique<br>indifférencié<br>médullaire<br>lobulaire infiltrant<br>mixte<br>apocrine | 91<br>5<br>4<br>3<br>1<br>1 | 86,7<br>4,8<br>3,8<br>2,9<br>1<br>1 |
| Volume tumoral moyen (mm) | 23 (5 - 78) | |
| pT1<br>pT2<br>pT3<br>pT4 | 60<br>41<br>2<br>2 | 57,1<br>39<br>1,9<br>1,9 |
| Tumeur multi-focale | 10 | 9,5 |
| pN0<br>pN1<br>pN2 | 61<br>38<br>6 | 58,1<br>36,2<br>5,7 |
| Grade SBR 2<br>Grade SBR 3 | 17<br>88 | 16,2<br>83,8 |
| In situ associé | 60 | 57,1 |
| Emboles associés | 39 | 37,1 |
| Tumorectomie<br>Mastectomie | 85<br>28 | 81<br>26,7 |
| Chimiothérapie adjuvante | 105 | 100 |
| Anthracyclines<br>taxanes | 104<br>68 | 99,9<br>64,8 |
| Radiothérapie<br>lit tumoral<br>lit tumoral + ganglions | 97<br>60<br>37 | 92,4<br>57,1<br>35,2 |

Tableau 3 : Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques de la cohorte.

## *3 Analyses biologiques :*

### a Classification des CSTN en immunohistochimie :

Selon la classification immunohistochimique expérimentale basée sur des modèles moléculaires[13-15], quatre sous-populations de CSTN ont été identifiées (cf tableau 4) : le sous-groupe « récepteur androgène positif = RA+ » (11,4% des cas), le sous-groupe « basal-like = BL +» (33.3% des cas), le sous-groupe « phénotype triple-négatif » (42,9% des cas), et le sous-groupe « mixte » (RA+ et BL+) (12.4% des cas).

| Sous-types immunohistochimiques | Effectifs | % |
|---|---|---|
| « Récepteur androgène positif » | 12 | 11,4 |
| « Basal-like » | 35 | 33,3 |
| « Phénotype triple négatif » | 45 | 42,9 |
| « Mixte » | 13 | 12,4 |

Tableau 4 : Effectifs et pourcentages des quatre sous-types de cancers du sein triple négatif identifiés selon la classification immunohistochimique expérimentale.

Au total, il existait une sur-expression de RA dans 23,8% des cas (sous-types « RA+ » et « mixte »), et une sur-expression de CK5-6 +/- EGFR (sous-types « basal-like » et « mixte ») dans 45.7% des cas. (cf image 1).

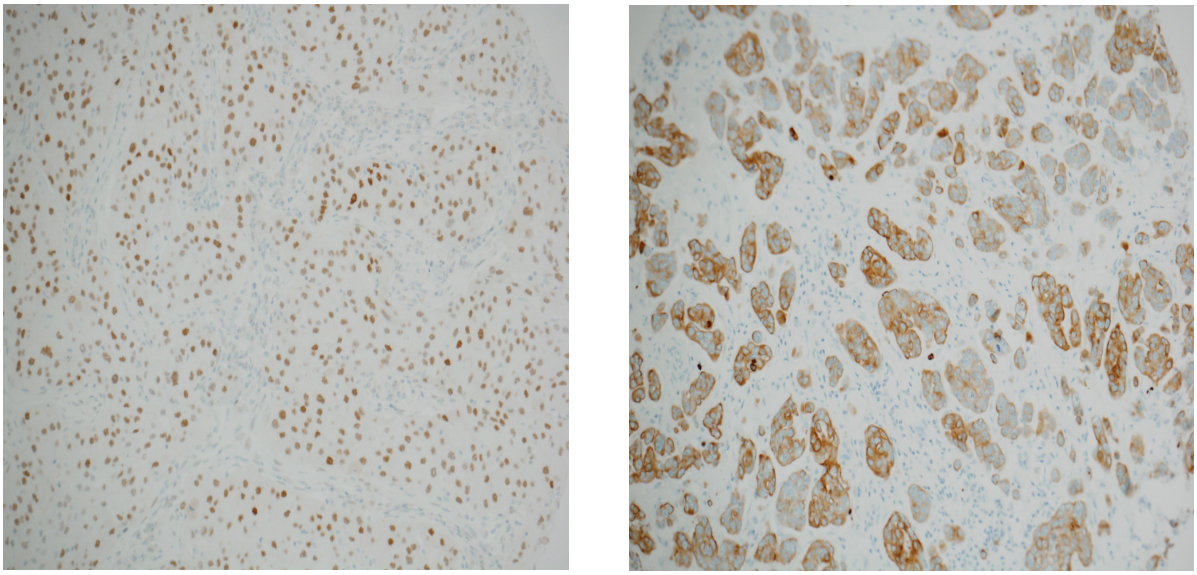

Image 1 : Sur-expression du récepteur androgène (à gauche), et de CK5-6 (à droite) en immunohistochimie.

### b TILs :

68 patientes (64,8%) avaient un faible infiltrat lymphocytaire (< 50%). (cf image 2).

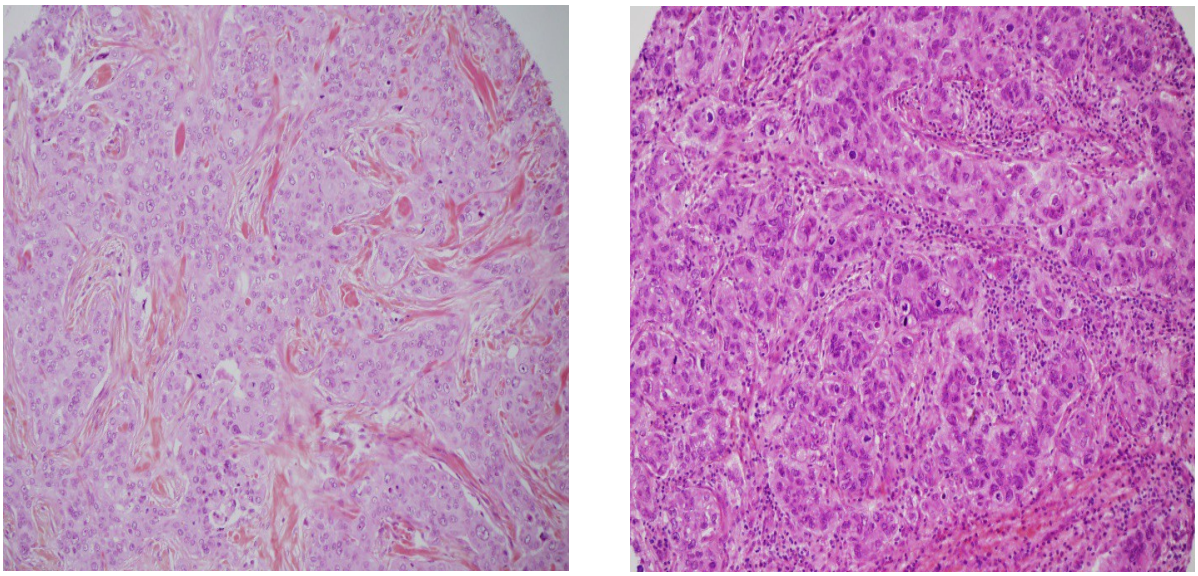

Image 2 : Faible infiltrat lymphocytaire (à gauche) et infiltrat lymphocytaire élevé (à droite).

### c Régression linéaire entre les données intra-tumorales et stromales de l'infiltration lymphocytaire :

Après lecture des données CD4, CD8, et FOXp3 (cf image 3), une régression linéaire a été effectuée pour comparer les données intra-tumorales (i) et stromales (s) de chaque sous-type immunologique.

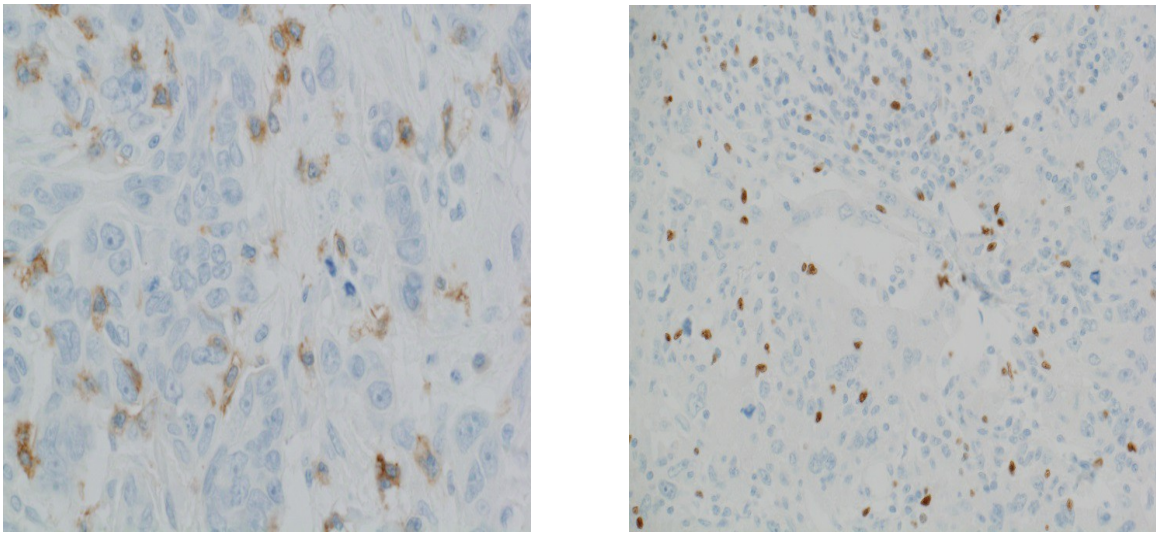

Image 3 : Infiltration intra-tumorale et stromale en CD8 (à gauche, grossissement 40) et en FOXp3 (à droite, grossissement 20), en immunohistochimie.

Les abscisses et les ordonnées représentaient la racine carrée de la variable en raison de la distribution non-normale de la variable.
Il existait une corrélation significative mais faible entre les données intra-tumorales et stromales (cf figure 2 (A, B, et C)) avec un coefficient R entre 0,43 et 0,52 (corrélation parfaite R = 1).

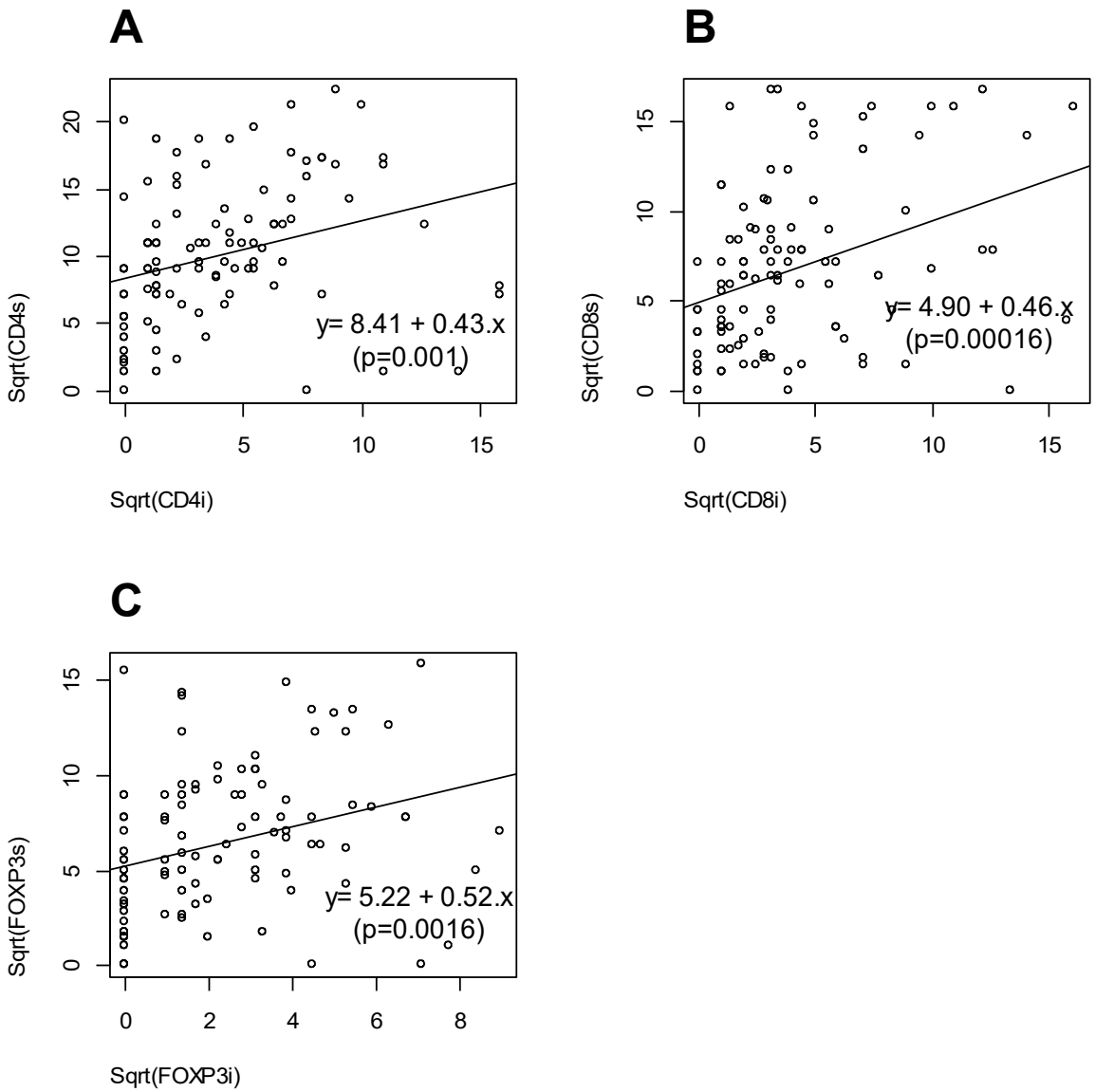


Figure 2 : Corrélation entre l'expression intra-tumorale et stromale du nombre de cellules CD4+ (A), CD8+ (B) et FOXp3+ (C). Les valeurs sont exprimées selon leur racine carrées en raison d'une distribution non normale.

## *4 Analyses de survie :*

### a Survie sans récidive et survie globale de la cohorte :

Au total, 29 récidives ont été constatées, tout type de récidive confondu, dont 18 récidives métastatiques. En cas de récidive métastatique, il existait plus de métastases viscérales (17,1%) que de métastases ganglionnaires (9,5%), osseuses (8,6%) ou cérébrales (4,8%).
17 patientes sont décédées.
Les données de tous les événements de la cohorte sont regroupées tableau 5.

| Événement | Effectifs | % |
|---|---|---|
| Récidive homolatérale<br>Récidive controlatérale | 5<br>6 | 4,8<br>5,7 |
| Récidive métastatique | 18 | 17 |
| Métastases ganglionnaires | 10 | 9,5 |
| Métastases osseuses | 9 | 8,6 |
| Métastases viscérales | 18 | 17,1 |
| Métastases cérébrales | 5 | 4,8 |
| Total d'événements | 29 | 27,6 |
| Décès | 17 | 16,2 |

Tableau 5 : Descriptif de l'ensemble des événements survenus pendant le suivi.

En termes de SSR et de SG, il existait un plateau à partir de six ans. Après 88 mois, la SSR était de 63% et la SG de 78%.
Les médianes de survie n'étaient pas atteintes.
Les courbes de survie (SSR et SG) sont représentées figure 3.

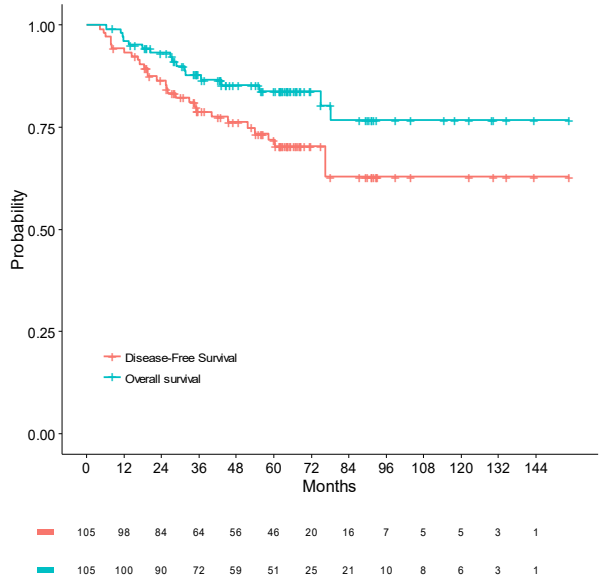


Figure 3 : Survie sans récidive et survie globale de la cohorte.

## b Analyse univariée :

**- Analyses de survie selon les facteurs clinicobiologiques usuels :**

En distinguant les tumeurs de moins de 2 cm (T1) versus > 2 cm, il existait une différence significative en termes de SSR (p=0,05, HR 2,09 [1 – 4,37]) et une tendance quasi-significative en termes de SG (p=0,06, HR 2,49 [0,92 – 6,75]).
Nous avons identifié une différence significative en termes de SSR selon l'existence ou non d'un envahissement ganglionnaire (p=0,05, HR 2,04 [1 - 4,24]).
Enfin, selon l'existence ou non d'embole tumoral, il existait une différence significative en termes de SSR (p= 0,046, HR 2,07 [1 - 4,29]) et une tendance quasi-significative en termes de SG (p=0,06, HR 2,45 [0,93 - 6,45]).
Il n'a pas été retrouvé de différence significative, quelle que soit la survie, selon le stade TNM, le grade SBR, et le statut ménopausique.

**- Analyse de survie selon la classification des CSTN en immunohistochimie :**

Il n'y avait pas de différence significative, en termes de SSR et de SG, selon les quatre sous-types immunohistochimiques. (respectivement p=0,95 et p=0,86). (cf figure 4).

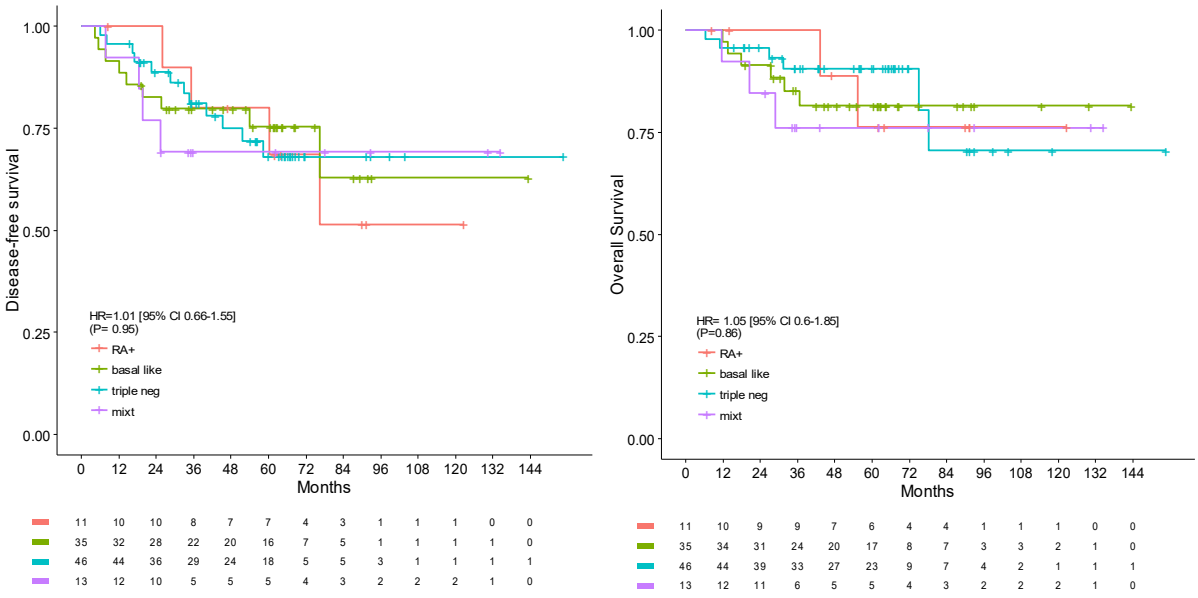


Figure 4 : Survie sans récidive (à gauche) et survie globale (à droite) selon les quatre sous-types immunohistochimiques des CSTN.

**- Analyse de survie selon l'infiltration lymphocytaire du stroma tumoral (TILs) :**

Nous avons observé une tendance, statistiquement non significative, en faveur d'une meilleure survie (SSR et SG) lorsqu'il existait un important infiltrat lymphocytaire du stroma tumoral. (respectivement p = 0,23 et p = 0,33). (cf figures 5 et 6).

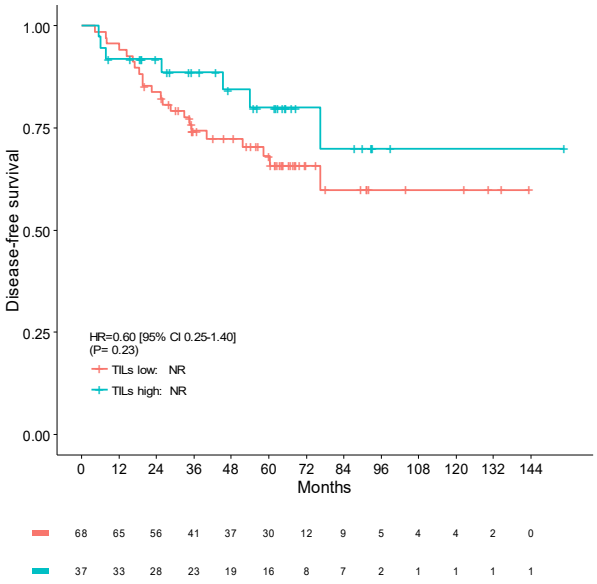


Figure 5 : Survie sans récidive selon l'infiltration lymphocytaire du stroma tumoral (TILs).

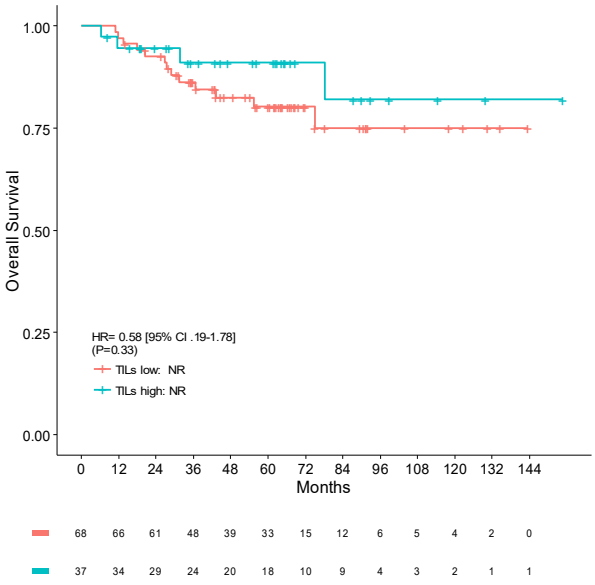


Figure 6 : Survie globale selon l'infiltration lymphocytaire du stroma tumoral (TILs).

**- Analyse de survie selon les différentes sous-populations lymphocytaires :**

**CD8 :**

Nous avons observé une différence significative en faveur d'une meilleure survie (sans récidive et globale) en cas d'un important infiltrat intra-tumoral en CD8 (respectivement p=0,03 (HR 0.41 [0.20 - 0.87]), et p=0,008 (HR 0,27 [0,11 – 0,71]). (cf figures 7 et 8).
Les résultats étaient identiques en cas de stratification sur la taille tumorale (données non montrées).
Il n'a pas été mis en évidence de différence significative selon l'importance de l'infiltrat stromal en CD8.

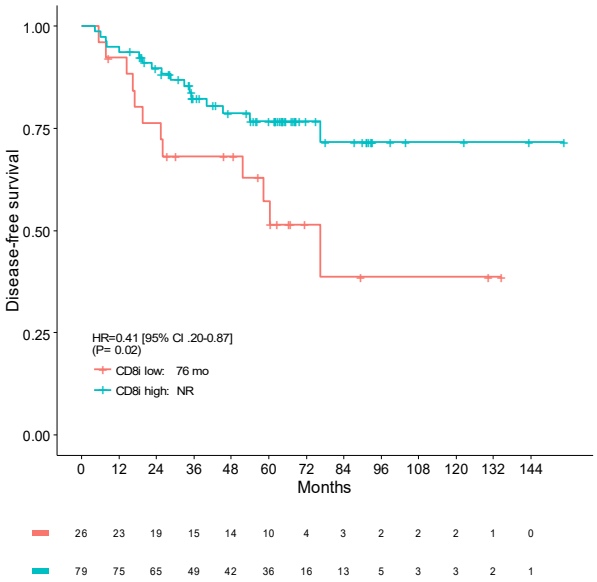


Figure 7 : Survie sans récidive selon l'infiltration intra-tumorale en CD8.

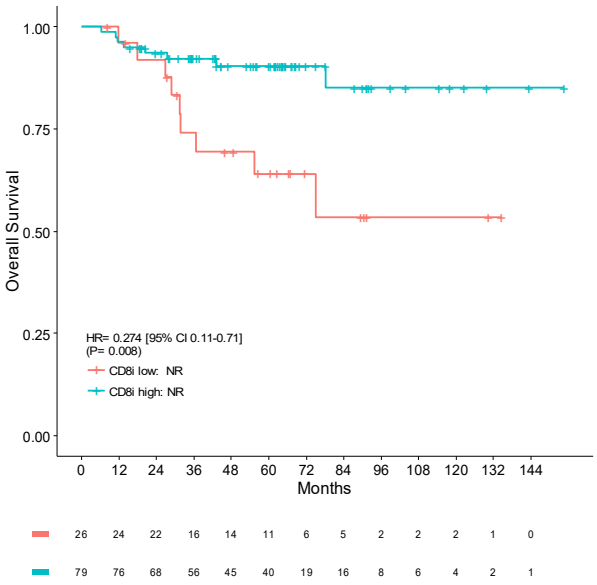


Figure 8 : Survie globale selon l'infitration intra-tumorale en CD8.

**CD4 :**

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative selon l'infiltration intra-tumorale et stromale en CD4 en termes de survie (SSR et SG). Il existait néanmoins une tendance non significative en faveur d'une meilleure SG en cas de taux élevé de iCD4 (p = 0,16).

**FOXp3 :**

Nous n'avons pas retrouvé de différence significative en termes de SSR selon l'infiltrat en iFOXp3+ ou iFOxP3+ iCD4+. En revanche, nous avons observé une différence significative en faveur d'une meilleure SG en cas d'important infiltrat intra-tumoral en FOXp3 (p=0,03 (HR 0,31 [0,10 - 0,95]).

Les données étaient similaires en cas d'association iFOXp3+ et iCD4+ avec p=0,03 (HR 0,31 [0,10 – 0,95]) (cf figures 9 et 10).

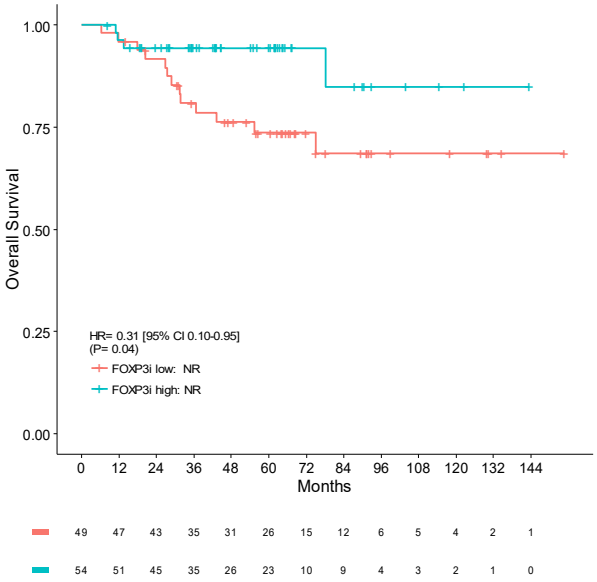


Figure 9 : Survie globale selon l'infiltration intra-tumorale en FOXp3.

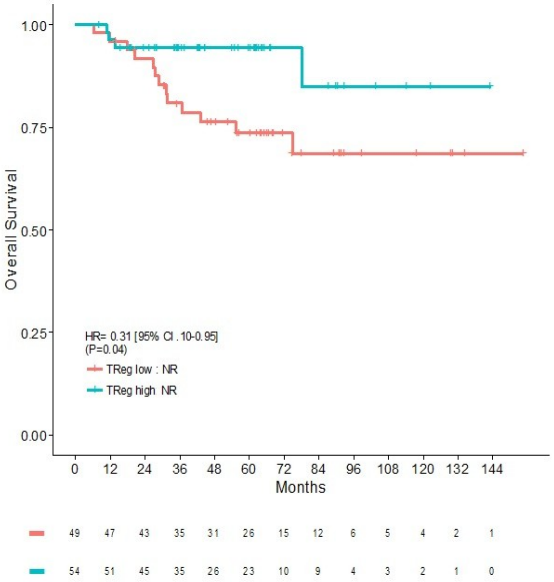


Figure 10 : Survie globale selon l'infiltration intra-tumorale en FOXp3 et CD4.

**Macrophages M2 :**

Il n' a pas été retrouvé d'impact pronostique sur la survie des macrophages M2 (respectivement SSR p=0,88 et SG p= 0,18) qu'il y ait ou non stratification sur la taille tumorale.

**- Résumé des analyses univariées :**

Les résultats des analyses univariées sont résumés dans le tableau 6.

| | **SSR** | | | **SG** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Variables** | **HR** | **IC 95%** | **p** | **HR** | **IC 95%** | **p** |
| Taille tumorale | **2,09** | **1 – 4,37** | **0,05** | **2,49** | **0,92 - 6,75** | **0,06** |
| Envahissement gg | **2,04** | **1 – 4,24** | **0,05** | 2,15 | 0,82 - 5,66 | 0,11 |
| Stade TNM | - | - | 0.23 | - | - | 0.29 |
| Statut ménopausique | 0,64 | 0,31 - 1,33 | 0,23 | 1,07 | 0,40 - 2,82 | 0,90 |
| Grade SBR | - | - | 0,94 | - | - | 0,37 |
| Emboles | **2,07** | **1 – 4,29** | **0,046** | **2,45** | **0,93 - 6,45** | **0,06** |
| Type de chirurgie | **-** | **-** | **0,026** | - | - | **0,05** |
| Type histologique | - | - | 0,54 | - | - | 0,36 |
| Sous-type IHC | 1,01 | 0,66 - 1,55 | 0,95 | 1,05 | 0,60 - 1,85 | 0,86 |
| TILs | 0,6 | 0,25 - 1,40 | 0,23 | 0,58 | 0,19 - 1,78 | 0,33 |
| iCD4 | 1 | 0.44 - 2.24 | 0.99 | 0.50 | 0.19 - 1.33 | 0.16 |
| sCD4 | 0.88 | 0.39 - 1,99 | 0.76 | 0.62 | 0.23 - 1.68 | 0.35 |
| iCD8 | **0.41** | **0.20 - 0.87** | **0.02** | **0.27** | **0.11 - 0.71** | **0.008** |
| sCD8 | 1,51 | 0.61 - 3.72 | 0.37 | 0.87 | 0.31 - 2.47 | 0.79 |
| iFOXp3 | 0,7 | 0,33 - 1,47 | 0,34 | **0,31** | **0,10 - 0,95** | **0,03** |
| sFOXp3 | 0,75 | 0,36 - 1,58 | 0,46 | 0,95 | 0,36 - 2,47 | 0,92 |
| iFOXp3+ iCD4+ | 0,7 | 0,33 - 1,47 | 0,34 | **0,31** | **0,10 - 0,95** | **0,03** |
| sFOXp3+ sCD4+ | 0,79 | 0,38 - 1,66 | 0,53 | 0,99 | 0,38 - 2,57 | 0,99 |
| M2 | 0,93 | 0,35 - 2,43 | 0,88 | 0,28 | 0,037 - 2,10 | 0,18 |

Tableau 6 : Récapitulatif de l'ensemble des données de survie sans récidive et de survie globale en analyse univariée.
(Légende : SSR = survie sans récidive, SG = survie globale, gg = ganglionnaire, IHC = immunohistochimie, iCD4 = CD4 intra-tumoral, sCD4 = CD4 stromal, iCD8 = CD8 intra-tumoral, sCD8 = CD8 stromal, iFOXp3 = FOXp3 intra-tumoral, sFOXp3 = FOXp3 stromal, M2 = macrophages M2, HR = hazard ratio, IC95 = intervalle de confiance 95%).

### c Analyse multivariée :

Nous avons étudié dans l'analyse multivariée cinq co-variables : la taille tumorale, l'envahissement ganglionnaire, la présence d'emboles, l'infiltrat intra-tumoral en CD4 et l'infiltrat intra-tumoral en CD8.
Nous n'avons pas retrouvé de différence significative en termes de SSR et de SG. Il existait néanmoins une tendance positive, non significative, en faveur de l'infiltrat intra-tumoral en CD8 pour la SSR. (p=0,08, HR 0,43 [0,17-1,10]).
La stratification selon la taille tumorale ne modifiait pas les données du modèles (données non montrées). Les résultats de l'analyse multivariée sont résumés dans le tableau 7.

| | **SSR** | | | **SG** | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| **Variables** | **HR** | **IC 95%** | **p** | **HR** | **IC 95%** | **p** |
| Taille tumorale | 1,55 | 0,70 - 3,42 | 0,28 | 1,94 | 0,7 - 5,49 | 0,2 |
| Envahissement ganglionnaire | 1,32 | 0,57 - 3,06 | 0,52 | 1.18 | 0.39 – 3.48 | 0.78 |
| Emboles | 1,37 | 0,60 - 3,13 | 0,46 | 1,49 | 0,50 - 4,46 | 0,47 |
| iCD4 | 1,59 | 0,61 - 4,15 | 0,34 | 0,79 | 0,26 - 2,41 | 0,79 |
| iCD8 | 0,43 | 0,17 - 1,10 | **0,08** | 0,42 | 0,13 - 1,35 | **0,14** |

Tableau 7 : Récapitulatif des données de survie sans récidive (SSR) et de survie globale (SG), en analyse multivariée associant 5 co-variables : la taille tumorale, l'envahissement ganglionnaire, les emboles, l'infiltrat intra-tumoral en CD4 (= iCD4), et l'infiltrat intra-tumoral en CD8 (= iCD8). HR : hazard ratio, IC95 = intervalle de confiance à 95%.

# IV. Discussion :

Les cancers du sein triple négatif sont hétérogènes. Il existe plusieurs sous-classifications moléculaires qui correspondent à plusieurs entités anatomopathologiques. Nous avons développé un modèle basé sur l'immunohistochimie et inspiré de modèles moléculaires. Notre objectif était de pouvoir identifier deux sous-types en particulier : le sous-type « basal-like », le plus fréquent des CSTN (>70%), et le sous-type « récepteur androgène positif », identifié fréquemment dans la littérature[13–15,] et potentiellement accessible à des traitements par anti-androgènes. Nous avons utilisé trois anticorps disponibles sur le CHU de Tours (RA, EGFR, et CK5-6), et avons individualisé quatre sous-types de CSTN : le sous-type « récepteur androgène positif », le sous-type « basal-like », le sous-type « phénotype triple négatif » et le sous-type « mixte ». Nous n'avons pas retrouvé de valeur pronostique de notre classification immunohistochimique en termes de SSR et de SG (respectivement p= 0,95 et p=0,86). Cela est cohérent avec les observations de Masuda[9] même si d'autres auteurs ont retrouvé des résultats différents[13–15].

Une des limites de ces comparaisons est que nous avons imaginé un modèle immunohistochimique par extrapolation de données obtenues sur des modèles moléculaires. Ces données sont préliminaires et nous n'avons pas encore vérifié la corrélation entre les classifications immunohistochimiques et moléculaires ce qui fera l'objet d'un autre travail. Nous avons utilisé un anticorps anti-cytokératine CK5-6, disponible sur le CHU de Tours, moins spécifique que l'anticorps anti-CK5. Récemment, Liu et al[11] ont rapporté un travail utilisant le même anticorps que le notre. Un complément d'étude intégrant un anticorps spécifique anti-CK5 dans notre panel est cependant souhaitable.

Le pronostic global de notre série était similaire aux données de la littérature[6] . En termes de SSR et de SG, il existait un plateau à partir de six ans. Après 88 mois, la SSR était de 63% et la SG de 78%. Notre série est rétrospective et monocentrique et porte sur un effectif limité. Nous n'avons observé que peu d'événements (récidive ou décès) et notre étude manque de recul. Le suivi de notre cohorte est donc indispensable pour obtenir des données plus matures.

Le démembrement des CSTN présente non seulement un intérêt physiopathologique mais également un intérêt en termes de retentissement thérapeutique potentiel. L'identification du sous-groupe RA+ a permis l'identification d'une nouvelle cible thérapeutique et des essais utilisant des anti-androgènes comme l'enzalutamide ou l'acétate d'abiratérone sont actuellement en cours[42–45], de même que des traitements anti-EGFR pour le sous-groupe EGFR+ [46–49].

Dans notre série, nous n'avons pas retrouvé d'impact sur la SSR et la SG de certains facteurs pronostiques classiques. En termes de SSR, il existait une différence significative selon la taille tumorale (p=0,05), l'existence ou non d'un envahissement ganglionnaire (p=0,05) et l'existence ou non d'emboles tumoraux (p=0,046). En termes de SG, il existait également une tendance non significative selon la taille tumorale (p=0,06) et l'existence ou non d'emboles tumoraux (p=0,06). Par contre, nous n'avons pas retrouvé de différence significative selon le stade TNM (p=0,23) et selon le grade SBR (p=0,94).
Les CSTN ont un mauvais pronostic intrinsèque qui réduit l'intérêt des facteurs de risques classiques. Des patientes atteintes de CSTN aux caractéristiques favorables peuvent ainsi fréquemment développer des métastases.
Il était donc important d'identifier d'autres facteurs, notamment immunologiques, dans un intérêt pronostique et également thérapeutique.

Dans notre étude, toutes les lectures immunologiques ont été faites en double aveugle. Elles ont été faites manuellement, ce qui est beaucoup plus fiable qu'une lecture automatique, basée sur le hasard. De plus, les données discordantes ont été relues en binôme.
L'importance de l'infiltration lymphocytaire du stroma tumoral (TILs) n'était pas statistiquement corrélée à la SSR et à la SG mais il existait une tendance en faveur d'une meilleure survie en cas d'important infiltrat lymphocytaire du stroma tumoral. Ces données sont cohérentes avec la littérature[21,50–52].
Les lymphocytes T CD4+ et les lymphocytes T CD8+ sont des cellules de la réponse adaptative. Une partie des lymphocytes T CD4+ sont des cellules helper, les lymphocytes T CD8+ sont des cellules cytotoxiques.
Le nombre de cellules intra-tumorales exprimant CD8 influe sur la survie de manière significative dans l'analyse univariée : en termes de SSR et SG, un nombre élevé de cellules intra-tumorales CD8+ est un facteur de bon pronostic de manière significative (p=0,02 et

0,008 respectivement). Les données sont similaires en cas de stratification sur la taille tumorale (p=0,04 et 0,01 respectivement). Il existe une tendance positive dans l'analyse multivariée (p=0,08) et en cas de stratification sur le volume tumoral (p=0,088). Ces données sont cohérentes avec la littérature[22,24].
FOXp3 est un marqueur classique des lymphocytes T régulateurs. Dans notre étude, un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant FOXp3 est corrélé de manière significative à une meilleure SG (p=0,03). Il s'agit dans notre étude d'un facteur de bon pronostic. Dans la littérature, l'impact de FOXp3 sur la survie des CSTN n'est pas établi[27].
Les résultats concernant l'infiltration intra-tumorale en CD4+ montrent une tendance en faveur d'une meilleure SG (p=0,16) ce qui montre une cohérence entre nos différents résultats. En effet, les cellules CD4+ ne représentent pas une unique population mais une population hétérogène au sein de laquelle se distinguent, entre autres, les lymphocytes T régulateurs.
En cas d'association iFOXp3+ iCD4+, les résultats sont identiques (aux données iFOXp3+ seules) avec une meilleure SG de manière significative (p=0,03). Un double marquage FOXp3/CD4 serait plus pertinent pour typer les lymphocytes T régulateurs. Cependant, notre travail montre que le double marquage n'apporterait pas de nouveaux résultats.
Aucune donnée de l'infiltrat lymphocytaire quantifié dans le stroma (sCD4, sCD8 et sFOXp3) ne montre de résultats significatifs, avec une corrélation significative mais faible entre les données intra-tumorales et les données stromales (coefficient R variant entre 0,43 et 0,52 pour une corrélation parfaite à 1). Ces données confirment la difficulté de typer précisément l'infiltration lymphocytaire intra-tumorale et stromale.
Les macrophages n'ont pas d'impact dans notre étude sur la SSR et la SG (p=0,88 et p=0,18 respectivement). Cependant, nous nous sommes limités à un seul anticorps (anticorps anti-CD163 spécifique des macrophages). Il est donc difficile de conclure. Il pourrait se discuter, dans un autre travail, d'utiliser des co-marquages pour gagner en spécificité et en puissance (exemple anti-CD163 et anti-CD68 = marqueur pan-macrophagique, ...).
Enfin, beaucoup de données n'ont pas été étudiées dans ce travail, notamment PD1 et PD-L1 et pourraient faire l'objet d'autres travaux.

# V. Conclusion :

Notre modèle de sous-classification des CSTN à partir d'un outil immunohistochimique n'a pas retrouvé d'impact pronostique dans cette série rétrospective de 105 patientes traitées au stade précoce de la maladie. Il s'agit de données précoces que nous devrons comparer aux données d'un modèle moléculaire. Par ailleurs, l'étude de l'infiltrat leucocytaire du micro-environnement tumoral suggère l'intérêt d'étudier l'impact de certains infiltrats lymphoïdes, notamment en CD8 et en FOXp3. Le nombre d'événements étant limité, un recul plus important est nécessaire pour obtenir des résultats plus matures.
De nouvelles études sont importantes pour améliorer la nosologie des cancers du sein triple négatif et discriminer des entités pouvant être ciblées par des thérapeutiques précises.

## VI. Références bibliographiques :


1. Boyle, P. Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Ann. Oncol.* **23,** vi7-vi12 (2012).
2. Dent, R. *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **13,** 4429–4434 (2007).
3. Gogia, A., Raina, V., Deo, S. V. S., Shukla, N. K. & Mohanti, B. K. Triple-negative breast cancer: An institutional analysis. *Indian J. Cancer* **51,** 163–166 (2014).
4. Yadav, B. S., Chanana, P. & Jhamb, S. Biomarkers in triple negative breast cancer: A review. *World J. Clin. Oncol.* **6,** 252–263 (2015).
5. Mersin, H., Yildirim, E., Berberoglu, U. & Gülben, K. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast Edinb. Scotl.* **17,** 341–346 (2008).
6. Blows, F. M. *et al.* Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* **7,** e1000279 (2010).
7. Bianchini, G., Balko, J. M., Mayer, I. A., Sanders, M. E. & Gianni, L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* (2016). doi:10.1038/nrclinonc.2016.66
8. Abramson, V. G., Lehmann, B. D., Ballinger, T. J. & Pietenpol, J. A. Subtyping of triple-negative breast cancer: implications for therapy. *Cancer* **121,** 8–16 (2015).
9. Masuda, H. *et al.* Comparison of molecular subtype distribution in triple-negative inflammatory and non-inflammatory breast cancers. *Breast Cancer Res. BCR* **15,** R112 (2013).
10. Park, Y. H. *et al.* A seven-gene signature can predict distant recurrence in patients with triple-negative breast cancers who receive adjuvant chemotherapy following surgery. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **136,** 1976–1984 (2015).

11. Liu, Y.-X. *et al.* Attempt towards a novel classification of triple-negative breast cancer using immunohistochemical markers. *Oncol. Lett.* **12,** 1240–1256 (2016).
12. Nielsen, T. O. *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **10,** 5367–5374 (2004).
13. Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* **121,** 2750–2767 (2011).
14. Jézéquel, P. *et al.* Gene-expression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. *Breast Cancer Res. BCR* **17,** 43 (2015).
15. Burstein, M. D. *et al.* Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **21,** 1688–1698 (2015).
16. Demaria, S. *et al.* Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **7,** 3025–3030 (2001).
17. Denkert, C. *et al.* Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **28,** 105–113 (2010).
18. Stanton, S. E., Adams, S. & Disis, M. L. Variation in the Incidence and Magnitude of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Breast Cancer Subtypes: A Systematic Review. *JAMA Oncol.* (2016). doi:10.1001/jamaoncol.2016.1061
19. Matsumoto, H., Koo, S., Dent, R., Tan, P. H. & Iqbal, J. Role of inflammatory infiltrates in triple negative breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **68,** 506–510 (2015).
20. Savas, P. *et al.* Clinical relevance of host immunity in breast cancer: from TILs to the clinic. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13,** 228–241 (2016).

21. Ibrahim, E. M., Al-Foheidi, M. E., Al-Mansour, M. M. & Kazkaz, G. A. The prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. *Breast Cancer Res. Treat.* **148,** 467–476 (2014).
22. Liu, S. *et al.* CD8+ lymphocyte infiltration is an independent favorable prognostic indicator in basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **14,** R48 (2012).
23. Liu, F. *et al.* $CD8^+$ cytotoxic T cell and $FOXP3^+$ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res. Treat.* **130,** 645–655 (2011).
24. Mahmoud, S. M. A. *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **29,** 1949–1955 (2011).
25. Ali, H. R. *et al.* Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12,439 patients. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **25,** 1536–1543 (2014).
26. Chen, Z. *et al.* Intratumoral $CD8^+$ cytotoxic lymphocyte is a favorable prognostic marker in node-negative breast cancer. *PloS One* **9,** e95475 (2014).
27. deLeeuw, R. J., Kost, S. E., Kakal, J. A. & Nelson, B. H. The prognostic value of FoxP3+ tumor-infiltrating lymphocytes in cancer: a critical review of the literature. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **18,** 3022–3029 (2012).
28. Bates, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* **24,** 5373–5380 (2006).
29. Droeser, R. *et al.* Differential pattern and prognostic significance of CD4+, FOXP3+ and IL-17+ tumor infiltrating lymphocytes in ductal and lobular breast cancers. *BMC Cancer* **12,** 134 (2012).
30. Lee, S., Cho, E. Y., Park, Y. H., Ahn, J. S. & Im, Y.-H. Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer. *Acta Oncol. Stockh. Swed.* **52,** 73–81 (2013).
31. Miyashita, M. *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating CD8+ and FOXP3+ lymphocytes in residual tumors and alterations in these parameters after neoadjuvant

chemotherapy in triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. *Breast Cancer Res. BCR* **17,** 124 (2015).

32. Lanciotti, M. *et al.* The role of M1 and M2 macrophages in prostate cancer in relation to extracapsular tumor extension and biochemical recurrence after radical prostatectomy. *BioMed Res. Int.* **2014,** 486798 (2014).
33. Sica, A., Schioppa, T., Mantovani, A. & Allavena, P. Tumour-associated macrophages are a distinct M2 polarised population promoting tumour progression: potential targets of anti-cancer therapy. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990* **42,** 717–727 (2006).
34. Bingle, L., Brown, N. J. & Lewis, C. E. The role of tumour-associated macrophages in tumour progression: implications for new anticancer therapies. *J. Pathol.* **196,** 254–265 (2002).
35. Zsiros, E. & Odunsi, K. Tumor-associated macrophages: Co-conspirators and orchestrators of immune suppression in endometrial adenocarcinoma. *Gynecol. Oncol.* **135,** 173–175 (2014).
36. Pollard, J. W. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 71–78 (2004).
37. Gwak, J. M., Jang, M. H., Kim, D. I., Seo, A. N. & Park, S. Y. Prognostic value of tumor-associated macrophages according to histologic locations and hormone receptor status in breast cancer. *PloS One* **10,** e0125728 (2015).
38. Medrek, C., Pontén, F., Jirström, K. & Leandersson, K. The presence of tumor associated macrophages in tumor stroma as a prognostic marker for breast cancer patients. *BMC Cancer* **12,** 306 (2012).
39. Xuan, Q. *et al.* Tumor-associated macrophages are correlated with tamoxifen resistance in the postmenopausal breast cancer patients. *Pathol. Oncol. Res. POR* **20,** 619–624 (2014).
40. Campbell, M. J. *et al.* Proliferating macrophages associated with high grade, hormone receptor negative breast cancer and poor clinical outcome. *Breast Cancer Res. Treat.* **128,** 703–711 (2011).

41. Salgado, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. ESMO* **26,** 259–271 (2015).
42. Anestis, A., Karamouzis, M. V., Dalagiorgou, G. & Papavassiliou, A. G. Is androgen receptor targeting an emerging treatment strategy for triple negative breast cancer? *Cancer Treat. Rev.* **41,** 547–553 (2015).
43. Pietri, E. *et al.* Androgen receptor signaling pathways as a target for breast cancer treatment. *Endocr. Relat. Cancer* (2016). doi:10.1530/ERC-16-0190
44. Thakkar, A., Wang, B., Picon-Ruiz, M., Buchwald, P. & Ince, T. A. Vitamin D and androgen receptor-targeted therapy for triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **157,** 77–90 (2016).
45. Lehmann, B. D. *et al.* PIK3CA mutations in androgen receptor-positive triple negative breast cancer confer sensitivity to the combination of PI3K and androgen receptor inhibitors. *Breast Cancer Res. BCR* **16,** 406 (2014).
46. Al-Ejeh, F. *et al.* Treatment of triple-negative breast cancer using anti-EGFR-directed radioimmunotherapy combined with radiosensitizing chemotherapy and PARP inhibitor. *J. Nucl. Med. Off. Publ. Soc. Nucl. Med.* **54,** 913–921 (2013).
47. Brand, T. M. *et al.* Nuclear epidermal growth factor receptor is a functional molecular target in triple-negative breast cancer. *Mol. Cancer Ther.* **13,** 1356–1368 (2014).
48. Nabholtz, J. M. *et al.* Multicentric neoadjuvant pilot Phase II study of cetuximab combined with docetaxel in operable triple negative breast cancer. *Int. J. Cancer* **138,** 2274–2280 (2016).
49. Sohn, J. *et al.* cMET Activation and EGFR-Directed Therapy Resistance in Triple-Negative Breast Cancer. *J. Cancer* **5,** 745–753 (2014).
50. West, N. R. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes predict response to anthracycline-based chemotherapy in estrogen receptor-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. BCR* **13,** R126 (2011).

51. Ono, M. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with response to neoadjuvant chemotherapy in triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* **132,** 793–805 (2012).
52. Yamaguchi, R. *et al.* Tumor-infiltrating lymphocytes are important pathologic predictors for neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. *Hum. Pathol.* **43,** 1688–1694 (2012).

Académie d'Orléans – Tours
Université François-Rabelais

**Faculté de Médecine de TOURS**

**STACOFFE Marion**

38 pages – 7 tableaux – 10 figures – 3 images

**Résumé :**
**Introduction :** Les CSTN représentent 10 à 20% des cancers du sein et ont un pronostic défavorable. L'entité clinique, définie par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux et de HER2, est constituée d'un groupe hétérogène de tumeurs. Nous avons développé à Tours une classification immunohistochimique des CSTN à partir de la caractérisation moléculaire de cellules épithéliales malignes. Par ailleurs, une valeur pronostique du type d'infiltration leucocytaire du stroma a été suggérée. Nous avons étudié ces deux paramètres sur une cohorte de patientes traitées à visée curative pour CSTN au CHU de Tours.
**Objectifs :** L'objectif primaire était d'évaluer l'impact pronostique en termes de survie sans récidive et survie globale de la classification immunohistochimique des cellules épithéliales malignes. Les objectifs secondaires étaient de caractériser le type d'infiltrat immunologique intra-tumoral et stromal et d'évaluer le retentissement en univarié et multivarié sur la survie sans récidive et la survie globale.
**Patients et méthodes :** Il s'agissait d'une étude rétrospective monocentrique, portant sur 105 cas de CSTN, traités entre 2003 et 2013. L'analyse en immunohistochimie (IHC) sur « *Tissue Micro-Array* » (TMA) de l'expression du récepteur des androgènes (RA), des cytokératines 5 et 6 (CK5-6) et du récepteur à l' *epidermal growth factor* (EGFR) a permis de distinguer 4 sous-types de CSTN : 1/ groupe RA positif ; 2/ groupe « *basal-like* » ; 3/ groupe « phénotype triple négatif » ; 4 /groupe « mixte ». L'infiltration lymphocytaire totale a été quantifiée pour chaque tumeur sur lame HES (Hématoxyline-Eosine-Safran). L'analyse en IHC sur *TMA* a ensuite permis de quantifier les cellules exprimant CD4, CD8, FOXp3 (spécifique des lymphocytes T régulateurs) et CD163 (spécifique des macrophages M2). Ces données ont été corrélées aux caractéristiques cliniques et anatomopathologiques standards. Les durées de survie ont été calculées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées par le test du Log Rank pour l'analyse univariée et par un modèle de Cox pour l'analyse multivariée.
**Résultats :** 105 patientes consécutives ont été étudiées avec un suivi médian de 56.3 mois [6-155]. L'âge médian était de 54 ans [29-80]. 57,1% des tumeurs étaient classées pT1, 39% pT2, 1,9% pT3, et 1,9% pT4. Il existait dans 41,9% des cas un envahissement ganglionnaire. 100% des patientes ont reçu de la chimiothérapie adjuvante. 18 récidives métastatiques ont été constatées. 17 patientes sont décédées. 12 patientes ont été classées dans le groupe « RA positif », 35 dans le groupe « basal-like », 45 dans le groupe « phénotype triple négatif » et 13 dans le groupe « mixte ». Le pronostic de ces 4 sous-types était similaire en termes de SSR (p=0,98) et de SG (p=0,86). Dans l'analyse univariée, les facteurs de pronostic favorable identifiés en termes de SSR étaient : la taille tumorale pT1, l'absence d'envahissement ganglionnaire, l'absence d'embole tumoral, et un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8. Les facteurs de pronostic favorable identifiés en termes de SG étaient : la taille tumorale pT1, l'absence d'embole tumoral, et un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8 et FOXp3. Dans l'analyse multivariée, en termes de SG, il existait une tendance positive en faveur d'un nombre élevé de cellules intra-tumorales exprimant CD8. Il n'a pas été retrouvé d'impact pronostique sur la survie des macrophages M2.
**Conclusion** : La classification en 4 sous-types IHC des CSTN ne semble pas avoir d'impact sur le pronostic en SSR et en SG. Cependant, il se distingue des facteurs pronostiques anatomopathologiques, et il semble exister un impact de certains infiltrats lymphoïdes. Le nombre d'événements étant limité, un recul plus important est nécessaire, pour obtenir des résultats plus matures.

**Mots clés :** cancer du sein triple négatif, classification IHC, récepteur androgène, basal-like, TILs, CD8, FOXp3, SSR, SG.

**Jury** :

| | |
|---|---|
| Président : | Monsieur le Professeur Claude Linassier |
| Membres : | Monsieur le Professeur Gilles Body |
| | Madame le Professeur Isabelle Barillot |
| | Madame le Professeur Gaëlle Fromont-Hankard |
| | Madame le Docteur Flavie Arbion |
| | Madame le Docteur Hélène Vegas |

**Date de la soutenance** : 23 septembre 2016