Remerciement

En tout premier lieu, je remercie le bon Dieu, tout puissant, de nous avoir donné la force pour survivre, ainsi que l'audace pour dépasser toutes les difficultés.

La première personne que nous tenons à remercier est notre promotrice **Professeur Amel KOUCHKAR**, pour l'orientation, la confiance, la patience qui a constitué un apport considérable sans lequel ce travail n'aurait pas pu être mené au bon port.

Nos remerciements s'étendent également à notre Co promotrice Professeur **Karine BENACHOUR OUMOUNA**, qui nous a fait confiance de diriger ce travail. Sa gentillesse, sa modestie, sa riche expérience, le chemin fut long et difficile mais votre présence à notre cotés a rendu les choses bien plus douces.
Merci aux notre présidents de jury, Professeur **Mustapha OUMOUNA** qui nous a ouvrir les portes, nous a orienté, aidé et conseillé. Sa rigueur scientifique, sa disponibilité et ses qualités humaines ont profondément touchée.

Sans oublier Professeur **BOULAARES**, qui nous a donnés la change de travailler avec un anticorps, nous vous remercions infiniment pour votre collaboration.

Merci à notre examinateur, **M. Riadh NASRI** pour nous avoir acceptés de juger ce travail, merci pour vos remarques et commentaires et pour l'échange constructif que nous avons eu lors de notre soutenance.

Enfin, nous tenons à remercier l'ensemble de personnelles scientifiques de CPMC, docteur **Narjes Ghrib**, Docteur **Hammidatou** et **Jazira** pour sa présence dans les moments difficiles, grâce à elle nous avons passées d'excellents moments au CPMC.

Dédicace

Je dédie ce mémoire à :

Ma mère, À cet source de tendresse, de patience et de générosité, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils , qui peut être fierté et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutient permanent venu de toi.

Mon père, À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre …

Autant de phrases et d'expressions aussi éloquentes soit-elles ne sauraient exprimer ma gratitude et ma reconnaissance. Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir. que Dieu le tout puissant te préserve, t'accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et te protège de tout mal.

A ma soeur, ma plus grande source de bonheur, j'espère que la vie lui réserve le meilleur et je lui souhaite un prompt rétablissement.

Mes frères et sœurs qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.

A mes collègues Nada Karima, Radhia , pour toute l'affection qu'ils m'ont donnée et pour leurs précieux encouragements.et grâce à elles nous avons passés des très bonnes moments

A toute mes amies de la promotion 2016/2017 a fierté d'un savoir bien acquis.

Amira

Dédicace

À mon cher père, a celui qui m'a aidé à découvrir le savoir, merci d'avoir été toujours là pour moi, un grand soutien tout au long de mes études. Tu as été et tu seras toujours un exemple à suivre pour tes qualités humaines, ta persévérance et ton perfectionnisme.

À ma chère mère, a la plus douce et la plus merveilleuse de toutes les mamans. A une personne qui m'a tout donné sans compter. Tes prières ont été pour moi un grand soutien tout au long de mes études. J'espère que tu trouveras dans ce modeste travail un témoignage de ma gratitude, ma profonde affection et mon profond respect

A ma chère sœur **Ghada**, a la fleur de ma vie. Aucune dédicace, aussi expressive qu'elle soit, ne saurait exprimer la profondeur de mes sentiments et l'estime que j'ai pour toi.

A mes chers frères, je ne pourrais d'aucune manière exprimer ma profonde affection et mon immense gratitude pour vos aides et vos générosités extrêmes qui ont été pour moi une source de courage, de confiance et de patience.

A mes chères amies **Amira** et **Rekia**, un grand merci pour vos soutiens, vos encouragements, vos aides. Vous êtes les meilleures amies du monde.

Ma belle amie **Karima,** en souvenir des moments merveilleux que nous avons passés et aux liens solides qui nous unissent. Avec toute mon affection et estime, je vous souhaite beaucoup de réussite et de bonheur, autant dans votre vie professionnelle que privée.

A ma cousine adorable **Hassina**, je vous dédie cette thèse tout en vous souhaitant une longue vie pleine de réussite, de santé et de bonheur ...

A tous mes amies **Halima, Manel, Amina et Assia**, Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

Je tiens à exprimer mes profondes excuse a toutes celles et ceux que je n'aurais pas cités, par manque de clairvoyance (parfois) et de mémoire (souvent).

Nada

Nº	Titre de Figures	Page
1	Anatomie externe et interne du sein	4
2	Anatomie de la partie glandulaire du sein	4
3	Histologie du sein	5
4	Cellules myoépithéliale	6
5	Les différents types cellulaires dans un parenchyme mammaire	7
6	Incidence de cancer du sein dans le monde en 2016	9
7	Classification des cancers par l'incidence en Algérie	9
8	Classification moléculaire du cancer du sein triple négatif	21
9	La relation entre l'inflammation et cancer	22
10	La tumeur ; un organe complexe, un organe à part entière et non un amas déstructuré de cellules	23
11	Comparaison de l'expression de les différents types cellulaires chez L'homme	27
12	PD-1 et ses ligands	28
13	Les mécanismes d'expressions de PD-l1intra-tumorale	29
14	La signalisation moléculaire de la voie PD-1	31
15	L'immunothérapie des cancers par les anticorps anti-PD-1 et anti PD-L1	33

16	Méthode d'évaluation de l'infiltrat inflammatoire sur des lames HE, représentant les zones du stroma qui doivent être évalués.	36
17	Photo de l'automate benchmark Ultra.	37
18	Le principe de marquage de PDL-1 par la technique IHC	39
19	Marquage du témoin Positive avec PDL-1	40
20	Infiltrat inflammatoire faible < 10 % (HE GRX10)	44
21	Infiltrat inflammatoire faible de 1 % (HE GRX 40)	45
22	Infiltrat inflammatoire intense de 50 % (HE GRX10)	45
23	Infiltrat inflammatoire intense de 60 % (HE GRX40)	46
24	Infiltrat inflammatoire abondant de 60 %(HE GRX10)	46
25	Marquage membranaire intense de cellule tumoral (GRX20)	47
26	Marquage membranaire faible de cellule tumorale (GRX20)	48
27	Marquage négative de PDL1 –tumorale (GRX 20)	48
28	Marquage de cellules inflammatoires, IHC PDL1 (GRX 20)	49
29	Marquage faible des lymphocytes (GRX 20)	49
30	Marquage négatif PDL-1 sur les lymphocytes (GRX 20)	50

N°	*Titre de Tableaux*	*Page*
1	**Les gènes associés au développement du cancer du sein**	11
2	**Expression de PD-L1 par les différents sous-types moléculaire du CS**	32
3	**Méthode de lecture des lames HE**	37
4	**Caractéristiques de l'anticorps utilisé pour la détection**	40
5	**Caractéristiques histopronostiques des patientes**	43
6	**Résultat de la lecture de lames HE**	44
7	**Les résultats d'ihc.PDL-1 résultat de la lecture de lames HE**	47
8	**La corrélation entre l'infiltrat inflammatoire et les facteurs histopronostiques**	51
9	**La corrélation entre l'expression de PDL-1 et les facteurs histopronostiques**	52
10	**L'expression de PDL-1 ^{t} et PDL-1 ^{l} avec l'infiltrat inflammatoire**	53
11	**La répartition des cas en groupes selon l'infiltrat et l'expression de PDL-1**	54

ملخص

لا يوجد حاليا علاج فعال لسرطان الثدي السلبي الثلاثي ،لذلك استوجب توجيه العلاج الى أساليب حديثة مثل العلاج المناعي من أجل تشخيص أفضل . تعتبر الأجسام المضادة PDL- 1 علاج فعال لأنواع مختلفة من السرطانات من بينها سرطان الثدي السلبي الثلاثي . تهدف هذه الدراسة الى تقييم تعبيرالبروتيني PDL-1 النسخة E1L3N. هذه الدراسة ترتكز على 8 حالات ، تعاني هذه الحالات من سرطان السلبي الثلاثي . لقد قنا بدراسة نسيجية تهدف الي تقييم الارتشاح الالتهابي . بعد ذلك أجرينا دراسة كيميائية نسيجية بإستعمال الاجسام المضادة PDL-1. ثم درسنا العلاقة بين التعبير البروتيني PD-L1 و الارتشاح الالتهابي مع العوامل التنبؤية .فالأخير عالجنا العلاقة بين الارتشاح الالتهابي مع التعبير البروتيني PDL-1. توضح النتائج التي تحصلنا عليها وسم غشائي ضعيف و مختلف على الخلايا السرطانية و المناعية ،أوضحت نتائج دراسة العلاقة بين الارتشاح الالتهابي و العوامل التنبئية أنه يوجد علاقة قوية بين الارتشاح والسن و الصنف سكارف وبلوم وريتشارد (SBR) .أما بالنسبة لدراسة العلاقة بين التعبير البروتيني PDL-1 و العوامل التنبؤية فانها علاقة سلبية مع السن و لا توجد أي علاقة مع حجم الورم .آخيرا صنفنا الحالات المرضية الى ثلاث مجموعات حسب الارتشاح الاتهابي و التعبير البروتيني PDL-1.

الكلمات المفتاحية: الثلاثي السلبي ،دراسة نسيجية كيميائية ، PDL-1 النسخة E1L3N ،الارتشاح الالتهابي ،العلاج المناعي .

Abstract

Triple-negative breast cancer current management is providing no efficient therapeutic agent whatsoever. New therapy tools have to be developed; e.g. immunotherapy, to enhance breast cancer treatment. Programmed death-ligand 1 (PD-L1) protein has been proven to have therapeutic potential in various types of cancer, especially breast cancer. The purpose behind this study is to evaluate PD-L1(E1L3N) expression, a PD-L1 clone, in triple-negative breast cancer cases. 8 triple-negative breast cancer patients were interested in our study. The main tasks were to carry out an immunohistochemical substudy with regard to assess inflamed infiltration, and a histopathologic evaluation thereafter using the E1L3N clone. A link between PD-L1 expressions, infiltrate, and was established. PD-L1 marking association with inflammatory infiltrate has been examined as well.Results have shown a weak and heterogeneous membrane marking within tumor and immune cells. Inflammatory infiltrate and histopronostic factors linkage demonstrates a strong correlation with age and Scarff-Bloom-Richardson (SBR) grading, while linkage between PD-L1 and the fore-mentioned factors shows weak correlation with age and body size. There was a trial to rearrange studied cases into classes and to propose a treatment for each class by relying on PD-L1 expression and inflammatory infiltrate.

Keywords: Triple-negative cancer, immunohistochemistry, PD-L1 (E1L3N), inflammatory infiltrate, immunotherapy.

Résumé

Actuellement la prise en charge du cancer du sein triple négatif n'inclue aucun agent thérapeutique efficace. De nouvelles armes thérapeutiques doivent être développées tel que l'immunothérapie pour une meilleure prise en charge. PD-L1 présente un potentiel thérapeutique dans de nombreux types de cancers, notamment le cancer du sein. La présente étude vise à évaluer l'expression de PD-L1 (E1L3N) dans le cancer du sein triple négatif. Nous étude est basées sur 8 patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif. Nous avons réalisées une étude histopathologique afin d'évaluer l'infiltrat inflammatoire, par la suite une étude immunohistochimie a été réaliser à l'aide du clone E1L3N.Aprés Nous avons étudiées la corrélation de l'expression de PD-L1 et de l'infiltrat avec les facteurs histopronostiques. Nous avons associées le marquage de PD-L1 avec l'infiltrat inflammatoire. Nos résultats montrent un marquage membranaire faible et hétérogène sur les cellules tumorales et immunitaires. Les résultats de la corrélation de l'infiltrat inflammatoire avec les facteurs histopronostiques indiquent qu'il y a une forte corrélation avec l'âge et le grade SBR. Alors que l'étude de la corrélation de l'expression de PDL-1 avec ces facteurs montrent qu'il existe une corrélation négative avec l'âge et aucune corrélation avec le grade. Nous avons essayées de regrouper les cas en classes pour lesquels nous proposons un traitement pour chaque classe en se basant sur l'expression de PDL-1 et l'infiltrat inflammatoire.

Mots clés : triple négatif, immunohistochimie, PD-L1 (E1L3N), infiltrat inflammatoire, immunothérapie.

Abréviations

A :

- **AKT :** protéine kinase B
- **ADSCs** : pré adipocytes et les cellules souches dérivées du tissu adipeux
- **ATM:** Ataxia telangiectasia mutated.

B:

- **BRCA1**: Breast Cancer 1.
- **BRCA2**: Breast Cancer2.
- **BCL-xL**: B-cell lymphoma-extra-large.

C :

- **CAA :** Les adipocytes associées au cancer.
- **CCI :** carcinome cannalaire in situ.
- **CSTN :** cancer du sein triple négatif.
- **CHEK2:** checkpoint kinase 2.
- **CCL-2:** Chemokine ligand 2.
- **CXCL-1**: chemokine (C-X-C motif) ligand.
- **CCL5**: Chemokine (C-C motif) ligand 1.
- **CXCL12**: C-X-C motif chemokine 12**.**
- **CLTA-4**: cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4.
- **CK5/6:** cytokératines5/6.

E:

- **ER:** estrogen receptor.
- **EGFR**: Epidermal Growth Factor.

F:

- **FOX01**: Forkhead box protein O1.
- **FAC :** Fibroblastes associés au cancer.

H :

- **HER2:** Human epidermal growth factor receptor 2.
- **HGF:** Human Growth Foundation.
- **H&E:** l'hématoxyline et à l'éosine .

I :

- **IL6** : interleukine 6.
- **INFγ** : Interféron gamma.
- **IFNα** : interféron alpha.
- **IHC** : immunohistochimie.
- **IL10 :** interleukine.

J :

- **JAK2**:Janus kinase 2 .

M :

- **M TOR**: mechanistic target of rapamycin.
- **MMP** (Matrix MetalloProteinase)-2.
- **MMP-7** : matrice métalloprotéase.
- **MMP-12** : Matrix metalloproteinase-12**.**
- **MEC :** matrice extracellulaires.
- **MAPK** : mitogen-activatedprotein kinase.
- **MC** : Mastectomie
- **TM** : Tumorectomie

N :

- **N+** : envahissement ganglionnaire positif
- **N-** : envahissement ganglionnaire négatif

O :

- **OMS** : organisation mondial de santé.

P :

- **P53**: protein 53.

- **PDGF:** Platelet-DerivedGrowth Factor.
- **PD1**: Program death-1.
- **PDL-1**: Program death ligand1.
- **PDL2:** Program Death Ligand 2.
- **PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog.
- **PI3K**: phosphatidylinositol-3-phosphate .
- **PDL-1^{t}** :PDL1 tumoral.
- **PDL-1^{L}** : PDL-1 lymphocytaire.

S:

- **SDF-1**: stromal cell-derived factor 1.
- **TAMs :** Macrophages associés aux tumeurs.
- **TGFβ** :Transforming Growth Factor.
- **TADCs** : Les cellules dendritiques associées au cancer.
- **TILs** : Les lymphocytes T associées au cancer.
- **T_{reg}** : lymphocytes régulateurs.
- **TH_{17}** : lymphocytes T auxiliaire.
- **TP53** :tumor protein 53.

V :

- **VEGF**: Vascular Endothelium Growth Factor.

Sommaire

Remerciement

Dédicace

Résumé en Arabe

Résumé en français

Résumé en Anglais

Liste des tableaux

Listes des figures

Abréviations

Sommaire

Introduction **1**

Données bibliographiques **3**

I. le sein de la physiologie à la cancérogenèse **4**

1. Anatomie **4**

2. Histologie **5**

II. Cancer du sein **8**

1. Définition **8**

2. Epidémiologie **9**

3. Facteurs de risques **12**

4. Classification histopathologique selon l'OMS **15**

5. Les facteurs histopronostiques **16**

6. Classification moléculaire **18**

III. Triple négatif **20**

1. Classification des CSTN **20**

2. Inflammation et cancer du sein TN **22**

3. le microenvironnement tumoral dans le cancer du sein **23**

4. le rôle des cellules stromales dans la carcinogenèse mammaire **23**

IV. l'échappement tumoral et la voie PD-1 **26**

1. Echappement tumorale **26**

2. **La voie PD-1** **30**

V. Triple négatif et immunotherapie anti-PD1 **31**

VI. Essais cliniques en cours évaluant les immunomodulateurs pour le cancer du sein TN **33**

Matériel et Méthodes

Démarches expérimentales **36**

1. **Matériels biologiques** **36**
2. **Méthodes** **36**
   - **Etude histopathologique** **37**
   - **la lecture des lames HE** **37**
   - **La technique d'immunohistochimie** **37**
   - **La lecture des lames IHC** **40**
   - **Témoin Positif** **40**
   - **Les critères de positivité de l'infiltrat inflammatoire et de l'expression de PD-L1** **41**
   - **Etude statistique** **41**

Résultat

I. caractéristiques des patients **42**
II. Evaluation de l'infiltrat inflammatoire sur les lames HE **44**
III. Evaluation de l'expression de PDL-1 **47**
IV. La corrélation entre l'infiltrat et les facteurs histopronosiques **51**
V. La corrélation entre l'expression de PDL-1 et les facteurs histopronosiques **52**
VI. L'expression de PDL-1 et TILs **53**

Discussion **55**

Conclusion **61**

Références bibliographiques

Annexes

INTRODUCTION

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

MATERIELS & METHODES

RESULTATS

DISCUSSION DES RESULTATS

CONCLUSION

ANNEXES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Le cancer du sein Triple négatif, représente un sous type de cancer du sein, il est défini par l'absence de l'expression du récepteur d'estrogène(ER), de progestérone (PR) ainsi de celui du facteur de croissance humain 2(HER2). Les TN sont généralement des tumeurs agressives avec un taux élevé de métastases à distance et une survie plus faible comparée aux autres sous-types de cancer du sein, et qui ne bénéficient pas en pratique clinique actuel de thérapeutique ciblée (Stagg & Allard 2013),il représente environ 15 % des cancers du sein infiltrants d'après les statistiques de CPMC en 2015 (GHERIB N et al, 2015).

Le seul moyen de lutter contre ce type de cancer est la chimiothérapie classique. Bien que globalement sensibles à la chimiothérapie, ces tumeurs sont hétérogènes d'un point de vue clinique et biologique, et certaines restent de très mauvais pronostic (Bianchini et al, 2016).

Aujourd'hui, l'immunothérapie suscite de nouveaux espoirs et des essais cliniques prometteurs ont permis d'obtenir des résultats très encourageants dans les cancers du poumon et le mélanome (Ohaegbulam et al. 2015). Elle pourrait représenter une piste thérapeutique intéressantes dans le traitement de cancer du sein TN (Migali et al, 2016).

Les molécules aujourd'hui utilisées sont dirigées contre PDL1 ou PD1, récepteurs et cibles des checkpoints immunitaires et leur efficacité pourrait être dans certains cas corrélée au niveau d'expression de ces protéines. Mais l'expression de PD-L1 dans les tumeurs n'est pas un biomarqueurs de predicition aproppríé pour la selection des patients qui peuvent bènéficier des anticorps anti-PD-1 Ou PD-L1. Une étude a pu demontrée que 10 % des patientes qui sont PD-L1 négative répondent bien au traitement anti PD-L1(García-Teijido et al, 2016).

Comme le cancer du sein TN est immunogène , le système immunitaire joue un rôle primordiale dans la progression tumorale, des études récentes ont permit d'integrer les lymphocytes associés au cancer (TILs) comme un biomarqueur primaire pour predire la réponse des patientes à l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 (García-Teijido et al, 2016) .

Notre travail a pour objectif de mettre au point un protocole immunohistochimique pour l'anticorps anti PDL-1 (clone E1L3N). D'évaluer grâce à une étude histopathologique l'infiltrat inflammatoire, puis d'étudier la corrélation entre les différents facteurs histopronostiques, avec le taux de l'infiltrat inflammatoire et l'expression de PDL-1 .
Enfin on a associer l'expression de PD-L1 avec l'infitrat inflammatoire afin de les regrouper en differentes classes .

La présente étude s'articule sur les buts suivants :

- ✓ Evaluation de l'infiltrat inflammatoire.
- ✓ La mise au point du protocole d'immunohistochimie (PDL-1 E1L3N).
- ✓ Etudier l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales et lymphocytaires .
- ✓ Etudier la correlation entre les facteurs histopronostiques avec l'expression de PDL-1 et L'infiltrat inflammatoire .
- ✓ Proposer une eventuelle immunothérapie en se basant sur l'infiltrat inflammatoire et le marquage de PDL1.

Le sein de la physiologie à la cancérogenèse

Le sein ou la glande mammaire est une glande sudoripare modifiée, adaptée à la production du lait (Tortora & Derrickson 2014). Trois caractéristiques importantes distinguent le sein des autres organes. Premièrement, le sein est un support nutritionnel d'un autre individu : le nourrisson, deuxièmement ; il subit des changements périodiques durant l'âge adulte particulièrement durant la grossesse, finalement, c'est un organe visible par conséquent ; il se distingue des autres organes par une signification personnelle, culturelle et sociale. Tous ces paramètres jouent un rôle important dans l'origine , la présentation et le traitement de cancer du sein (Robbins et al. 2010).

1. Anatomie

Le sein occupe la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux (Garaka Rabel 2009). Verticalement, il est en regard de l'espace compris entre la deuxième et la sixième cote et au niveau de la sixième ou septième nervure alors que transversalement ; du bord du sternum jusqu'à la ligne medio-auxiliaire (Schnitt & Collins 2015).

Les seins existent chez les deux sexes mais ils sont fonctionnels uniquement chez la femme dans les conditions physiologiques, ils font partie du système tégumentaire. Ils sont composés de deux ensembles de pièces, l'externe et interne, l'externe comprenne le mamelon, l'aréole, les tubercules et certaines glandes et l'interne comprenne le parenchyme mammaire (Figure 1) (Marieb & Hoehn 2013).

Un système nerveux autonome contrôle les fibres Musculaires lisses de l'aréole et de mamelon lors d'une stimulation mécanique, sexuelle ou le froid …(Marieb & Hoehn 2013) .

Dans la pièce interne, chaque glande comporte de 10 à 25 lobes glandulaires qui sont entourés par un tissus adipeux, il est principalement ce tissu superficiel qui donne la forme du sein. Chaque lobe possède un seul conduit galactophore qui s'ouvre de façon indépendante à la surface du mamelon.

Un lobe c'est l'arrangement des petites unités appelées lobules, qui contiennent Les alvéoles(les acini) glandulaires qui produisent le lait.

Lorsque le lait est produit, il passe de l'alvéole dans une série de canaux galactophores. Près du mamelon, le conduit mammaire s'élargit légèrement pour former un sinus appelé sinus lactifères où le lait s'accumule, afin d'être excrété à l'extérieur du mamelon (Figure 2) (Tortora & Derrickson 2014).

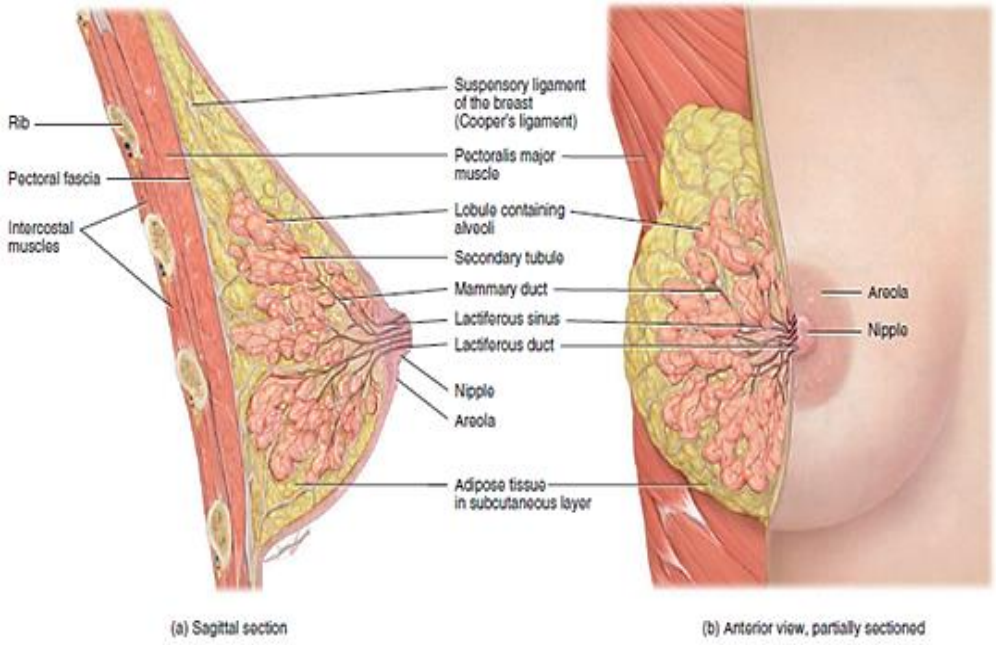


Figure 1 : anatomie externe et interne du sein(Richardson, 2014).

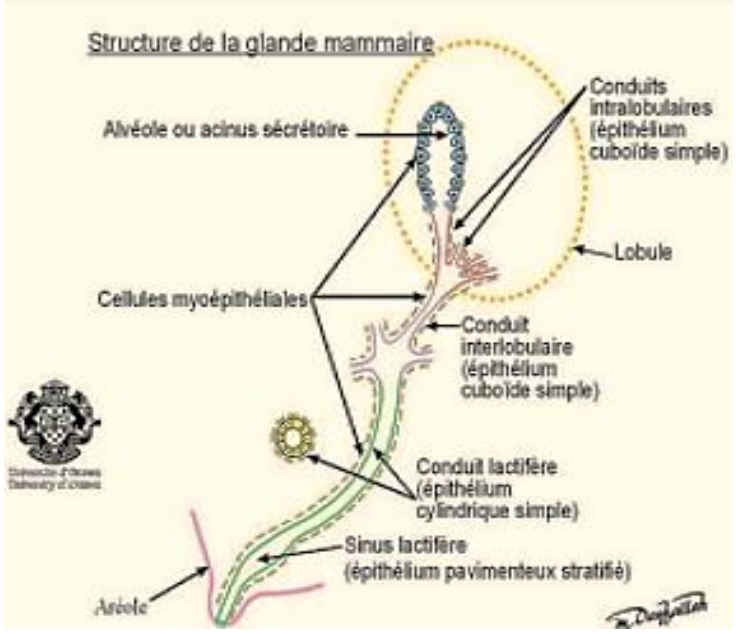


Figure 2 : Anatomie de la partie glandulaire du sein (Safaa El Bialy , 2015).

2. Histologie

La glande mammaire d'une femme adulte consiste en une série de canaux qui se terminent par un acinus (un alvéole) ; un nombre d'acini forme un lobule ; l'arrangement de ces structures a été comparé à un arbre à fleurs, les lobules représentent les fleurs alors que les conduits et les canaux représentent les branches et les rameaux, ces conduits s'organisent pour former des canaux collecteurs (le tronc) qui s'ouvrent à la surface du mamelon. (figure 3) (Schnitt & Collins 2015).

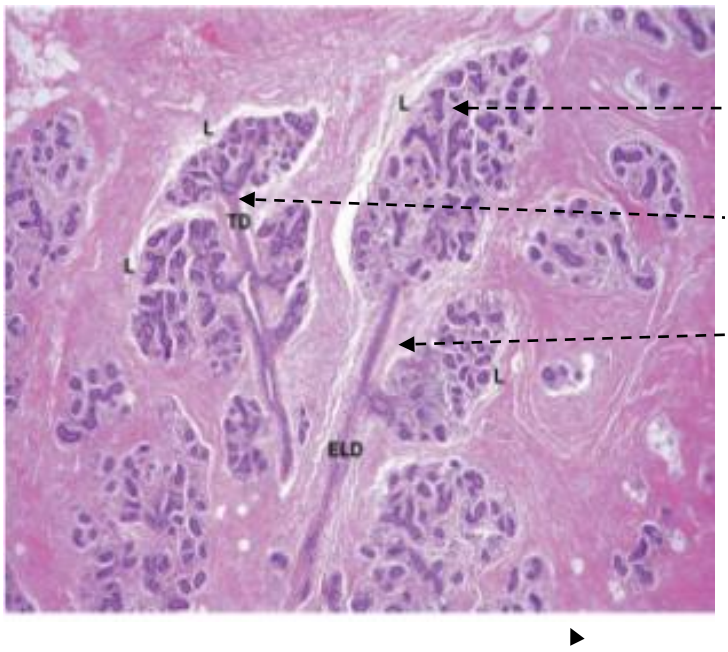


Figure 3: Histologie du sein

(Schnitt & Collins 2015)

Le tégument mammaire comporte :

- **le mamelon** ; il représente une papille tégumentaire complexe dépourvue de poils ; pigmenté avec un épithélium malpighien. (Coujard et al. 1980). Près du mamelon ; les canaux galactophores se dilatent pour former un sinus lactifère, sous forme d'ampoule fusiforme. Il se répandre du derme vers la surface de la peau. (Young et al. 2013).
- **L'aréole** : une zone pigmentée recouverte par un tégument bosselé (tubercule de Morgagni) à cause de la présence des grosses glandes sébacées (les glandes de Montgomery) qui produisent le sébum qui diminue les crevasses ou les fissures du mamelon (Coujard et al. 1980).

- En se prolongeant dans le parenchyme mammaire, l'épithélium vari selon la localisation : dans les canaux galactophores de gros calibre, l'épithélium est moins stratifié cuboïde. Alors que dans les canaux de petit calibre ; l'épithélium est cuboïde simple (Garaka Rabel ,2009).
- **L'épithélium alvéolaire** (glandulaire) est cuboïde simple pendant le repos ; avec des cellules à un noyau central ovalaire et un cytoplasme relativement peu abondant et pendant la sécrétion ces cellules deviennent haute avec un cytoplasme plus abondant, ces cellules sont le point de départ de la très grande majorité des carcinomes mammaires. Dans au moins 98% des cas, le cancer du sein est un adénocarcinome développé à partir de l'épithélium glandulaire (Sanae et al , 2009).
- l'épithélium est entouré par une couche discontinue de **cellules myoépithéliales** ; elles sont situées entre les cellules épithéliales et la membrane basale (Sanae et al, 2009). Une fois ces cellule se contracte, Elles aident à transporter le lait; de l'alvéole à l'extérieur de la glande (Garaka Rabel 2009); elles participent à la production de la lame basale avec les cellules épithéliales et l'apparition des espaces intercellulaires pour un meilleur échange entre l'épithélium et le stroma. (Figure 4) (Sanae et al , 2009).

-

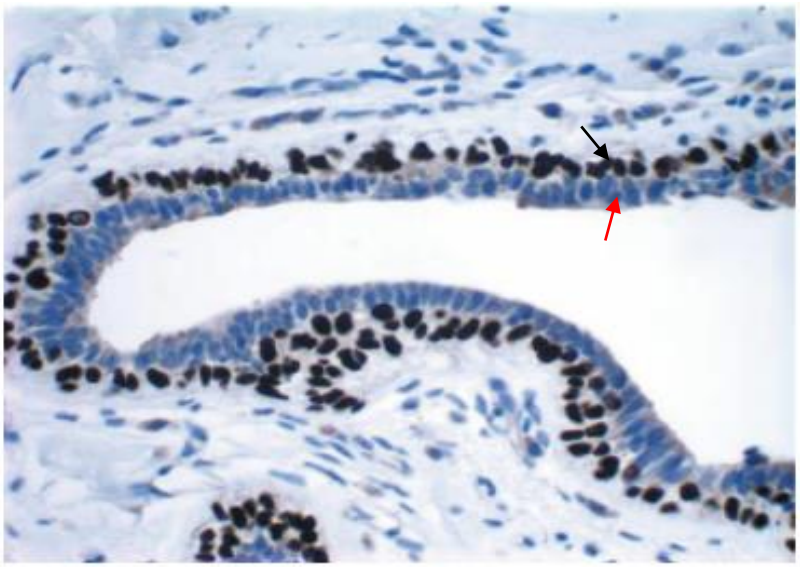


Figure 4: cellules myoépithéliales (Schnitt & Collins, 2015)

Fleche rouge : cellule épithéliale /

Fleche noire : cellule myoépithéliale

- Un troisième type cellulaire se disposent irrégulièrement tout au long les canaux et les acini ; ce sont **les cellules progénetrices** qui peuvent se différencier à des cellules

épithéliales ou à des cellules myoépithéliales; ce sont des cellules souches (Schnitt & Collins , 2015).

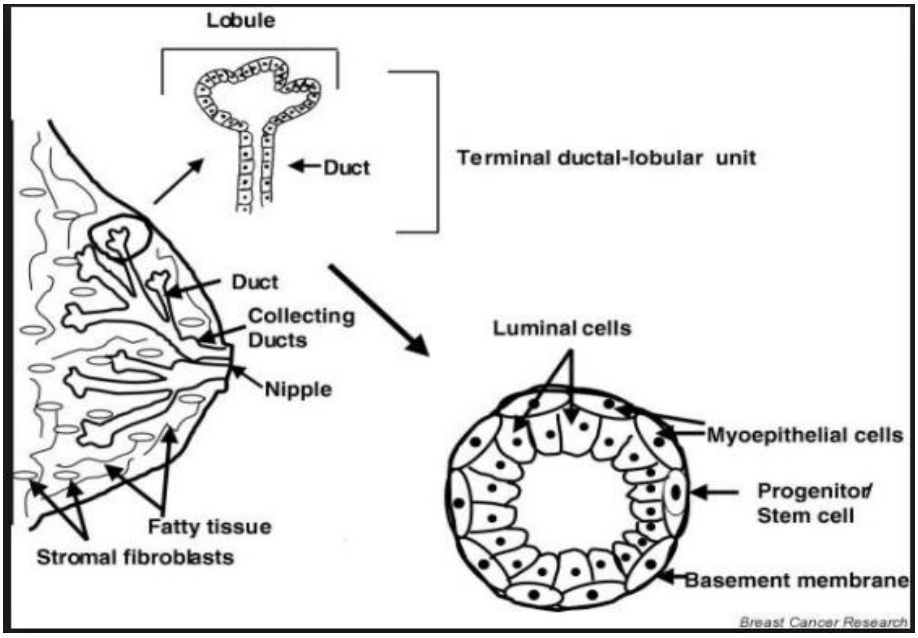


Figure 5: les différents types cellulaires dans un parenchyme Mammaire (Dimri G, Band H, 2005).

- **L'unité terminal ducto-lobulaire** : c'est l'unité fonctionnelle et histopathologique du sein, qui englobe un petit segment d'un canal terminal et un groupe des ductules et un lobule .La majorité des tumeurs bénignes ou malignes commencent à proximité de cette région comme le carcinome canalaire in situ et invasif … (figure 6) (Al ,2009).
- **La lame basale** : c'est une structure membranaire qui protège l'épithélium (CHAHBOUNI SANAE ,2009), formée de collagène de type IV et la laminine qui entourent les conduits mammaires et les acini, elle se trouve à l'extérieur de la couche myoépithéliale ; elle marque l'unité sécrétoire du reste de stroma (Schnitt & Collins 2015) ;elle filtre les composants solubles de l'environnement stromal (Sanae et al. 2009).
- L'acinus mammaire est entouré par **un stroma intra lobulaire**, tissus conjonctif lâche avec un nombre de lymphocytes, plasmocytes, macrophages et des mastocytes. Il existe aussi un stroma **inter-lobulaire** (entre les lobules) qui représente un tissu conjonctif dense, riche en collagène mixé a un stroma de tissus adipeux (Schnitt & Collins ,2015).

II. Cancer du sein

1. Définition

Le cancer du sein commence lorsque les cellules se devisent d'une façon incontrôlée pour former une tumeur *;* la tumeur grossit et envahit le reste du parenchyme ou elle tend à échapper de site d'origine pour former des tumeurs secondaires (métastase) dans autres organes : c'est ce qu'on appelle une tumeur maligne ou le cancer (*What Is Cancer? - National Breast Cancer Foundation* 2016)

Les cancers du sein peuvent commencer à partir de différentes parties du sein. La plupart des cancers du sein commencent dans les conduits qui transportent le lait au mamelon (cancers canalaires). Certains commencent dans les glandes qui produisent le lait maternel (cancers lobulaires). Il y a aussi d'autres types de cancer du sein qui sont moins fréquents (Schnitt & Collins 2015).

2. Epidémiologie

Tous les registres du cancer dans le monde ont notés une augmentation de l'incidence du cancer du sein au cours de ces 20 dernières années. En 2012, le nombre de cas estimé est plus de 1 671 149 nouveaux cas de femmes avec 521,907 cas de décès. (Figure 6) (Mahshid Ghoncheh et al. 2016).

En Algérie, ils ont notés que ce type de cancer est caractérisé par l'incidence le plus élevé par apport au autres types de cancer, en 2015, ils ont trouvés plus de 40000 nouveaux cas par ans et un taux de mortalité de 25000 cas par ans (Figure7) (Mahshid Ghoncheh et al. 2016) .

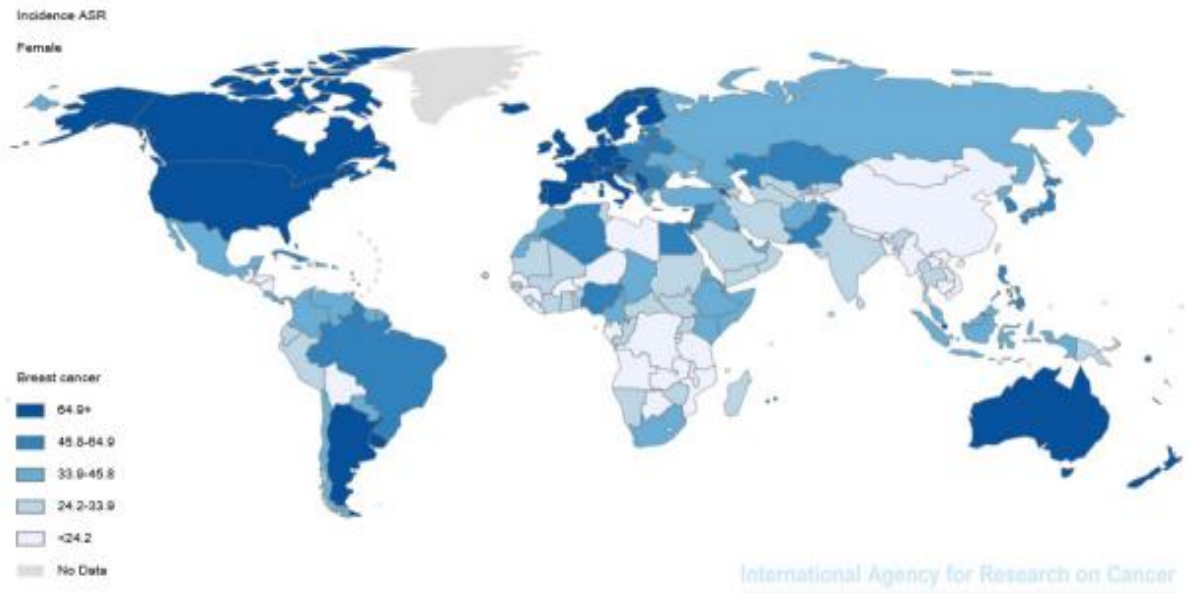


Figure 6 : Incidence de cancer du sein dans le monde en 2016 (Mahshid Ghoncheh et al, 2016).

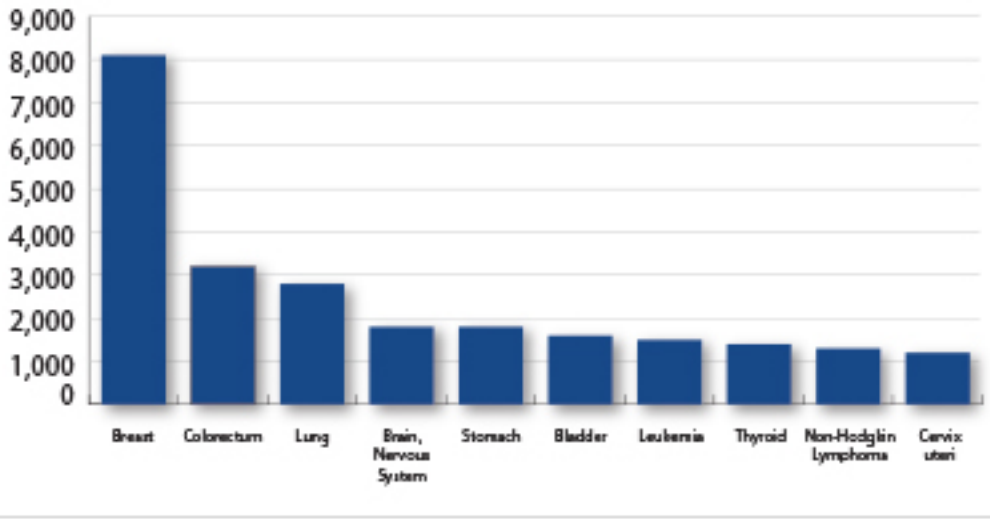


Figure 7 : Classification des cancers par l'incidence en Algérie (Chandrakanth Are, MBBS, MBA, FRCS 2015).

3. Facteurs de risques

Les causes de cancer du sein ne sont pas encore définies jusqu'aux jours-là, mais Il existe un lien entre le cancer du sein et une série de facteurs de risques qui sont démontrés de manière indiscutable (Puddu & Tafforeau ,2005).

On classe ces facteurs principalement en deux groupes : les facteurs de risques reproductifs et non –reproductifs (Kerr et al. 2016).

- **Les facteurs reproductifs**

- **Les hormones endogènes :** Comme le cancer est une maladie hormono-dépendante (Puddu & Tafforeau). Nombreuses études ont montrées l'implication de ces hormones dans le déclenchement de cancer du sein (Travis & Key 2003). Commençant par l'œstrogène, Trois phénomènes pendant la vie d'une femme influencent sur le risque d'un cancer de sein : une menarche précoce, la Multiparité et une ménopause tardive ,Tous ces phénomènes déterminent le nombre des cycles ovariens donc l'exposition au œstrogène : plus la femme est exposée au œstrogène ; plus le risque augmente.(Abeloff et al. 2008). L'allaitement pendant une durée totale d'au moins 25 mois diminue à 33 % le risque, par rapport à celles qui n'ont jamais allaité (Nkondjock & Ghadirian, 2005)

  Des études ont démontrées que les femmes diabétiques (type 2) , qui ont une résistance à l'insuline, ont un risque plus élevé a développées le cancer du sein pré-ménopausique ; ce risque est dû à l'hyper insulinémie qui a un effet anabolisant en stimulant la synthèse d'ADN et la prolifération cellulaire (DeCensi & Gennari, 2011).

  La progestérone naturelle protège contre le cancer du sein en stimulant la différentiation cellulaire (les cellules deviennent normales) et en inhibant la division cellulaire (cancer) (Lange & Yee, 2008).

  Il y a aussi une association positive entre le taux de testostérone dans le sang et le risque de cancer du sein, des concentrations plasmatiques élevées de testostérone libre tripleraient le risque de cancer du sein (Puddu & Tafforeau ,2005).

- **Les hormones Exogènes :** Le risque de cancer du sein est augmenté d'environ 25% chez les femmes utilisant les contraceptifs oraux. Cependant, cet accroissement de risque chute dès l'arrêt de la consommation, de sorte qu'après l'arrêt de l'utilisation, le risque disparu (Nkondjock & Ghadirian, 2005).

- **Les facteurs non-reproductifs**

- **L'obésité :** L'obésité augmente d'environ 50 % le risque du cancer du sein chez les femmes ménopausées, les femmes ayant un surpoids de plus de 20 kg à partir de l'âge de 18 ans, présentent un risque multiplié par deux après la ménopause. (Nkondjock &

Ghadirian ,2005). La sécrétion des œstrogènes est assurée essentiellement par le tissus adipeux, grâce à l'aromatisation des androgènes en estrogènes, donc des femmes obèses signifient un taux élevé d'œstrogène (Carmichael 2006).

- **Facteurs génétiques :** La prédisposition génétique représente un facteur de risque très important pour le développement de cancer du sein, ils ont estimés que 10 % des cancers du sein sont liés à des mutations génétiques. Parmi ces gènes ; le cancer du sein causés par des mutations en BRCA1, BRCA2 ou P53 qui représente 40 % des cas du cancer de sein héréditaire ; alors que 60 % des cas sont causés pas une mutation d'autres gènes. (Tableau 02) (Walavalkar et al. 2015)

Tableau 1 : les gènes associés au développement du cancer du sein (Walavalkar et al. 2015).

Gene	La localisation chromosomale	La fonction	Autre types de cancer associés
TP53	17q13.1	Régule l'expression des gènes antiprolifératifs C'est le gardien du génome, il induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose	Sarcome Tumeurs du système nerveux central
ATM	11q22q23	Impliqué dans la réparation de l'ADN	Syndrome lymphoproliferatif
CHEK2	22q12.1	Code pour une protéine thréonine serine kinase qui provoque l'arrêt de prolifération	Colorectale, prostate

- **Maladies bénignes** : parmi les facteurs de risque de cancer du sein ; Les maladies bénignes du sein .On distingue histologiquement deux groupes : les lésions prolifératives et les lésions non prolifératives avec ou sans atypie. Les lésions non prolifératives à un risque faible, Les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux, tandis que les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque d'au moins quatre fois (Nkondjock & Ghadirian ,2005).

- **Antécédents familiaux :** Il a été confirmé par nombreuses études que l'histoire familiale représente un facteur de risque pour le cancer du sein. (Puddu & Tafforeau 2005).Ils ont trouvés que, les femmes qui ont un parent du premier degré (mère, sœur, fille, frère et père) qui a eu un cancer du sein augmente le risque. Lorsque plusieurs membres de la famille ont eu un cancer du sein a un jeune âge, une prédisposition génétique doit être suspectée (Desantis et al. 2015)

- **Densité mammographique :** Les femmes ayant des seins denses en mammographie, le risque est multiplié de deux à six fois (Nkondjock & Ghadirian 2005). La partie dense vue sur une mammographie c'est un tissu fibreux ou collagèneux comme le ligament de Cooper ; tissu fibreux inter-lobulaire, le tissu fibreux intra lobulaire qui entoure la partie glandulaire, plus la densité mammaire est importante, plus on aura d'interaction entre les cellules épithéliale et stromales, cette interaction stimule la carcinogenèse (Maskarinec et al. 2010).

- **Radiations ionisantes :** D'après les recherches ; le sein est l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations. L'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes, avant l'âge de 40 ans, peut provoquer un cancer du sein dans les années ultérieures. Les radiations ionisantes augmentent le risque de cancer du sein dans la mesure où elles endommagent l'ADN et ses constituants. (Nkondjock & Ghadirian 2005).

- **Alcool :** Des nombreuses études ont démontrées que la consommation de l'alcool augmentera le risque du cancer du sein avec 7%, ce risque est en fonction de la Quantité d'alcool consommée.

  Des hypothèses ont étés formulées pour expliquer l'action de l'alcool :

L'alcool augmente le taux de l'œstrogène plasmatique soit par la stimulation de l'activation de l'aromatase, qui transforme l'androgène en œstrogène ou par l'inhibition du métabolisme des œstrogènes dans le foie, par conséquent l'accumulation du taux d'œstrogène dans le sang.

L'association de l'alcool avec le taux élevé d'œstrogène existe chez les femmes pré ménopausée et post ménopausée (Al-Sader et al. 2009).

4. Classification histopathologique selon l'OMS :

Le cancer du sein est classifié en fonction de plusieurs paramètres dont les plus importants c'est l'aspect histologique, la tumeur touche les conduits galactophores ou le lobule, elle a dépassée ou non la membrane basale.

Selon ces paramètres, on trouve deux types principaux :

Carcinome non invasif (in situ) et **Carcinome invasif** (Makki 2015)**.**

- **Carcinome non invasif (in situ)** : il représente jusqu'à 90% des cancer du sein , c'est une prolifération néoplasique des cellules qui restent confinées à l'intérieur des conduits galactophores ou des lobules, sans rupture de la lame basale (Sharma et al. 2010).

Ce type est subdivisé en deux groupes :

i. **Carcinome intra-canalaire non invasif (in situ) :** il représente environ 17 % du cancer du sein.(Sharma et al. 2010)

Il est principalement classé en :

-CCIS de type comédocarcinome : caractérisé par centre nécrotique avec un taux élevé de mitose et des noyaux pléomorphes

- CCIS de type non comédocarcinome : caractérisé par l'absence d'un centre nécrotique et des noyaux monomorphes, ce groupe contient plusieurs types (cribriforme , micro papillaire, papillaire et massif)(Bland 2011).

ii. **Carcinome lobulaire in situ**: il représente 2 ,5 % du carcinome mammaire, c'est un Carcinome intéressant les canalicules intra lobulaires qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives (Sharma et al. 2010) .

- **Carcinome invasif :** ce type de cancer englobe tous les tumeurs ou l'invasion stromal est détectée. (Russo 2016)

En fonction des paramètres architecturaux et cytologiques on trouve un carcinome invasif canalaire et autre lobulaire (Moinfar 2007)

i. **Carcinome invasif canalaire :** c'est un groupe de tumeurs hétérogènes ; qui représente le type le plus fréquent de cancer du sein invasif ; il compte de 70 à 75 % de tous les cas de cancer du sein invasifs. (Schnitt & Collins 2015). ces tumeurs commencent à partir des cellules épithéliales du système canalaire, elles traversent la membrane basale et envahissent le stroma et le tissu adipeux (Sharma et al. 2010).

ii. **Carcinome lobulaire infiltrant**: Carcinome infiltrant formé de cellules régulières ressemblant à celles du carcinome lobulaire in situ et ayant en général un faible taux de mitoses. Typiquement, les cellules s'ordonnent en file indienne, s'alignent ou apparaissent individuellement englobées dans du tissu fibreux. Tant macroscopiquement que microscopiquement. Les cellules infiltrantes se disposent souvent concentriquement autour des canaux donnant un aspect "en cible"(Sharma et al. 2010). Génétiquement, ils ont associés ce type de carcinome à la perte l'expression membranaire de l'E-cadhérine qui est responsable de l'adhésion intercellulaire (Schnitt & Collins 2015)

- **carcinomes rares** : médullaire, papillaire infiltrant, secrétant juvénile, apocrine, la maladie de Paget et autres (Malhotra et al. 2010) .
- **les sarcomes mammaires** : sont rares ,c'est des tumeurs qui se développent à partir du tissu mésenchymateux mammaire : tissu conjonctif (Sharma et al 2010)**.**
- **Angiosarcomes mammaires**
- **carcinome mammaire chez l'homme** : est rare, représente environ 0,6% de tous les cancers du sein. Les cancers peuvent être soit in situ, soit Infiltrant. Les deux lésions ont tendance à se développer chez les plus âgés (Schnitt & Collins 2015).

5. Les facteurs histopronostiques

- **Envahissement ganglionnaire axillaire**

La propagation du cancer aux ganglions lymphatiques est le facteur de pronostic le plus important du cancer du sein. Un cancer du sein qui s'est propagé aux ganglions lymphatiques engendre un risque de récidive plus élevé et un pronostic moins favorable qu'un cancer du sein qui n'est pas propagé aux ganglions lymphatiques (Galant et al. 2010).

- **La taille tumorale**

Elle constitue un facteur de pronostique très important, elle doit être mesurée macroscopiquement dans les 3 plans d'espaces à l'état frais, La taille de la tumeur affecte le pronostic, peu importe le nombre de ganglions lymphatiques atteints par le cancer. Une tumeur du sein qui mesure 5 cm ou plus est plus susceptible de réapparaître après le traitement qu'une plus petite tumeur. Une tumeur au sein qui mesure moins de 1 cm et qui ne s'est pas propagée aux ganglions lymphatiques engendre un pronostic très favorable. (*Pronostic et survie pour le cancer du sein - Société canadienne du cancer*).

- **Le type histologique**

Plusieurs études ont montrées que certains types dits ’spéciaux’, le carcinome tubulaire, tubulo-lobulaire, le carcinome mucineux ou colloïde et le carcinome cribriforme infiltrant, présentent un meilleur pronostic que le carcinome de type canalaire puisque ils risquent moins de se propager aux ganglions lymphatiques (Galant et al. 2010)**.**

-Ils ont trouvés aussi que le type histologique influence la réponse au traitement, le taux de réponse à la chimiothérapie néo adjuvante est significativement plus élevé avec un cancer canalaire qu’avec un cancer lobulaire (Mombelli 2014).

- **Le grade Histologique**

Le grade histologique représente un facteur de pronostic très important pour le risque des métastases et la survie de patients (Mombelli 2014), il représente le potentiel agressif d’une tumeur, une tumeur de bas grade est moins agressive qu’une tumeur de haut grade.
-Il existe plusieurs système de grading, le plus utilisés est celui de Scarff-Bloom et Richardson (SBR), dans ce système il y a trois paramètres(*Grade of Breast Cancer*) :

- L’architecture tumorale :
- la forme et la taille du noyau de la cellule
- le nombre de cellules qui se divisent (ou activité mitotique).

- **Les emboles vasculaires péri tumoraux**

Les emboles vasculaires sont définis par la présence des agrégats des cellules carcinomateuses dans la lumière capillaire lymphatique et sanguine en périphérie de la lésion (Galant et al. 2010)**.**
La présence d'emboles vasculaires péri tumoraux est un facteur de pronostic important, il est utilisé aussi pour prédire les rechutes métastatiques, la survie globale et les récidives locales (Sanae et al. 2009)**.**

- **L’expression de récepteurs hormonaux**

Ce Sont des protéines trouvées dans ou sur les cellules mammaires qui ramènent les signaux hormonaux indiquant aux cellules pour se développer. Ces récepteurs sont exprimés par les

cellules des lobules et des galactophores de la glande mammaire normale. Ils sont plus fortement exprimés dans les adénocarcinomes lobulaires et canalaires bien différenciés.

Ces récepteurs sont un facteur de pronostic très important et un élément prédictif à la réponse à l'hormonothérapie, plusieurs études ont montrés que les cancers du sein dont les cellules tumorales expriment des récepteurs hormonaux ont un meilleur pronostic par apport au cancer dont les cellules n'expriment pas ces récepteurs. (Mombelli 2014), Ils ont trouvés aussi que la présence simultanée des deux types de récepteurs sur le même type de cancer mène à un pronostic meilleur qu'une tumeur exprime un seul type de récepteur (Mombelli 2014).

- **l'oncogène Her2**

Les récepteurs HER existent sous forme de monomères sur la surface de la cellule. Sur les ligands se liant à leurs domaines extracellulaires **,**L'HER2 est surexprimé dans 15 à 30% des cancers invasifs du sein, ce qui a des implications pronostics et prédictives(Park et al. 2006).

6. Classification moléculaire

Cette classification se base sur l'expression des récepteurs d'œstrogène, elle regroupe les tumeurs dans cinq sous-groupe moléculaires , récemment ; ils ont ajoutés un sixième groupe (Eroles et al. 2012).

- **Luminal A** :c'est le type le plus commun ;il représente 50–60% du total((Eroles et al. 2012) ,ils sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription du récepteur d'œstrogène a des taux élevé qui sont typiquement exprimés par les cellules luminales qui tapissent les conduits mammaires, ils présentent une expression minimale des gènes de prolifération (Yersal & Barutca 2014).

En se Basant sur l'expression génétique des différents types histologiques des tumeurs ; tous les cas du cancer mammaire lobulaire in situ et la plupart des tumeurs infiltrant lobulaire appartiennent au type luminal A ,ce type est caractérisé par une évolution lente et un meilleur pronostic comparé au luminal B et d'autre types (Eroles et al. 2012)**.**

- **Luminal B :** ils représentent 10–20% du total (Eroles et al. 2012) ; comparé au luminal A, ils ont un phénotype plus agressif, un grade histologique et index prolifératif plus élevé avec un pronostic défavorable ,ils sont caractérisés par l'expression des facteurs de transcription du récepteur d'œstrogène a des taux faible et une expression des gènes de prolifération a des taux élevés(Yersal & Barutca 2014).

Les tumeurs causées par des mutations de BRCA2 appartiennent à ce groupe A (Vincent-Salomon 2009)**.**

- **HER2 positive**

15 a 20% des cancers sont HER2 positives, elles sont caractérisées par une hyper-expression des gènes HER2 et les gènes associés au gène d'HER2, ces cancers présentent une hyper-expression des gènes de la prolifération cellulaire mais sans exprimées les gènes des cellules basales et une moindre expression des gènes exprimés par les cellules liminales. (Eroles et al. 2012) . leur pronostic est défavorable (Grenier J1, Soria JC, Mathieu MC, Andre F, Abdelmoula S, Velasco V, Morat L, Besse B, Dunant A, Spielmann M 2007)**.**

- **Claudin-low :**

C'est un nouveau sous –type identifié récemment en 2007, cette nomenclature révèle l'expression basse des gènes impliqués dans les jonctions serrées et les molécules d'adhésion intercellulaire comme claudin-3, -4, -7, cingulin, ocludin, et E-cadherin.
Ces tumeurs ont un mauvais pronostic, malgré elles présentant une faible expression des gènes associés à la prolifération cellulaire. Sinon, ils sur-expriment un sous-ensemble de gènes étroitement liée à la différentiation mésenchymateuses et la transition épithéliale-mésenchymateuse. Ces caractères sont associés à l'acquisition des cellules cancéreuses d'un phénotype d'une cellule de mésenchyme (Eroles et al. 2012).

- **Basale ou Basale like** : représentent10–20% dans tous les carcinomes mammaires, ils sont caractérisées par l'expression de gènes identiques à ceux exprimés par des lignées de cellules myoépithéliales (basale)comme cytokeratines de poids moléculaires élevés CK5/6, CK14, CK17 (Eroles et al. 2012).

  Il existe des tumeurs dites **Triples négatifs** sont constituées de 80 % des carcinomes basales, elles sont RO, RP et ERBB2 négatifs, la plupart de ces tumeurs sont de grade histologique III, avec une expression des cytokératines 5/6/14 et/ou d'EGFR, associées à un pronostic défavorable (Badve et al. 2011) **.**Une classification récente a permet d'intégrer le type triple négatif dans les carcinomes basales (Badve et al. 2011) .

III. Triple négatif

Le sous-type Cancer du sein 'triple négatif' a été rapporté dans la littérature pour la première fois en 2005 (Uscanga-Perales et al. 2016).

Selon une étude rétrospective faite en 2015, au niveau de centre de pierre et marie curie (CPMC), Les cancers du sein (TPN) représentent environ 15 % (12-17 %) des cancers du sein infiltrants (GHERIB.N et al ,2015).

Il s'agit sont des cellules cancéreuses qui ne disposent pas des trois récepteurs ciblés par la chimiothérapie actuelle à savoir ,le récepteur des œstrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR) ainsi que celui du facteur de croissance épidermique humain (HER-2) (Carey et al. 2006). Ce type de cancer représenterait un défi thérapeutique majeur de par sa résistance notoire aux traitements conventionnels (Cook et al. 2017).

Ils surviennent le plus souvent chez les femmes jeunes, non ménopausées avec une plus grande fréquence chez celles d'origine africaine et hispanique (Carey et al. 2006) (Oakman et al. 2010) (Azim et al. 2012).

Les tumeurs dites triple négatif sont caractérisées par une masse tumorale abondante avec un grade histologique plus élevé, elles métastasent le plus souvent vers le cerveau et le poumon Dent et al. 2007) (Erebi Patricia Tawari 2016).

Triple négatif est associé à une perte d'expression et /ou altération génomique du gène PTEN (Hu et. al. 2009) (Oakman et al. 2010).Toutefois , il est due à une mutation de BRCA1 (Oakman et al. 2010).

1. Classification des CSTN :

- ✓ **Histologiques :**

La majorité des CSTN (95%) sont classés histologiquement en deux sous-groupes (Bianchini et al. 2016) **:**

a. **Carcinome canalaire infiltrant de type non spécifique,** Les termes "de type non spécifique" (TNS) correspondent au fait que ces tumeurs ne présentent pas de caractéristiques morphologiques suffisantes pour les classer dans une autre catégorie (Radosevic-Robin 2016).

Ils existent d'autres types nommés :

b. **les types histologiques spécifiques:**

- **Les cancers du sein de type médullaire :** sont caractérisés par une association des caractères morphologiques particuliers, parmi lesquels un infiltrat lymphocytaire diffus intra et peritumoral très caractéristique et un bon pronostic par apport a d'autre sous type (Radosevic-Robin 2016).
- **Carcinome adénoïde kystique** : C'est un carcinome très rare <1 % dont l'aspect histologique est comparable aux tumeurs de même type des glandes salivaires (Tavassoéli F.A 2003).
- **Les carcinomes apocrines** (Bianchini et al. 2016)**.**
- **les carcinomes sécrétoires** (Bianchini et al. 2016)**.**

✓ **Classification moléculaire**

Afin de bien comprendre l'hétérogénéité du cancer du sein TN, Lehmann et al ont identifiés six sous type de CSTN, en se basant sur le profil d'expression des gènes :

- Deux sous-type Basale –like related (BL1 et BL2)
- Deux sous type mésenchymateux (mysenchymale M et mesenchymal stem cell)
- un sous-groupe immunomodulateur
- Un groupe luminal récepteur androgène (Figure 8) (Kalimutho, 2015)

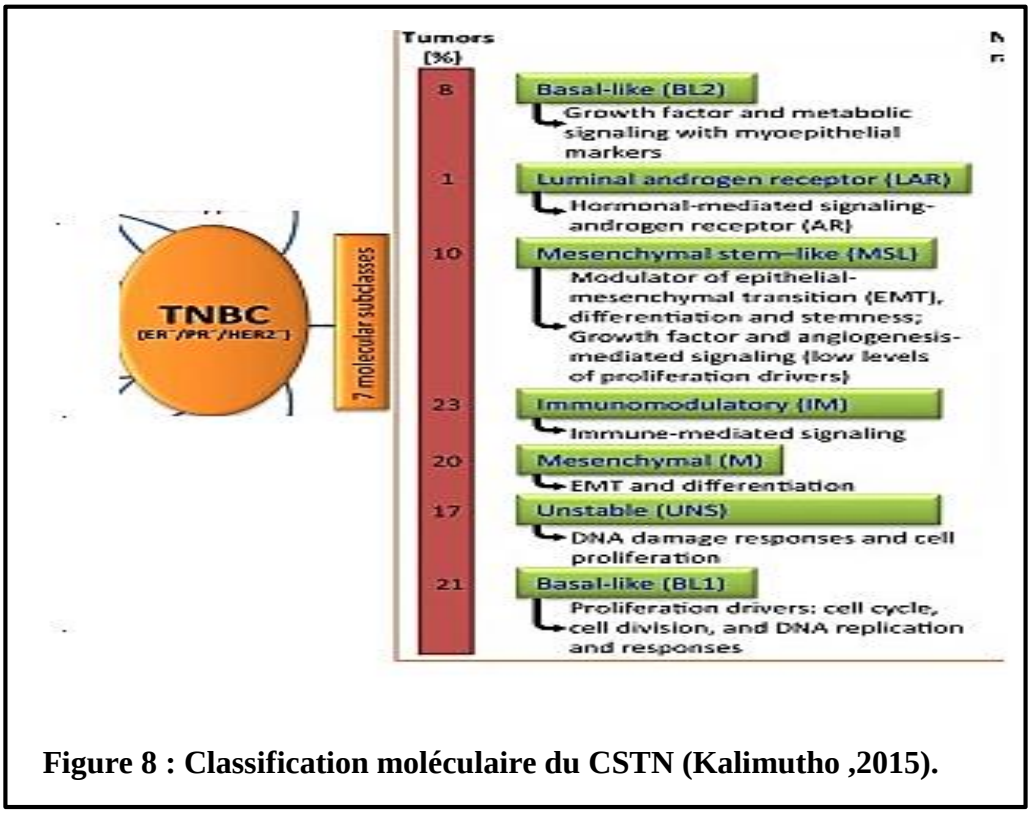


Figure 8 : Classification moléculaire du CSTN (Kalimutho ,2015).

2. Inflammation et cancer du sein TN

La réaction inflammatoire est une rection naturelle physiologique dans les conditions normales de l'organisme , elle aide à éliminer l'agent pathogène et favorise la réparation tissulaire ; lorsque cette réactions est mal contrôlée , elle provoque des lésions irréversible du génome à l'origine du déclanchement du processus cancérigène .(DeNardo & Coussens 2007)

Un medecin allemand ,Rudolf Virchow en 1836 fut le premier à observer un lien entre l'inflammation et le cancer en remarquant un grand nombre de leucocytes au sein des tissus tumoraux ,il suggéra alors que les sites d'inflammations chroniques sont à l'origine des tumeurs.(Landskron et al. 2014)

Les cellules tumorales secrètent de médiateurs attractants qui attirent les cellules immunitaires dotées elles aussi d'une capacité à libérer une pléiade de cytokines, des chimiockines et des espèces réactifs d'oxygène .ces médiateurs peuvent à la fois inhiber ou stimuler la croissance tumorale, ainsi la migration des cellules cancéreuses. (figure 9) .(Taylor 2014)

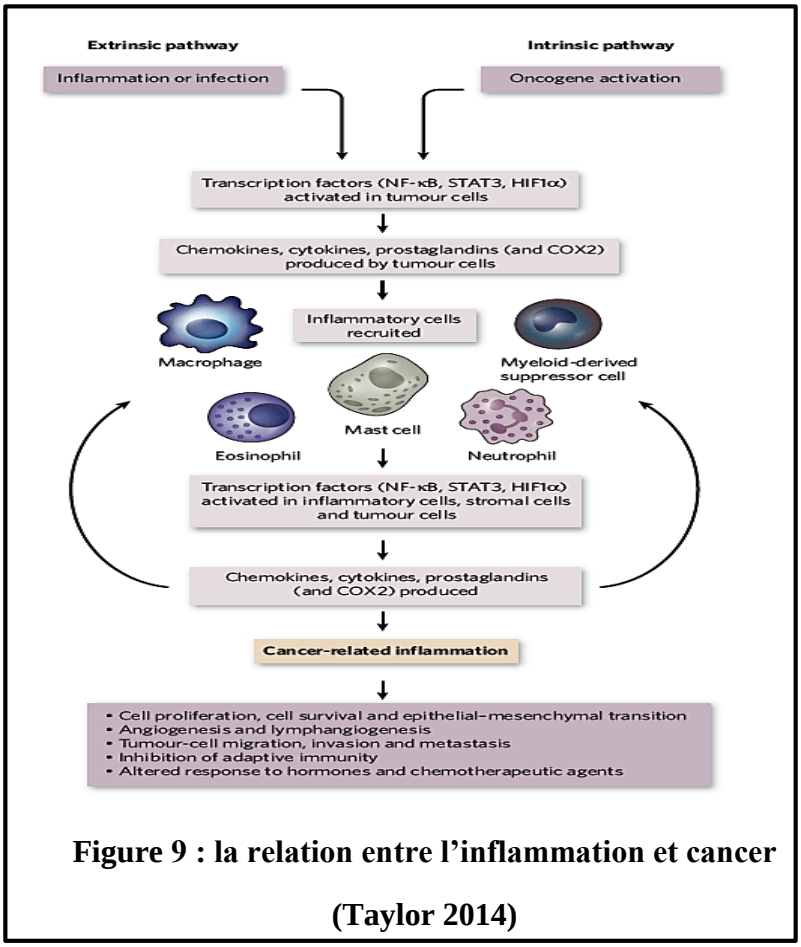


Figure 9 : la relation entre l'inflammation et cancer

(Taylor 2014)

Alors que les mutations génétiques sporadiques ou héréditaires dans les gènes essentiels de régulation du cycle cellulaire, la mort cellulaire programmée, la différenciation et l'adhésion peuvent représenter des événements initiateurs dans la tumorigenèse (« initiation »), une inflammation chronique favorise la sélection de fonctions supplémentaires dans des cellules engagées qui peuvent favoriser la transition maligne.(Quail & Joyce 2013).

3. le microenvironnement tumoral dans le cancer du sein

Les cellules cancéreuses ne sont pas des ilots cellulaires autonomes résidants dans un organe particulier, mais bien entourées d'un environnement complexe hétérogène. (Iii & Sabatier 2011)

Ce microenvironnement tumoral est composé de plusieurs types cellulaires. Il s'agit principalement, de cellules stromales (fibroblastes, adipocytes, etc..) et de cellules immunitaires à la fois innée (myéloïde) et adaptative (lymphoide) .(Quail & Joyce 2013)

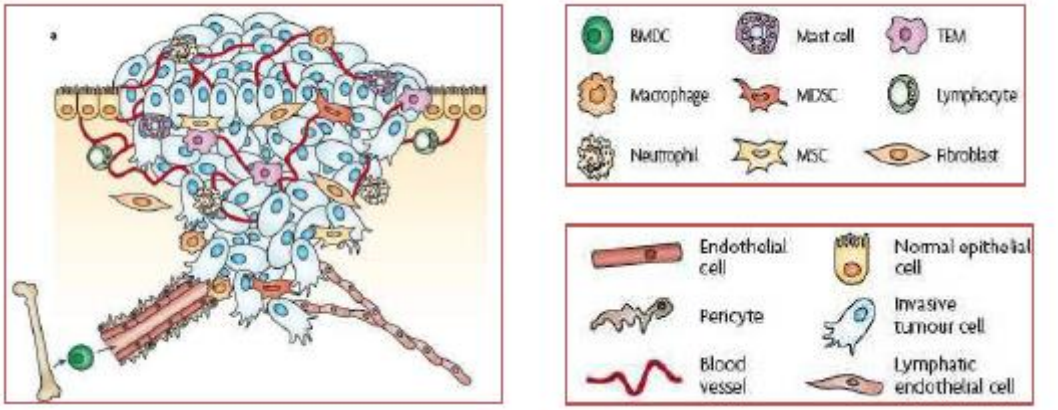


Figure 10: La tumeur ; un organe complexe, un organe à part entière et non un amas déstructuré de cellules(Johanna A. Joyce & Jeffrey W. Pollard 2009)

4. le rôle des cellules stromales dans la carcinogenèse mammaire

Le stroma tumoral est composé de 3 composants :

- **les cellules d'origine mésenchymateuse** : ce sont des cellules qui dérivent du mésenchyme (Pattabiraman & Weinberg 2014), principalement on parle de :

- **Les fibroblastes associés au cancer (FAC) :**

Ce sont des cellules de tissus conjonctif, allongés fusiformes, identifiées pour la 1 ère fois à la fin du 19 Emme siècle. Non-inflammatoires, non épithéliales et non vasculaires, elles

représenteraient la composante majoritaire du microenvironnement tumoral. (WANG 2013, Iii & Sabatier 2010).

Leur rôle dans la progression tumorale se définit comme suit :

1-la libération des facteurs de croissances, des cytokines, des chimiokines tels que HGF et IGFs qui vont stimuler l'angiogénèse et la prolifération avec invasion cancéreuse (Zilberstein et al. 2012) (Shimoda et al,2010).

2- libération de matrice métalloprotéases(MMP) responsables du remodelage de la matrice extra cellulaire (WANG 2013) (Boire et al. 2005).

- **Les adipocytes associées au cancer (CAA) :**

Le tissu adipeux, composé des adipocytes principalement matures et progéniteurs (préadipocytes et les cellules souches dérivées du tissu adipeux (ADSCs)),c'est le composant le plus abondant entourant les cellules cancéreuses du sein(Mao et al. 2013). Il existe des preuves cumulatives soutenant que les cellules adipeuses associée aux cancers (CAA) est un élément clé de la progression du cancer du sein et de la cancérogenèse. Il existe également des preuves que les ADSCs favoriseraient la croissance et la survie des cellules cancéreuses du sein ainsi que leurs capacités migratoires et invasives in vitro et in vivo par sécrétant des cytokines (IL-6, IL8, CCL -5 et CXCL12).(Nieman et al. 2013).

- **les cellules d'origines hématopoïétiques :**

ce sont les cellules qui dérivent de la moelle osseuse (Pattabiraman & Weinberg 2014), sont :

- **Macrophages associés aux tumeurs (TAMs) :**

Il s'agit de cellules phagocytaires dont le rôle est d'ingérer les débris cellulaires et les pathogènes(Mombelli 2014). Elles dérivent des cellules progenetrices de la moelle osseuse qui vont proliférer et gagner le sang sous forme de pro-monocytes ; ensuite ils se développent en monocytes et passent du sang vers les tissus pour se différencier en macrophages résidents. Ces derniers , sont principalement regroupés de deux populations différentes, les macrophages de type M1 à propriétés antibactérienne , antitumorale et immunostimulante et M2 qui joueraient un rôle dans l'angiogenèse, la réparation tissulaire, la promotion tumorale et la diminution de l'immunité adaptative (BOUKHARI ,2012) (Mantovani et al. 2009).

Les TAMs peuvent représenter jusqu'à 50% de la population cellulaire tumorale, ils sont principalement de type M2 à cause de l'absence de signaux orientant vers le phénotype M1 (Solinas et al. 2009).

Les TAMs favorisent la carcinogenèse mammaire en libérant des molécules pro-angiogéniques et pro-lymphangiogénique principalement VEGF, PDGF, TGFβ, MMP-2, MMP-7, MMP-9,

MMP-12, CCL-5, CCL-2, CXCL-1. Ces molécules facilitent l'invasion tumorale et les métastases (Solinas et al. 2010).

- **Les cellules dendritiques associées au cancer (TADCs)** :

Elles se trouvent à la périphérie de la tumeur (Solinas et al. 2009), le plus souvent avec un phénotype immature. Elles n'expriment pas les molécules de Co-stimulation en phagocytant les cellules tumorales et en les présentant aux lymphocytes T qui deviennent anergiques. D'où une réponse anti-tumorale inefficace. Ce défaut est favorisé aussi à cause des antigènes tumorales qui sont faiblement immunogènes , en plus cette sous-population de cellules dendritiques libèrent des cytokines qui vont recruter des lymphocytes T_{reg} qui sont responsable de la tolérance immunitaire (Iii & Sabatier 2010).

- **Les lymphocytes T associées au cancer (TILs) :**

Le rôle des lymphocytes T dans le développement du cancer du sein reste ambigu, l'environnement dans le stroma tumoral contient des cytokines anti-inflammatoires principalement le TGF-B, l'IL-10. Ces molécules sont produites soit par la cellules tumorales elle-même ou les cellules stromales .(Iii & Sabatier 2010).

Ce profil cytokinique favorise la différentiation des lymphocytes T en lymphocytes régulateurs, la majorité des lymphocytes tumoraux appartiennent aux lymphocytes régulateurs **(T_{reg}).** Ils représentent jusqu'à 30% de l'infiltrat leucocytaire intra-tumoral.

Toutefois, Le rôle de ces lymphocytes se résumerait à l'inhibition des cellules anti-tumorale (Sakaguchi 2000) . L'IL-2 et l'interaction PD-1/PD-L1 sont également des paramètres importants pour réaliser cette néo-conversion.(Francisco et al. 2009).

Une autre sous-population existe au sein d'une tumeur c'est **TH_{17}**, dans les cas physiologiques ; elle jouerait un rôle paradoxal : c'est des cellules anti-pathogènes extracellulaires comme les bactéries et les champignons et participent dans les maladies auto-immunes et les syndromes inflammatoires chroniques.(Mombelli 2014). Paradoxalement, au sein d'une tumeur, ces dernières entretiendraient une inflammation chronique via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires Il-17A (Cochaud et al. 2013).

- **la composante non-cellulaire :**

Elle représente les constituants de la matrice extracellulaire qui sont principalement :

Des protéines, des glycoprotéines et des protéoglycanes. la MEC englobe aussi la lame basale qui est constituée de la fibronectine, collagène VI et la laminine (Pattabiraman & Weinberg 2014).

Cette MEC est impliquée dans la formation d'une niche pour les cellules souches, elle joue un aussi le maintien de l'architecture tissulaire et s'oppose à l'invasion tumorale .une lame basale anormale favorise la progression tumorale et l'angiogenese. (Lu et al. 2012).

IV. l'échappement tumoral et la voie PD-1

1. Echappement tumorale

Le cancer est considéré comme une maladie chronique, hétérogène et associée à l'inflammation , le mécanisme de la progression tumorale est très compliqué, plusieurs facteurs sont impliqués dans le développement de cette maladie comme les facteurs environnementaux , les habitudes , les mutations génétiques et le dysfonctionnement immunitaire. Nous sommes plus intéressés à la relation entre la progression tumorale mammaire et l'immunité. Une cellule immunitaire peut s'échapper à la surveillance immunitaire et les points de contrôles par plusieurs mécanismes. (Sjoblom et al. 2006 He et al. 2015) **,** principalement :

la cellule tumorale peut s'échapper en créant un microenvironnement immunosuppressif, dans le cas physiologique ,il existe une balance entre les voies de contrôles immunitaires afin de réguler la réponse cellulaire des lymphocytes T pour minimiser l'endommagement tissulaire et éviter d'entrer dans les maladies auto-immunes , le cancer utilise plusieurs voies pour augmenter l'expression des signaux négatifs, ces signaux inhibent l'activation des lymphocytes T ou induisent l'apoptose et favorisent la progression et la métastase tumorale .Des essaies montrent qu'il existe des approches immuno-thérapeutiques qui utilisent des anticorps antagonistes afin d'inhiber les signaux de contrôles immunitaires pour faciliter l'activité anti-tumorale (Zou 2005)

Les recherches scientifiques actuelles se concentrent sur deux signaux de contrôles : CLTA-4, et PD-1. La différence entre les deux contrôles c'est que CLTA-4 régule l'activité des lymphocytes T dans les stades précoce du développement tumorale , alors que PDL-1 la régule dans les stades avancés (Fife & Bluestone 2008) .

2. La voie PD-1

i. La structure de PD-1 :

Le récepteur inhibiteur PD-1 ou CD299 c'est une glycoprotéine membranaire avec un seul domaine extracellulaire de le la famille des immunoglobuline (Ig) , il a été identifié pour la 1er fois en 1992 par Ishida et al (Ishida et al. 1992) . cette protéine est codée par le gène Pdcd1 sur le chromosome 2 chez l'homme (Keir et al. 2008)

La mort-1 programmée (PD-1) est exprimée sur les cellules T et B activées, Son principal ligand PD-L1 (B7-H1) est typiquement exprimé sur un sous-ensemble de macrophages, mais peut être induit par des cytokines inflammatoires dans divers types de tissus.

PD-1 se lie également à PD-L2 (B7-DC), qui est exprimé sélectivement sur les macrophages et les cellules dendritiques (Taube et al. 2014).

De nombreux travaux montrent que dans certains types de cancers et certaines maladies chroniques d'origines virale ; il y a une forte expression de PDL-1 soit par les cellules tumorales ou infectées (Mathieu et al. 2013).

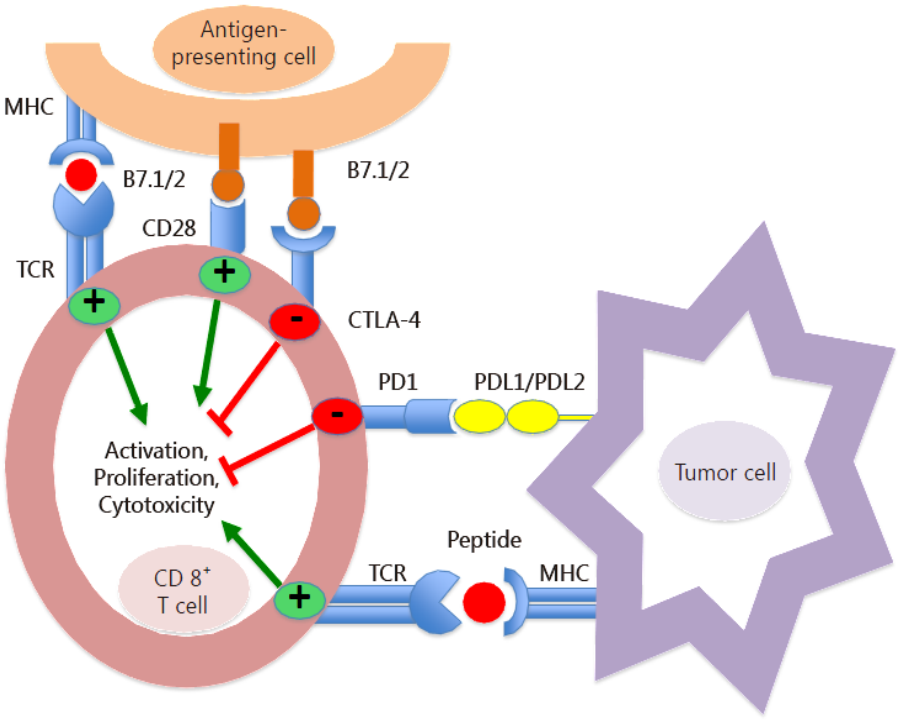


Figure 11 : PD-1 et ses ligands (Santarpia and Karachaliou 2015).

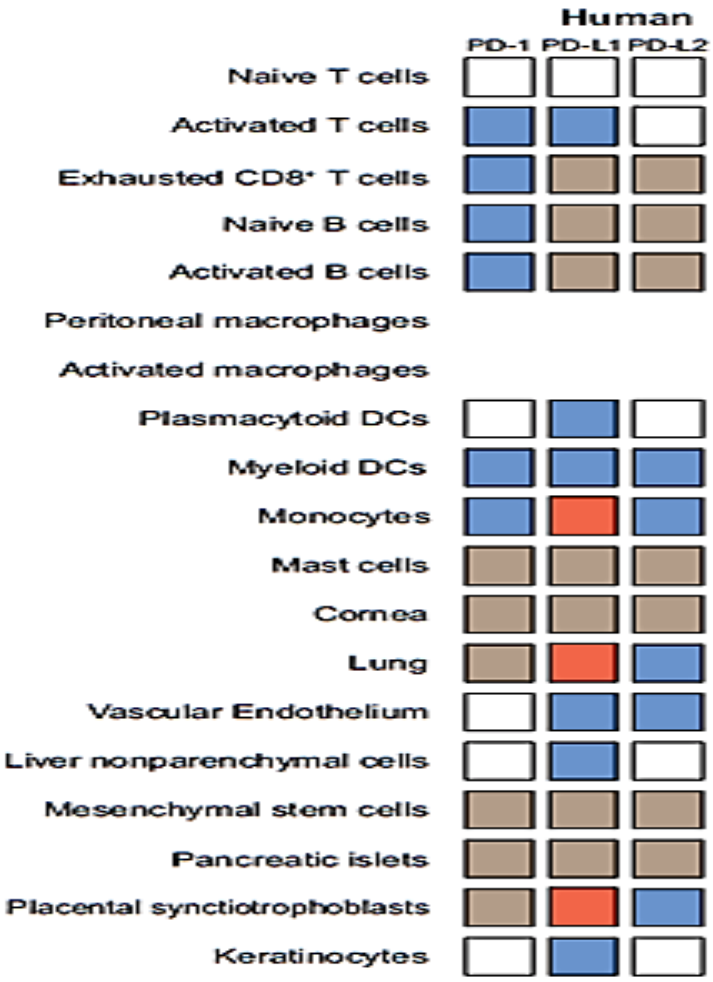


Figure 12: Comparaison de l'expression de PDL-1 , PD-1 et PDL-2 par les différents types cellulaires Chez l'homme .Rouge :forte expression /BLeu :faible expression / Blanc : expression négative /marron: no data (Keir et al. 2008)

ii. L'expression de PDL-1 sur la cellule tumorale

Il est important de comprendre comment les cellules tumorales arrivent à exprimer PDL-1, généralement, il y'a deux mécanismes : la résistance immunitaire inné et la résistance immunitaire adaptative.

PDL-1, le ligand de PD-1, peut être induit à la surface de la cellule tumorale suite à différents évènements oncogéniques (mutation ou délétion du gène suppresseur de tumeur PTEN , activation de voies de signalisation pro-tumorales impliquant la PI3 kinase et des MAPK (mitogen-activatedprotein kinase, MEK/ERK) ou une amplification du chromosome 9 qui contient le locus de PDL-1 ,PDL-2 et interféron receptor adapter JAK2.(Topalian et al. 2016, Badoual et al. 2013).

Donc la cellule cancéreuse exprime de façon constitutive PDL-1 :**c'est la résistance immunitaire innée,** ce mécanisme a été mis en évidence dans différents types tumoraux, dans les gliomes, les cancers du sein et de la prostate(Shin et al. 2017)(Topalian et al. 2016) , ce mode d'expression a été associé à un mauvais pronostic (Santarpia & Karachaliou 2015).

Un autre mécanisme alternatif c'est **la résistance immunitaire adaptative**, PDL-1 est également régulée par de nombreuses cytokines, dont celles appartenant à la famille des interférons (IFNα, IFNγ, etc.). La production d'IFNγ est considérée comme le reflet d'une réponse adaptative impliquant les LT, ce mécanisme a été associé été à un bon pronostic. (Topalian et al. 2016, Badoual et al. 2013)**.**

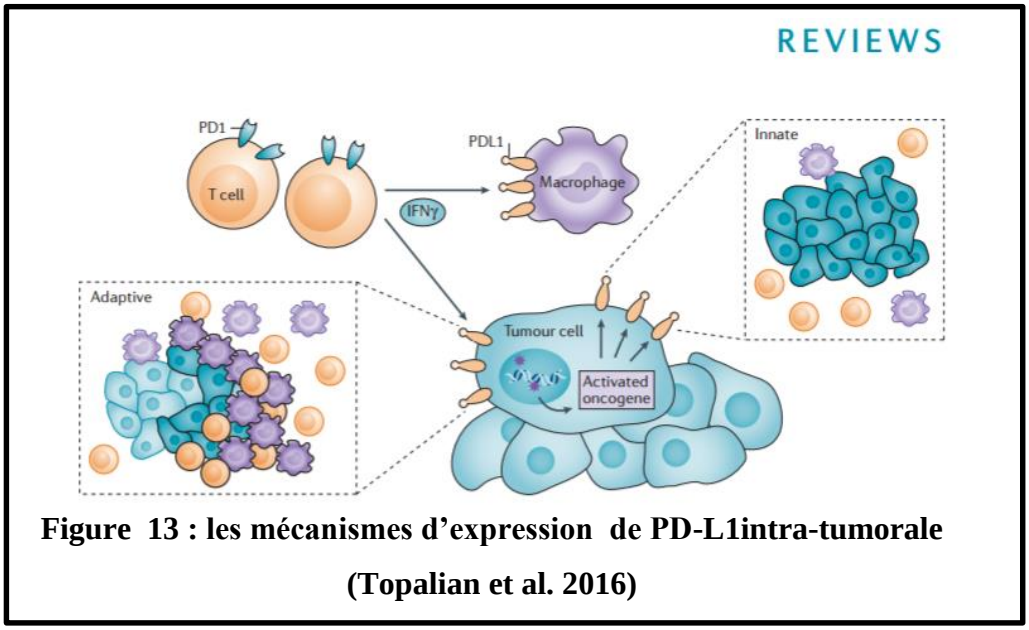


Figure 13 : les mécanismes d'expression de PD-L1intra-tumorale (Topalian et al. 2016)

- **La signalisation de la voie PD1/PDL1**

Une fois PD-1 se fixe sur leur ligands soit PDL-1 ou PDL-2 , le premier effet c'est d'inhiber la signalisation de TCR et les molécules de costimulation (CD-28 avec B7-1 ou B7-2),la fixation de PD-1 avec PDL1/PDL-2 induit inhibition de la phosphoryaltion de ZAP 70 et la chaine TCR CD3z qui représentent des étapes cruciales pour l'activation des lymphocytes T(Yokosuka et al. 2012), elle inhibe aussi Ras qui est la voie de prolifération(Yokosuka et al. 2012). Cette voie aussi inhibe la transduction de signal issu de la molécule costimulatrice CD-28 en bloquant l'activation de la voie PI3K/AKT .(Chinai et al. 2015)

la voie PD-1/PD-L1 est caractérisé par une certaine autonomie ; une fois PD-1 est activé, il va protéger le facteur de transcription FOX01 de la dégradation, ce facteur induit la surexpression des molécules de PD-1 sur les cellules T .(Staron et al. 2014)

La voie PD-L1 influence aussi sur le métabolisme des lymphocytes T , elle inhibe la glycolyse et le métabolisme des acides aminés et active l'oxydation des acides gras libres (Patsoukis et al. 2015)

PD-1 induit l'anergie des lymphocytes T, nombreuse études ont trouvées que les lymphocytes T associé au cancer dans un environnement tumorale sont des lymphocytes épuisées .Elle diminue aussi la survie des lymphocytes T en sous-exprimant les molécules anti-apoptotiques comme BCL-xL. (He et al. 2015)

La voie PD-1/PD-L1 est associée avec une sous–expression de la voie Akt ; mtor et une surexpression de Pten. Plusieurs études ont pu démontrées que la voie AKT est un inhibiteur de la différentiation vers des T_{reg}, donc La voie PD1 est associé avec un grand nombre des lymphocytes $T_{reg,\ ils}$ ont trouvés aussi que la présence de TGF-β induit la suppression la voie AKT-mTOR après la ligation de PD-1 et PD-L1, qui favoriserait préférentiellement la programmation naïve des cellules T vers le développement de Tregs voire la tolérance des cellules cancéreuses.

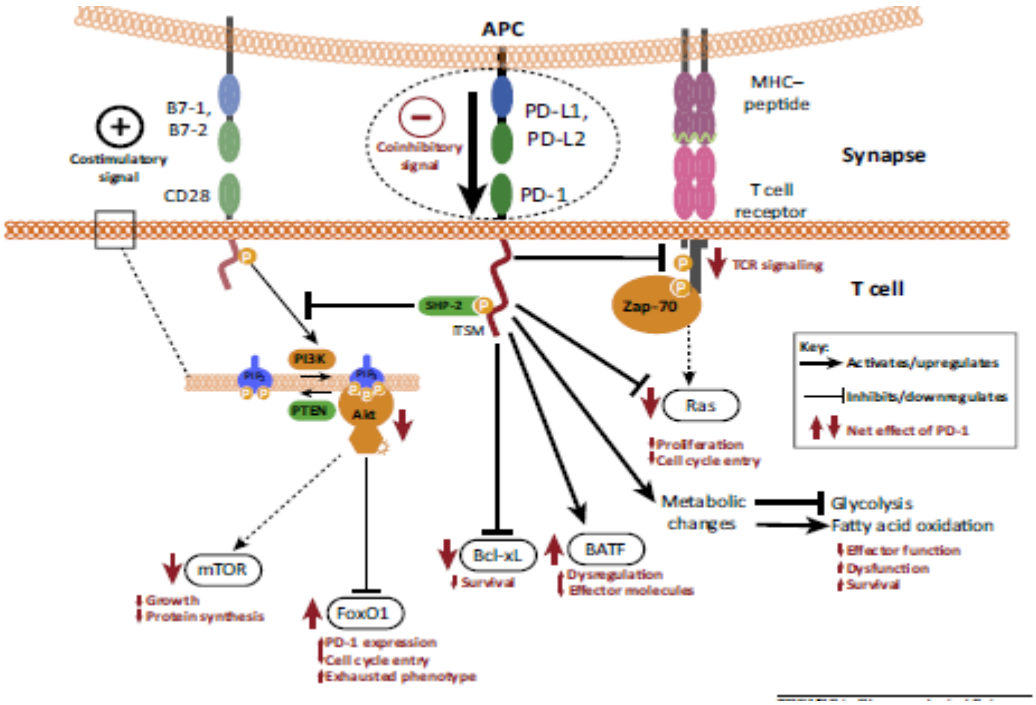


Figure 14 : la signalisation moléculaire de la voie PD-1 (Chinai et al. 2015)

V. Triple négatif et immunotherapie anti-PD1

Un chercheur au Centre de cancérologie de l'Université du Colorado Jennifer Diamond Dit « la cancer du sein triple négatif est une maladie qui a vraiment besoin d'une percée ,Il n'y a vraiment aucun médicament spécifiquement approuvé pour ce type de cancer »(Finally, targeted therapies for triple-negative breast cancer: Promising clinical trials of IMMU-132, vantictumab and atezolizumab against TNBC -- ScienceDaily 2016)

Cancer du sein TN est une maladie héterogenes avec un pauvre pronostic,cette hètérogèneicité a limitée le succé du developpement des traitements ciblés (Jerusalem et al. 2016).

Faut'il utiliser l'immunothrapie comme un traitement du cancer du sein ? la reponse reside dans une autre question clée, est ce que le cancer du sein est immunogenique ? A-t-il la capacité de provoquer une reponse immunitaire ?

Pour qu'il soit immunogene,il faut :

1-la presence des cellules immunitaires et ds lymphocytes dans le microenvironennement tumorale,

2-l'istabilité genomique et les mutations .

Ces characteristiques montionnées sont corrélées au cancer du sein triple negatif,ce sous type est consideré comme le plus immunogenique.(Migali et al. 2016)

Echappement des cellules tumorales de l'immunosurveillance est le résultat d'une diminution de la fonction des cellules effectrices. Une immunothérapie efficace est celle qui boosterait l'immunité anti tumorale des cellules effectrices et éliminerait l'inflammation chronique à l'origine de la progression tumorale (Wimberly et al. 2015)

L'expression de la protéine PD-1 est détectée dans 45 % des patientes avec le cancer du sein avec une pourcentage la plus élevé pour le sous type triple négative qui atteint jusqu'à 59% (Gatalica et al. 2014) (tableau 2)

Tableau 2 : Expression de PD-L1 par les différents sous-types moléculaire du CS. (Gatalica et al. 2014)

Breast cancer subtypes (n = 116)	PD-1 expression/hpf (TILs; % and range)	PD-L1 (tumor cells; %)
Luminal tumors (n = 58)		
Luminal A (n = 33)	25% (1->10)	33%
Luminal B (n = 25)	44% (1–20)	33%
HER2 positive (n = 5)	60% (1–9)	20%
Triple-negative (n = 53)	70% (1–20)[a]	59%[a]

Abbreviation: hpf, high-power fields.

[a]Significantly higher than in luminal tumors.

La valeur relative de PD-L1 peut etre utilisée pour predire le succé de l'immunotherapie anti-PD-1/PD-L1,mais l'expression de PD-L1 dans les tissus tumorale n'est pas tous le temps un biomarqueurs predictif aproprié pour la selection des patients qui peuvent beneficier des anticorps anti-PD-1 Ou PD-L1 , une etude a pu demontrée que 10 % des pateintes qui sont PD-L1 negative mais elles repondent bien au traitement anti PD-L1(García-Teijido et al. 2016)

Contrairement au PD-L1,des études recentes ont montrées que les lymphocytes associés au cancer (TILs) peuvent etre un biomarqueur primaire pour predire la reponse des patients a l'inhibition de la voie PD-1/PD-L1 (García-Teijido et al. 2016)

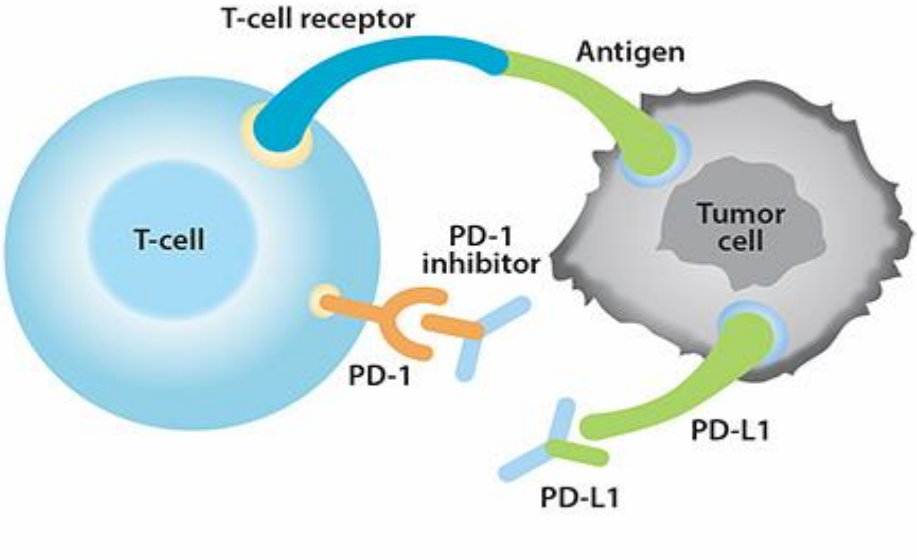


Figure 15 :l'immunothérapie des cancers par les anticorps anti-PD-1 et anti PD-L1(Jin 2015).

VI. Essais cliniques en cours évaluant les immunomodulateurs pour le cancer du sein TN

Le developpement clinique de l'immunotherapie basée sur un inhibiteur de points de contrôle a engendrés une ére fascinante dans le domaines des traitement anti-cancereuse ,le blockage d'un des pricipaux points de controles immunitaires avec des anticoprs monoclaunaux a contribué a re-booster et re-activer les cellules T epuisée et le plus important c'est qu'il à donner des resultat spéctaculaire concernant la reponse des patients à ce traitement (Stagg & Allard 2013).

Même si les résultats des premiers essais évaluant les anti-PD-1 sont moins convainquant dans le cancer du sein par rapport à d'autres types de cancer, il existerait un groupe des patients atteints du cancer du sein TN sensibles à ce traitement (Disis & Stanton 2015).

Un des premiers essaies cliniques de anticorps monoclobal PD-1(pembrolizumab) sur le type triple négatif a été signalé par Nanda et al en 2014 au congrès **de San Antonio sur le Cancer du Sein**. C'est une étude de Phase IB qui a inclus 27 patientes atteintes de cancer du sein TN métastatique, les participantes sont tous PD-L1 positives, le taux de réponse était de 18 %.(Verret & Loirat 2016)

Dans le même congrès, Emens et al ont présentés des résultats d'une études de phase I de 12 patientes atteintes du cancer du sein TN métastatique traitées par un anticorps monoclonal anti-PD-L1 (MPDL3280A, atezolizumab) dont 12 patientes étaient PD-L1 positives ,8% des patientes ont présentées une toxicité de grade 3-4, Le taux de réponse objective était de 33 %. (Jerusalem et al. 2016).

Récemment, le congrès de San Antonio sur le Cancer du Sein en 2015 a encouragé l'évaluation d'un autre anticorps monoclonal anti PD-L1 (Avelumab) ,cet essai a montré des résultats encourageants avec une réponse clinique de 44 % .(Jerusalem et al. 2016).

Démarche expérimentale

1. **Matériels biologiques**

- ✓ Notre étude a été réalisée sur 8 échantillons de patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif, obtenue au laboratoire d'anatomo-pathologie du centre Pierre et Marie Curie d'Alger (CPMC), enregistrées en 2015.
- ✓ Huit fiches de renseignements contenant les données sur les facteurs histopronostiques ont été utilisées .
- ✓ Du tissu humain de placenta comme un témoin positif externe.

2. **Méthodes**

- ➢ **Etude histopathologique**

Une analyse histopathologique des lames HE (archives) a été réalisé afin d'apprécier le pourcentage de l'infiltrat inflammatoire au sein du stroma tumoral selon les recommandations de Salgado et al en 2014 (figure 16).

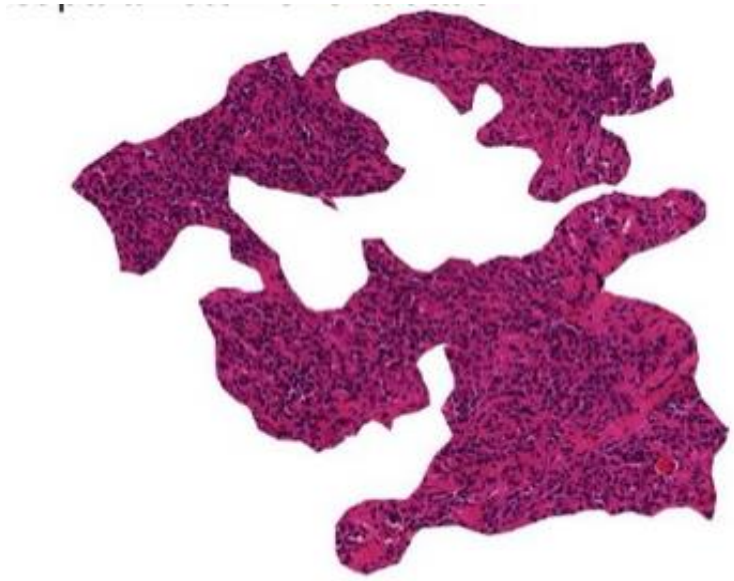


Figure 16 : Méthode d'évaluation de l'infiltrat inflammatoire Sur des lames HE, représentant les zones du stroma qui doivent être évalués(S. Giacche et al ,2015) .

- **la lecture des lames HE**

Trois fourchettes ont été utilisées pour la lecture de ces lames : inférieur à 10%, entre 10% et 50 % et plus de 50 %.(voir tableau 3)

Tableau 3 : Méthode de lecture des lames HE

Le score d'infiltrat inflammatoire	Evaluation de l'infiltrat
<10 %	+
10%-50 %	++
>50 %	++ +

- **La technique d'immunohistochimie**

La révélation des protéines PDL-1 sur les coupes tissulaires tumorales est réalisée par l'immunohistochimie sur BenchMark Ultra® (*Ventana*) (figure 17). Le kit de révélation utilisé pour cette réaction dans l'automate est l'«UltraViewUniversal DAB Detection Kit».

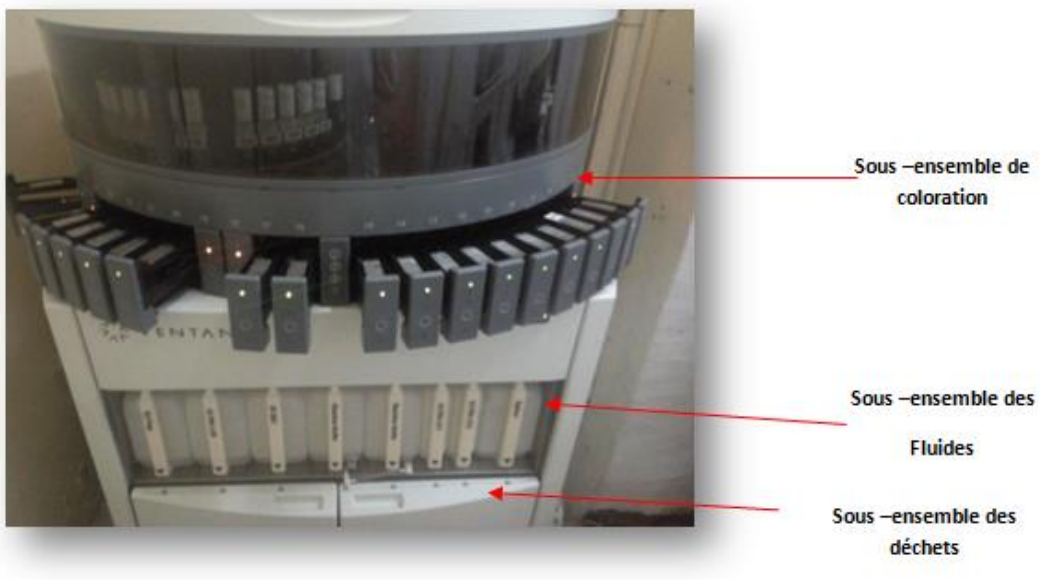


Figure 17 : Photo de l'automate BenchMark Ultra®.

Cet automate, permettant la révélation des protéines par Immunohistochimie, est composé de trois zones principales :

- le sous-ensemble de coloration composé de 30 tiroirs à lames et du carrousel de réactifs contenant le kit de révélation(*UltraView*) ainsi que l'anticorps primaire.
– le sous ensemble des fluides composés des réactifs dits « consommables », utilisés pour toutes les réactions et le sous ensemble des déchets.

le clone PDL-1 E1L3N est un peptide synthétique qui dérive à partir de l'immunisation des lapins avec l'extrémité terminale c-terminale de la protéine humaine PDL-1(Tableau 4) (Smith et al. 2016).

Pour chacun des blocs sélectionnés nous avons fait une coupe colorée pour l'analyse morphologique, puis des coupes d'une épaisseur de 4 µm montées sur des lames silanisées pour la réalisation de l'immunohistochimie.

La réaction d'immunohistochimie dans sa globalité se décompose en plusieurs étapes (figure 18) :
Le déparaffinage du tissu et la réhydratation par l'action simultanée de la chaleur à 75°C et d'une solution détergente (EZ Prep, Ventana) pendant 8 mn.

Le démasquage antigénique : permettant aux antigènes de retrouver leur conformation
Protéique initiale et les rendant accessibles aux anticorps - par incubation de la lame dans un Tampon contenant de l'EDTA, appelé «*Cell Conditionner 1*» (*CC1*).

L'activité peroxydase endogène était bloquée à l'aide d'eau oxygénée.
L'anticorps primaire anti-PDL-1, préalablement dilués dans du «Antiboby diluent» (*Ventana*) au 1/200 ^{eme}, sont déposés sur les lames.
Ils seront incubés 1 heure à une température ambiante, si la protéine respective est présente sur la coupe, les anticorps vont alors s'y complexer.
-Les anticorps primaires étaient détectés par la suite par des anticorps secondaires multimètres (Ultra View marqués à la peroxydase du Raifort). La révélation s'effectue grâce au chromogène diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB + H2O2) pendant 8 mn qui, vont être déposés sur la coupe, révélant par la formation d'un précipité rougeâtre indiquant la présence de la protéine recherchée.
-La contre-coloration était réalisée à l'aide de l'hématoxyline pendant 8 mn associée à une post contre-coloration pendant 8 mn avec une solution de Bluing Reagent comportant du

carbonate de lithium et du carbonate de sodium, conférant une coloration bleue claire aux cellules non marquées.

-Les lames sont alors sorties de l'automate, lavées à l'eau savonneuse, déshydratées dans des bains d'alcool successifs (70%, 90% et 100%) puis placées dans du xylène. Sur les coupes seront alors protégées par des lamelles collées.

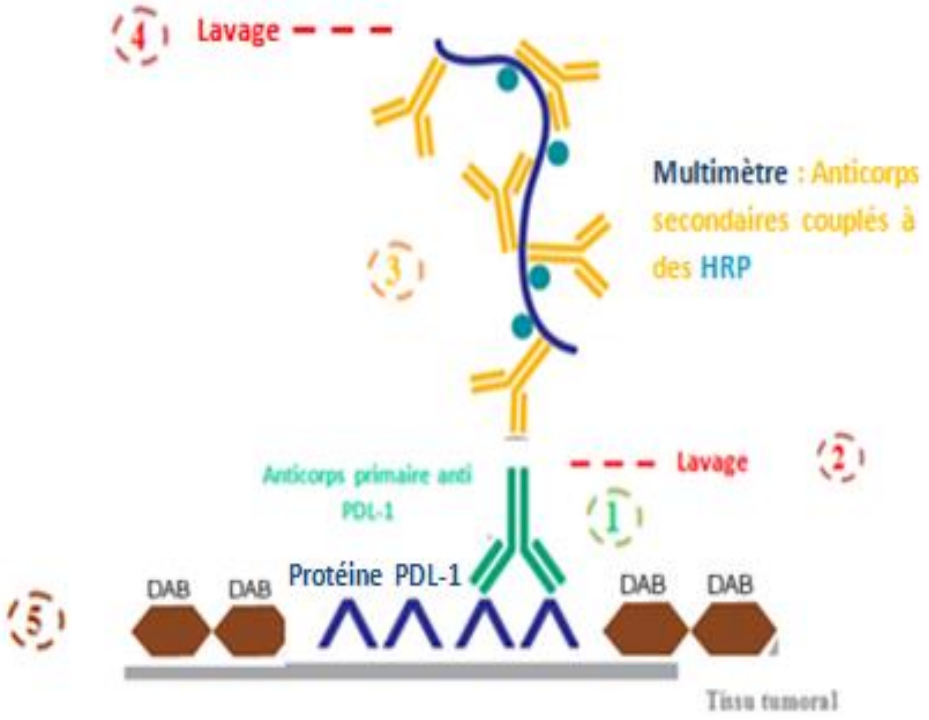


Figure 18 : le principe de l'immunohistochimie sur Ventana

Tableau 4 : caractéristiques de l'anticorps utilisé pour la détection

Anticorps	Référence	Fournisseur	AC/clone	Espèce	Dilution/temps d'incubation	Marquage
PDL-1	**26/2016**	**Cell signaling technology**	**E1L3N**	**Monoclonal lapin**	**1/200 60 min**	**Membranaire**

- **La lecture des lames IHC**

La quantification du marquage sur les tissus est faite par un anatomopathologiste du service CPMC, qui évalue le marquage des cellules tumorales et immunitaire au microscope optique à différents grossissements (x10, x20 et x40).

- **Témoin Positif**

Le clone PDL-1 exige comme un témoin positif le placenta ou les amygdales, selon la littérature, le plus utilisé c'est le placenta. Le rôle de ce contrôle positif c'est de confirmer que les étapes de la méthode sont correctement établies et aussi pour savoir esque les réactifs sont de bonne qualité et fonctionnent proprement.

Le marquage au niveau du placenta montre un marquage uniforme modéré voir intense sur les cytoplasmiques ou les villosités des cellules trophoblastes.

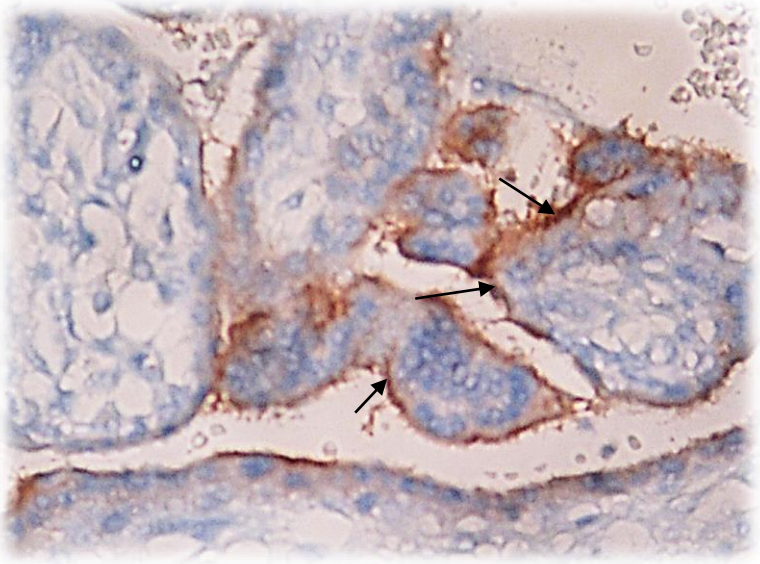


Figure 19 : marquage du contrôle positif par PDL-1, Liseré brunâtre, Marquage Des cellules syncicitrophoblastiques

- **Les critères de positivité de l'infiltrat inflammatoire et de l'expression de PD-L1**

Nous avons classés nos cas en sous- groupes selon le pourcentage de l'expression de PD-L1 et l'infiltrat inflammatoire en se basant sur un seuil de positivité comme suit :
Pour le marquage de PDL-1 (PDL-1t ≥ 1 % / PDL-1 L ≥5 %)**.**

Pour l'infiltrat inflammatoire (TILs ≥50 %).

- **Etude statistique**

L'objectif premier est d'évaluer l'expression du marquage PDL1 dans le cancer du sein TN.

L'évaluation de la corrélation entre le marquage et l'infiltrat inflammatoire avec les facteurs histopronostiques a été effectuée par le test de corrélation Excel.

I. caractéristiques des patients

Huit patientes atteintes d'un carcinome mammaire de type TN ont été incluses dans cette étude. Les caractéristiques clinicopathologiques de la population générale sont résumées dans le Tableau 5.

Sept patientes ont subi une mastectomie et une seule patiente une tumorectomie.

L'âge moyen était de 56 ans avec une tranche d'âge allant de 43 à 76 ans pour la plus âgé.

Toutes les patientes ont présentées un type histologique de type canalaire.

62.5 % (5 cas) de nos patientes ont une tumeur de haut grade (grade SBR III) et 37.5 % (3 cas) ont un grade II, nous n'avons pas de patientes grade I.

La taille tumorale de notre série varie entre 3cm à 12 cm avec une moyenne de 4.875 cm.

Concernant l'envahissement ganglionnaire, la majorité des patientes présentent un envahissement ganglionnaire positif 62.5 % (5cas) et 37.5 % (3 cas) sont N-.

Tableau 5 : caractéristiques histopronostiques des patientes

Les cas	Age	Geste opératoire	Taille tumorale	Type histologique	Grade SBR	Envahissement ganglionnaire
Cas 1	68 ans	MC	12 cm	CCI	III	20N
Cas 2	45 ans	MC	3 cm	CCI	III	13N -
Cas 3	56 ans	MC	2.5 cm	CCI	II	9N-
Cas 4	76 ans	MC	5 cm	CCI	III	8N +
Cas 5	45 ans	TC	3.5 cm	CCI	III	10N-
Cas 6	75 ans	MC	3 cm	CCI	III	N-
Cas 7	43 ans	MC	5 cm	CCI	II	14N
Cas 8	45 ans	MC	5 cm	CCI	II	6 ganglions 2N+6N

MC : Mastectomie /TC : tumorectomie/ CCI : carcinome canalaire infiltrant

II. Evaluation de l'infiltrat inflammatoire sur les lames HE

L'analyse histopathologique à la recherche de l'infiltrat inflammatoire retrouve en intra-tumorale une distribution hétérogène, au sein du stroma fibreux d'abondance variable selon les cas. (Tableau 6)

Tableau 6 : résultat de la lecture de lames HE

Cas	Infiltrat HE
1	25%
2	60%
3	<10%
4	50 %
5	<10%
6	50%
7	1%
8	25%

Nos résultats montrent que :

- ✓ 37.5 % des cas (3 cas) présentent un faible infiltrat inflammatoire (figure 20 et 21)

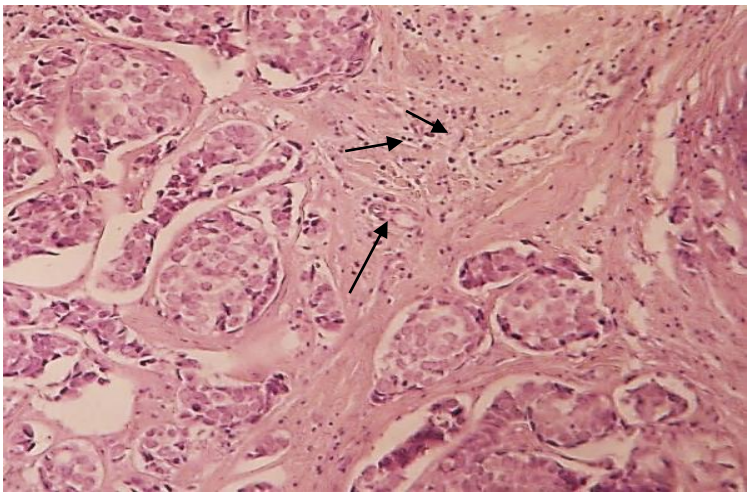


Figure 20 : quelques cellules lymphoïdes,

Infiltrat inflammatoire faible < 10 % (HE GRX10)

✓ 25 % des cas (2 cas) présentent un infiltrat inflammatoire modéré.

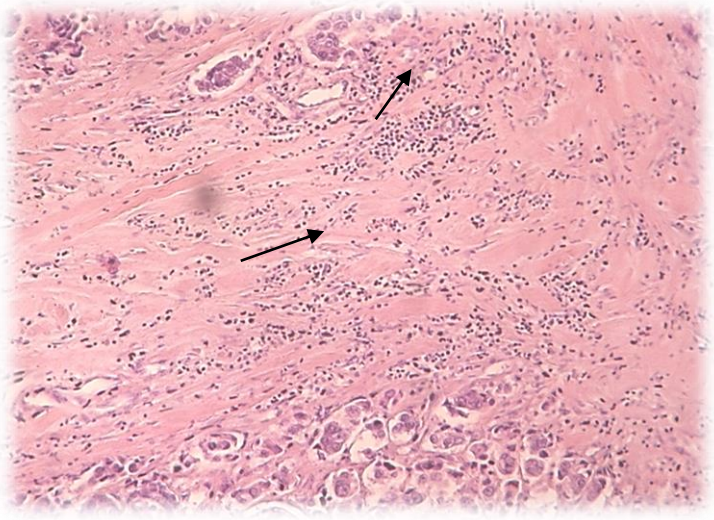


Figure 21:

Infiltrat inflammatoire moyen 25%,

Stroma fibreux grêle, (flèche)

Amas de cellules tumorales (H&E GRX10)

✓ 37.5 % des cas (3 cas) présentent un infiltrat inflammatoire important (figure22, 23 et 24).

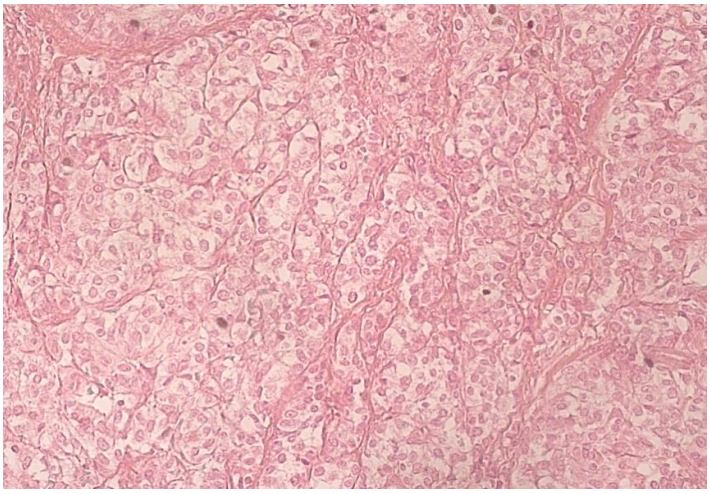


Figure22 : infiltrat inflammatoire intense de 50 %,

Amas de cellules lymphoïdes, HE GRX40

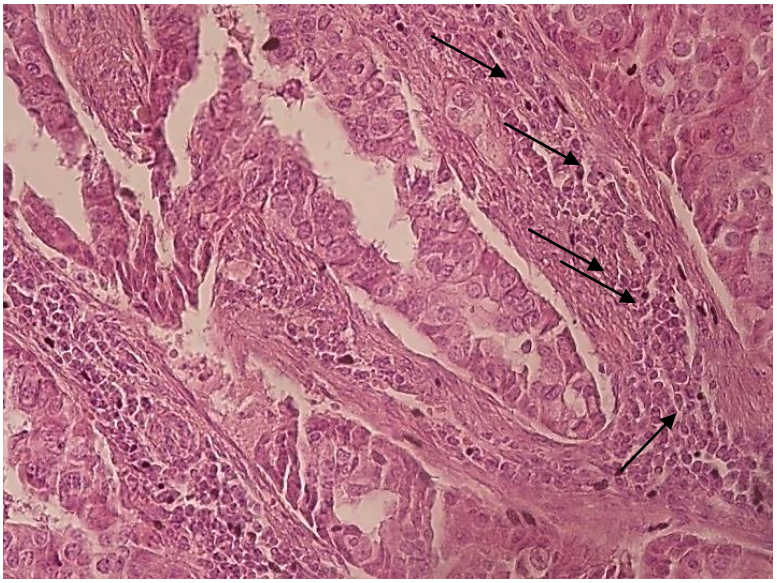


Figure 23 : infiltrat inflammatoire intense de 60 %,

Coulée de cellules lymphoïde (HE GRX 10)

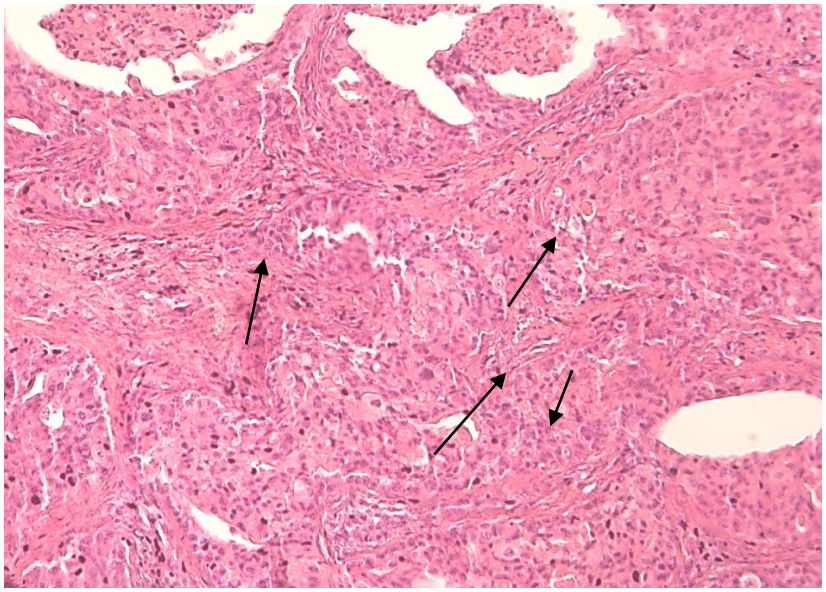


Figure 24 : infiltrat inflammatoire intense de

60 %(HE GRX10) (flèche)

III. Evaluation de l'expression de PDL-1

L'analyse immunohistochemique réalisée à l'aide de l'anticorps PDL-1 E1L3N, retrouve des résultats comme suit (tableau 7) :

Tableau 7: les résultats d'IHC.PDL-1

Numéro	C tumorale (%)	Lymphocyte (%)
1	0%	0%
2	0%	1%
3	0%	1%
4	0%	1%
5	2%	5%
6	0%	1%
7	0%	1%
8	1%	1%

❖ **PDL-1 sur les cellules tumorales :**

✓ Dans 12.5% (1 cas) les cellules tumorales ont exprimées PD-L1, expression intense. (Figure 25)

▪ **Cas 05**

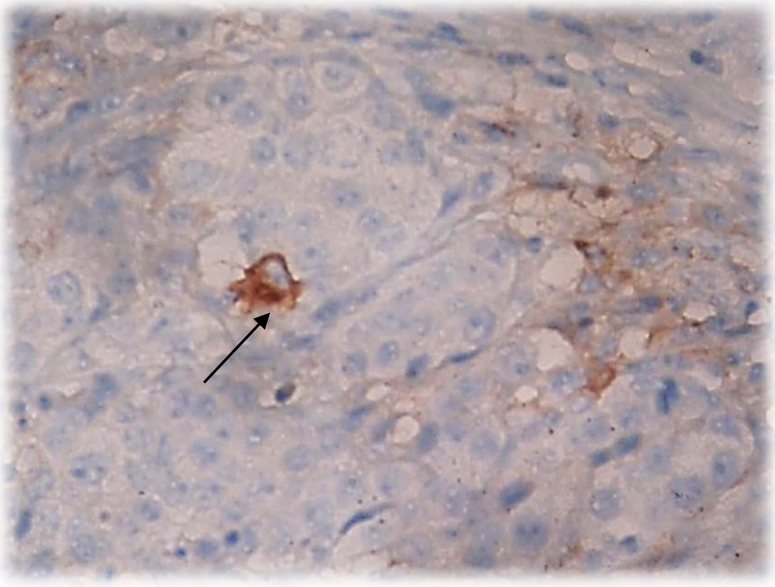


Figure 25 : Marquage membranaire intense (IHC GRX20)

D'une cellule tumorale (flèche)

- ✓ Dans 12.5 % des cas (1 cas) ; l'expression de PDL-1 tumorale est faible. (figure26)
- ✓ **Cas 08 :**

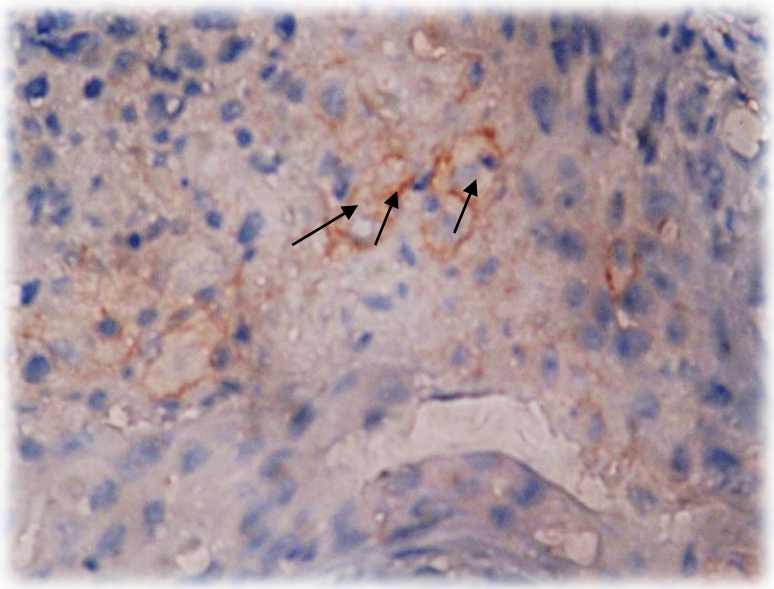


Figure 26: marquage membranaire faible

De cellule tumorale (flèche), IHC (GRX 20)

- ✓ Dans 75 % des cas (6 cas), l'expression sur les cellules tumorale est négative (figure 27)
- ▪ **Cas01 :**

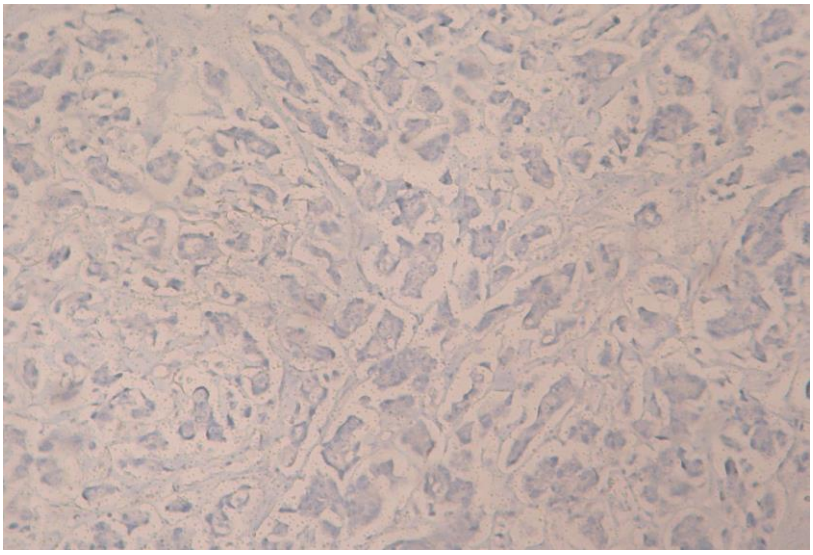


Figure 27 : marquage négatif de PDL1 –tumorale, X 20

❖ **PDL-1 sur les lymphocytes :**

✓ Dans 12.5 % des cas (1 cas), les lymphocytes ont exprimé PDL-1 modérément. (figure 28)

▪ **Cas 05 :**

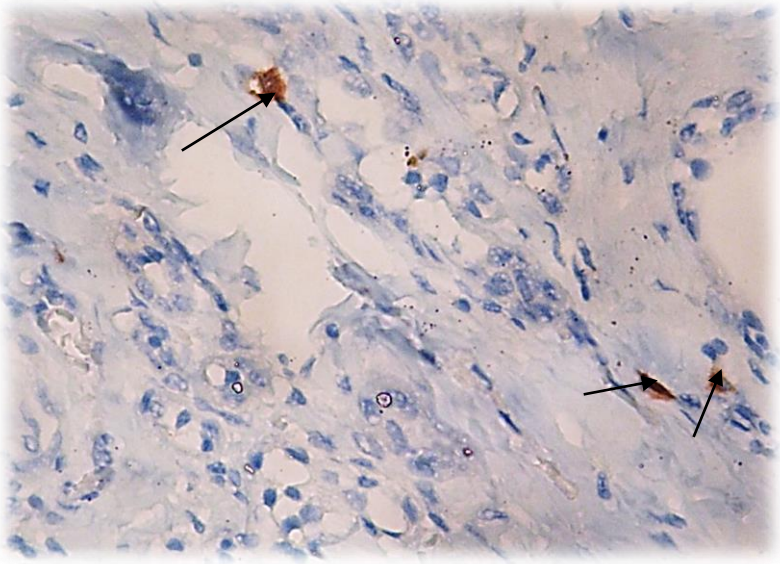


Figure 28 : Marquage de cellules inflammatoires, IHC PDL1, GRX20

✓ Dans 75 %, les lymphocytes ont exprimés faiblement PDL-1. (figure 29)

▪ **Cas 07 :**

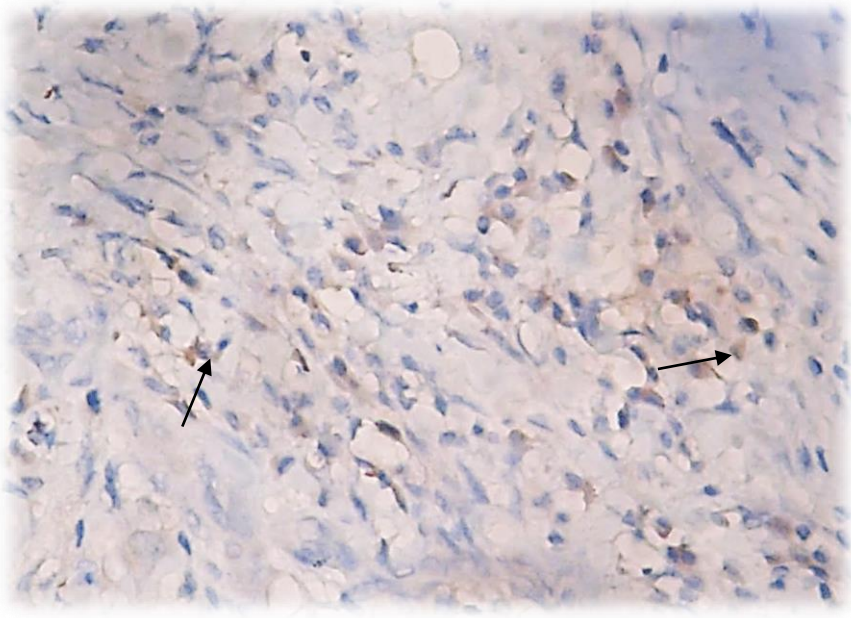


Figure 29: marquage faible des lymphocytes, GRX20 (flèche)

- ✓ Dans (12.5 %) des cas, les lymphocytes n'ont rien exprimés. (figure 30)
- **Cas 01 :**

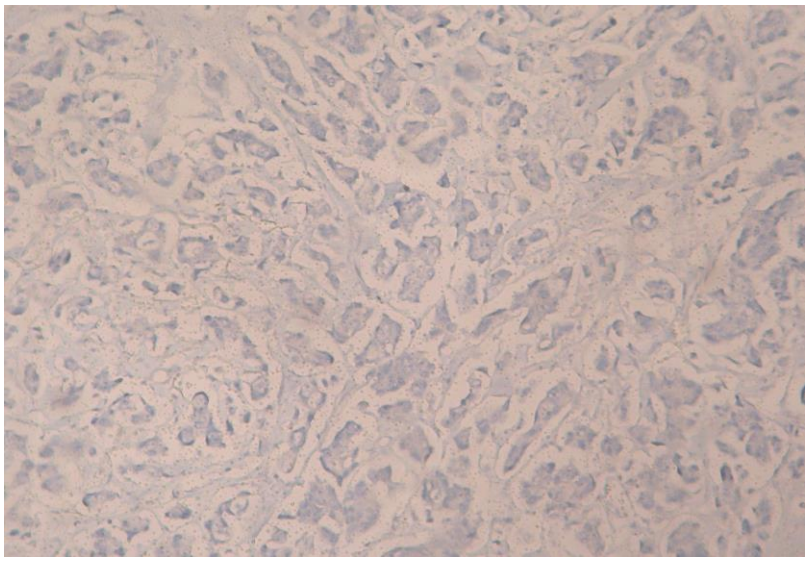


Figure 30: marquage négatif de PDL-1 sur les Lymphocytes ; GRX20

V. La corrélation entre l'infiltrat et les facteurs histopronosiques

Tableau 8: la corrélation entre l'infiltrat inflammatoire et les facteurs histopronostiques

Les caractères histopronosiques	Infiltrat inflammatoire			Coefficient de Corrélation
	+	++	+++	
Age				
<50 ans	25%(2 cas)	12.5% (1 cas)	12.5%(1cas)	0.51
>50 ans	12.5% (1cas)	37.5%(3 cas)	0%	
Taille tumorale				0.28
<5 cm	25%(2 cas)	12.5% (1 cas)	12.5%(1 cas)	
>5 cm	12.5% (1 cas)	37.5% (3 cas)	0%	
Grade SBR				0.76
II	25% (2 cas)	12.5%(1 cas)	0%	
III	12.5% (1 cas)	37.5%(3 cas)	12.5%(1cas)	

Selon le tableau 8, on trouve qu' :

- Il y a une corrélation moyenne entre l'âge et l'infiltrat inflammatoire (plus le coefficient de corrélation s'approche de 1 plus la corrélation est importante), l'infiltrat augmente avec l'âge
- Il y a une forte corrélation entre le Grade SBR et l'infiltrat, les tumeurs Triples Négatifs de Grade SBR III présentent un infiltrat inflammatoire riche par apport à la tumeur de Grade II
- Concernant la taille tumorale, il y'a une faible corrélation entre la taille tumorale et l'infiltrat, l'augmentation de la taille influence faiblement sur l'infiltrat.

VI. La corrélation entre l'expression de PDL- et les facteurs histopronosiques

Tableau 9 : la corrélation entre l'expression de PDL-1 et les facteurs histopronostiques.

Caractéristiques	PDL-1+	Coefficient de corrélation
Age		- 0.35
<50ans	50 %(4 cas)	
>50 ans	37.5 % (3 cas)	
Taille tumorale		0.53
<5 cm	37.5 % (3 cas)	
>5 cm	50 % (4 cas)	
Grade SBR		0.27
II	37.5 %(3 cas)	
III	50 % (4 cas)	

Le tableau 9 montre des résultats comme suit :

- Il y a une corrélation négative entre l'âge et l'expression de PD-L1, plus l'âge augmente (>50 ans), moins PD-L1 est exprimé.
- Il y a une faible corrélation entre le Grade SBR et l'expression de PDL-1.
- Concernant la taille tumorale, il y'a une moyenne corrélation avec l'expression de PDL-1.

IV. Expression de PDL-1 et TILS

Tableau 10 : L'expression de PDL-1 ^{t} et PDL-1 ^{l} avec l'infiltrat inflammatoire.

Cas	PDL-1t	PDL-1 i	Infiltrat inflammatoire
1	0%	0%	25%
2	0 %	1%	60%
3	0%	1%	<10 %
4	0%	1%	50 %
5	2%	5%	<10 %
6	0%	1%	50%
7	0%	1%	1%
8	1%	1%	25 %

PDL-1^{t} = PDL1 tumoral /PDL-1^{L}=PDL-1 lymphocytaire

Le seuil de positivité :

Pour le marquage de PDL-1 (PDL-1t ≥ 1 % / PDL-1 L ≥5 %)**.**

Pour l'infiltrat inflammatoire (TILs ≥50 %).

Selon le tableau 7, on peut classer nos cas en 3 groupes (tableau 11)

Tableau 11 : la répartition des cas en groupes selon l'infiltrat et l'expression de PDL-1

Groupe 01 Cas n°5/ cas n^0 8 **PDL-1+** ⇅ **TILs -**	**Groupe 02** Cas n^{0}3/1/7 **PDL-1-** ⇓⇓ **TILs -**
Groupe 03 Cas n^{0}2/4/ 6 **PDL-1-** ⇅ **TILs +**	

PDL-1+/TILs - : Cas n°5/ cas n^0 8, un marquage positif de PDL-1 avec un infiltrat faible <50 %.

PDL-1 -/TILs+ : Cas n^{0}2/4/6, marquage négatif de PDL-1 alors que l'infiltrat est important.> 50%

PDL-1 -/TILS - : Cas n^0 1/3/7, marquage négatif de PDL-1 alors que l'infiltrat est faible <50 %.

Notre travail a permet d'apprécier l'expression de PDL-1 clone E1L3N sur une série de cancer du sein Triple Négatif.

Nous nous sommes limités au cancer du sein Triple Négatif qui sont des tumeurs qui pourraient le plus tirer d'un bénéfice de l'immunothérapie en raison de l'absence d'une thérapie ciblée pour ce groupe de patientes, se sont aussi les formes les plus riches en cellules immunitaires.

En ce qui concerne les caractéristiques histopronostiques de nos patientes, nous avons travaillés sur 8 cas ou la moyenne d'âge est de 56 ans avec des extrêmes de 43 ans à 76 ans, Toutes les patientes présentent un carcinome canalaire infiltrant. 62.5 % des cas étaient de grade SBR III, et 62.5 % (5 cas) des cas sont N+. Concernant la taille, la moyenne est de 4.87 cm avec une tranche de taille allant de 2.5 cm à 12 cm.

En comparent ces caractéristiques avec celles de Rhiannon K Beckers en 2016, ils ont travaillés sur 481 patientes de CSTN métastatiques avec une moyenne d'âge de 57 ans, qui varie entre 28-89 ans , la majorité des tumeurs sont de grade III et 62.5 % (5 cas) sont N+, alors que la taille varie entre 2 cm et plus de 5 cm.(Beckers et al. 2016).

Après la lecture des lames HE et la quantification de l'infiltrat inflammatoire, on constate qu'il ya quatre patientes (50 %) qui présentent un taux égal ou supérieur de 50% de lymphocytes infiltrants (TILs). Selon le travail de Gracia et al , les tumeurs riches en infiltrat inflammatoire sont nommé cancer du sein à infiltrat inflammatoire prédominant et elles sont associé à un meilleur pronostic (García-Teijido et al. 2016).

En 2014, Sylvia Adams et al. Ont démontrés que le nombre de TILs dans le stroma est un facteur de pronostic majeur des TNBC, plus le nombre de TILS augmente, plus le pronostic est meilleur. (Adams et al. 2014) .

Ils ont considérés aussi les TILs comme un facteur de prédiction pour la chimiothérapie et l'immunothérapie : en 2015, Denkert et al ont trouvés qu'il existe une association entre le taux de TILs et l'importance du bénéfice de la chimiothérapie (Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R 2015). Alors que récemment en septembre 2017, ils ont annoncés que le taux de TILs peut être utilisé comme un facteur de prédiction de la réponse à la monothérapie PDL-1 (Pembroluzumab). Plus les patientes présentent un infiltrat

inflammatoire plus elles peuvent répondre au traitement.(Merck & Co., Inc., Kenilworth 2017).

Selon nos résultats, on trouve qu'il y une corrélation positive entre l'âge et l'infiltrat inflammatoire , alors que Tian montre une corrélation négative(Tian et al. 2016) , Botti trouve qu'il y a aucune corrélation entre les deux paramètres (Botti et al. 2017).

En ce qui concerne le grade histologique , il y a une forte corrélation entre le grade et l'infiltrat inflammatoire , les tumeurs de grade III expriment plus d'infiltrat que de grade II , alors qu'il y a une faible corrélation entre la taille tumorale et l'infiltrat inflammatoire , ces résultats sont analogues à ceux de Tian Tian et al (Tian et al. 2016) (Beckers et al. 2016)

Notre travail a permis de mettre au point la technique immunohistochimie de PDL-1 par un automate.

La mise en point qui a été nécessaire sur le clone PDL-1 E1L3N confirme que la phase de démasquage antigénique reste le point critique. Les premiers lames testées avec l'anticorps sur du placenta ont montrées un marquage peut intense et hétérogène ; une optimisation de Protocol sur ventana a été faite en modifiant les temps et la température de démasquage.

Nos résultats montrent une expression hétérogène de PDL-1, cette expression est membranaire ,cela est appuyé par les travaux de Mittendorf EA et al en 2014 (Herbst et al. 2014), alors que d'autres travaux disent que le marquage est membranaire et cytoplasmique.(Beckers et al. 2016)

62.5 % des cas (5 cas) ont une expression faible. Selon le protocole standard de pdl1 , la faible expression peut être lier au protocole expérimental qui n'est pas bien optimisé ou les techniques , les kits et les réactifs utilisés qui diffèrent entre les laboratoires .(Dako/Agilent 2016)

Selon Xie et al , plus le bloc de paraffine est ancien , plus l'expression est faible , cette diminution est due à la dégradation des tissues et les protéines à cause de l'oxydation (Xie et al. 2011), cela peut être appuyé sur nos résultat , les blocs existe depuis 2015 .Ce facteur peut être un des causes de la faible expression de PDL-1.

Selon Rhiannon K Beckers, ou ils ont utilisé le même clone E1L3N PDL1 sur 7000 patientes avec un cancer du sein TN ou 40 % des cas présentent un cancer métastatique , ils ont

trouvés un marquage sur les cellules tumorale faible de 7 % , concernant le marquage sur les cellules immunitaires était de 93%..(Beckers et al. 2016).

D'après une autre série faite par Hitomi Mor et al sur 248 patientes qui présentent un CSTN non métastatique, le marquage est 100 % membranaire avec un pourcentage de 41.5 % sur les cellules tumorales et de 47.5 % sur les cellule immunitaires .(Mori et al. 2017) .

Selon les travaux de Lei Guo et al, ou ils ont étudiées 183 cas de CSTN, L'expression de PD-L1 par des cellules immunitaires a été observée chez 4,9% (9/183) de TNBC, alors que l'expression par cellules tumorales représentait 8,7% (16/183).

D'après Tung et ses collègues, ils ont constatés que 26% des TNBC (51/193) ont exprimés la PD-L1 à la surface des cellules cancéreuses et immunitaires (tung and al ,2017).

Cette différence de pourcentage d'expression de PDL-1 sur les cellules immunitaires et tumorales est due probablement à la non standardisation des seuils de positivités .(Mori et al. 2017)

L'étude de la corrélation entre les facteurs histopronostiques et l'expression de PDL-1 ne retrouve pas de corrélation entre l'âge et l'expression de PDL-1, il est fortement exprimé chez les patientes jeunes , ces résultats s'accordent avec celui de Mauricio Z et l (Baptista et al. 2015).

Concernant la taille , aucune corrélation existe avec l'expression de PDL-1 , ces données sont appuyés par les travaux de (Mori et al. 2017)

Comment sélectionner les patients qui peuvent bénéficier de l'immunothérapie anti pd1-pdl1 est –ce que c'est suffisant de se baser sur l'expression de pdl1 pour trier ces patientes ?

D'après nos résultats et le travail de Teng et al , (Teng et al. 2015), on a divisé les cas en 3 classes selon le pourcentage de TIL et PDL-1 ,chaque groupe peut bénéficier d'un traitement différent :

1/PDL-1 +/ TILs - : on classe deux cas dans ce groupe. Ce groupe est caractérisé par un marquage PDL-1 positif et un infiltrat inflammatoire faible <50 %. Elles sont associés à un mauvais pronostic, Cela peut se produire lorsque le PDL-1 est exprimé d'une façon constitutive sur les cellules cancéreuses, elles ont une hyper-activation de la voie intrinsèque PI3K-AKT –mtor dans la cellule tumorale qui induit une surexpression de PDL-1 voir la

synergie des TILs. Ce groupe ne peut pas répondre à l'immunothérapie de PDL-1 seulement à cause du manque de TILs au stroma tumorale (Teng et al. 2015) (Mori et al. 2017), récemment en septembre 2017,l'équipe de Kok a publié le premier travail d'une thérapie combinée faite sur le triple négatif métastatique ,ils ont trouvé des résultats prometteurs en administrant l'anticoprs anti PD-1(Nivolumab)après avoir moduler le microenvironnement tumoral par la chimiothérapie .(Pink Ribbon 2017).

2/PDL-1 -/TILs+ : on a quatre cas dans ce groupe, ces patientes ont un micro environnement tolérogène (c'est la tolérance immunitaire), il existe un taux important de TILs, les cellules tumorales utilisent d'autre mécanismes immunosuppressifs autre que la voie de PD1/PDL1 pour s'échapper. les approches thérapeutique pour ce groupe restent en cours de développement .(Teng et al. 2015)

3/ les tumeurs PDL-1-/TILS - : nous avons deux cas, où l'environnement tumoral est pauvre en infiltrat, elles ont un pronostic très pauvre en raison de leur manque de réaction immunitaire détectable. Dans ce groupe de patientes, une monothérapie n'est pas suffisante à cause de l'absence d'infiltrat des lymphocytes T préexistants. Mais une thérapie combinée afin d'attirer les cellules T vers les tumeurs et éviter qu'elles soient désactivées, comme la combinaison d'anti-CTLA-4 et anti-PD-1, serait considérée dans ce scénario. Un essai récent combinant les inhibiteurs du point de contrôle ipilimumab (anti-CTLA-4)et nivolumab (PD-1) a rapporté des taux de réponse de 45 à 50%, caractérisés par une régression tumorale rapide et profonde dans une proportion importante de patients atteints de mélanome avancé (Teng et al. 2015),(Mori et al. 2017)

D'après les travaux de Teng et al, ils ont trouvés 4 groupes, mais d'après nos cas, il nous manque :

4/Tumeurs PDL-1+/TILs+ : Les cellules T sont présentes en nombre suffisant à l'intérieur de la tumeur, induisent une expression adaptative de PD-L1, les patients peuvent être plus susceptibles de réagir au blocage de PD-1 / L1. Par conséquent, il faut une évaluation quantitative de la présence de TIL et de PD-L1 dans les biopsies pour obtenir les informations prédictives souhaitées.(Teng et al. 2015) . C'est des tumeurs de bon pronostique, ils ont trouvé que ces tumeurs sur-expriment la voie FNGRs/JAK/STAT dans la cellule tumorale suite a INF y libéré par les TILs stromales(Mori et al. 2017a). Le premier essai clinique complet réalisé par Nanda et al en 2014 sur 30 cas de triples négatifs métastatiques avec un taux de réponse 18 % en administrant anti PD1 (pembrolizumab) (Nanda et al. 2016).

Selon le marquage de nos lames, on note que 62.5% des cas (5 cas), expriment PDL-1 sur les TILs alors que les cellule tumorales sont négatives ,Récemment ils ont trouvés que ce type d'expression est un facteur de pronostic favorable pour le cancer du sein(Botti et al. 2017) et le cancer colorectal .La signification biologique pour ce type d'expression reste inconnue maisselonJanis M. Taube et al , cette expression est due au système immunitaire inné et adaptative et compris les facteurs solubles , le type de cancer et la composition du stroma , tous ces facteurs favorisent l'expression de PDL-1 par les cellules immunitaires seulement (Taube et al. 2014).

Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence l'expression de PD-L1 sur les cellules tumorales et immunitaires, à l'aide de l'immunohistochimie réalisée à l'aide de l'anticorps monoclonal PDL1 E1L3N.

A notre connaissance il s'agit de la première étude en Algérie réalisé à la recherche de l'expression de PDL1 sur des tumeurs triples négatives du sein. Nous avons retrouvé un marquage non homogène faible dans certain cas. Notre étude statistique est très restreinte à cause de faible nombre des cas, nos résultats ne sont pas statistiquement fiables,

Une corrélation entre les facteurs histopronostique avec l'infiltrat inflammatoire et l'expression de PD-L1 a été réalisée, dans le but de savoir si ces facteurs influencent le taux de l'infiltrat inflammatoire et l'expression de PD-L1.

L'immunohistochimie anti-PD-L1 représente à ce jour une approche à proposer en oncologie mammaire comme biomarqueur prédictif de l'immunothérapie ciblant l'axe PD-1/PD-L1. Tout le monde s'accorde à dire que cette approche est non satisfaisante et imparfaite. En effet, des patientes ne présentant pas d'expression de PD-L1 peuvent parfois répondre aux molécules ciblant PD-1/PD-L1 et à l'inverse des patients exprimant fortement PD-L1 peuvent ne pas être des bons répondeurs.

Il est nécessaire d'intégrer l'évaluation des TILs dans les examens cliniques de routines, il représente un élément indicatif d'une meilleur survie et prédictif pour identifier les patientes qui répond mieux à l'immunothérapie.

La perspective de nouvelles analyses peut également être considérée. En effet, il paraît important d'étudier la relation entre l'expression de PDL-1 chez les patientes porteuses de mutation de BRCA1 dans la plupart des cancers du sein TN familiale, afin de pouvoir mieux les cibler.

D'autre part, l'analyse des altérations situées dans les voies de signalisation, telles que Pten , il est sous exprimé dans ce type de cancer et il induit la surexpression de PDL-1 par les cellules tumorales , c'est intéressant d'étudier l'expression de PDL-1 associé à celle de Pten qui représente une stratégies thérapeutique pour CSTN.

Nos résultats restent préliminaires mais encourageants, il sera intéressant d'élargir cette série afin de mieux apprécier l'expression de PDL1, et d'introduire nos patientes dans des essais cliniques internationales qui testent les différents anticorps.

L'immunothérapie pour tous n'est pas envisageable et il faudra bien un jour sélectionner les patients qui pourront au mieux bénéficier de ces thérapeutiques.

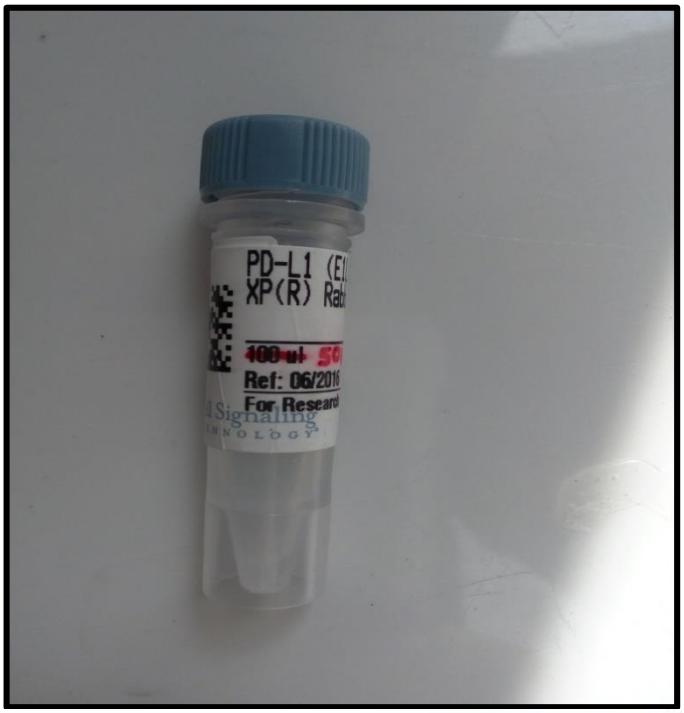


Annexe 01 : Les étapes de la préparation des lames pour la réalisation des deux techniques. (a) : Analyse macroscopique des tumeurs, **(b) :** Déshydratation dans l'automate, **(c) :** Inclusion en paraffine, **(d), (e), (f) :** Obtention des coupes sur des lames passant une nuit dans l'étuve.

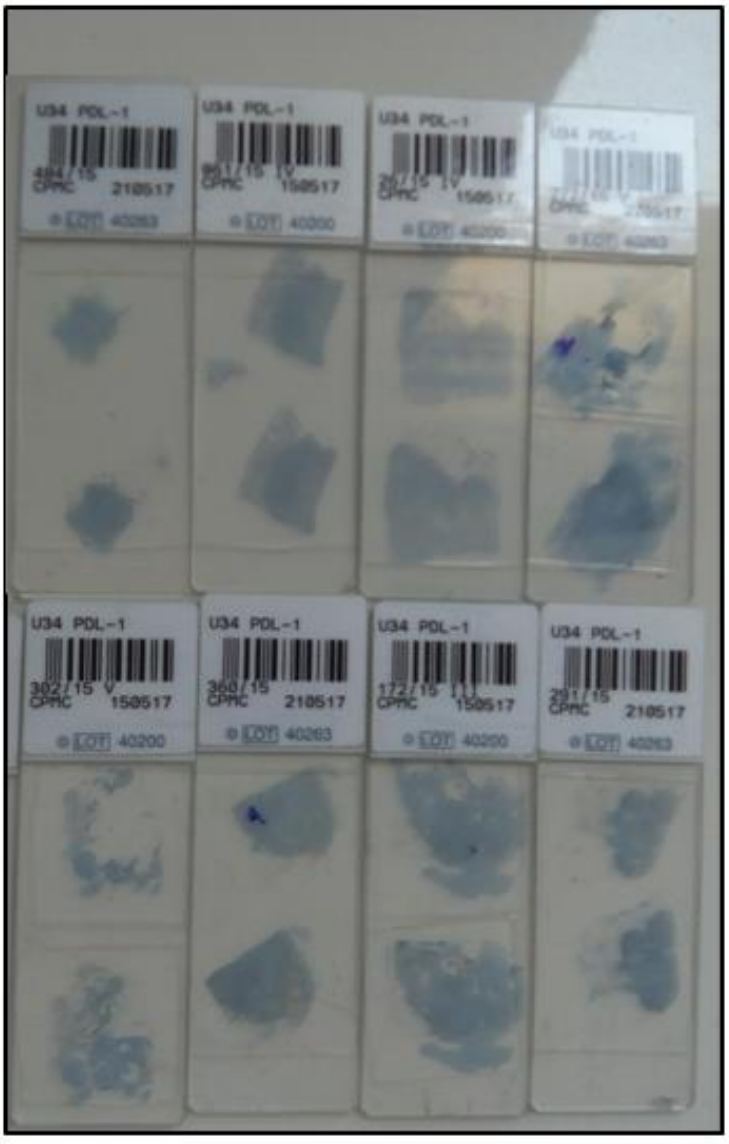
Annexe II : Anticorps PDL-1

/le clone E1L3N

Ref : 06/2016



Annexe III : la série des lames





Annexe IV : les réactifs nécessaires au marquage, DAB Inhibitor, HRP Multimer, DAB Chromogen, DAB H2O2, Copper.



Annexe V : la solution EZ Prep ,ref :950-102



Annexe VI : Réaction Buffer concentrate .ref :950-126



Annexe VII: solution CC1 , réf :950-126

P N0	Pas d'envahissement ganglionnaire
P N1	Envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou 1 ganglion mammaire interne
P N2	Envahissement de 4 à 9 ganglions axillaires
P N3	Envahissement de plus de 10 ganglions axillaires

Tableau 03 :la classification de statut ganglionnaire par la classification ATM(Galant et al. 2010)

Abdelaziz BOUKHARI. 2012. *Role des mastocytes dans le developpement des astrocytomes humains :implication du recepteur CD47*. université de STRATBOURG

Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. 2008. *Abeloff's Clinical Oncology*. Elsevier Health Sciences

Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, et al. 2014. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *J. Clin. Oncol.* 32(27):2959–66

Al-Sader H, Abdul-Jabar H, Allawi Z, Haba Y. 2009. Alcohol and Breast Cancer: The Mechanisms Explained. *J Clin Med Res @BULLET*. 1(3):125–31

Al DHK◉ and SP et. 2009. Terminal ductal lobular unit

Azim HA, Michiels S, Bedard PL, Singhal SK, Criscitiello C, et al. 2012. Elucidating Prognosis and Biology of Breast Cancer Arising in Young Women Using Gene Expression Profiling. *Clin. Cancer Res.* 18(5):1341–51

Badoual C, Combe P, Gey A, Granier C, Roussel H, et al. 2013. Signification et intérêt clinique de l'expression de PD-1 et PDL-1 dans les tumeurs. *Medecine/Sciences*. 29(6–7):570–72

Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, et al. 2011. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod. Pathol.* 24(2):157–67

Baptista MZ, Sarian LO, Derchain SFM, Pinto GA, Vassallo J. 2015. Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in. *Hum. Pathol.*

Beckers RK, Selinger CI, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, et al. 2016. Programmed death ligand 1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. . 25–34

Beckers RK, Selinger C, Vilain R, Madore J, Wilmott JS, et al. 2016. PDl1 expression in triple-negative breast cancer is associated with tumour-infiltrating lymphocytes and improved outcome. *Pathology*. 48:S146–47

Bianchini G, Balko JM, Mayer IA, Sanders ME. 2016. Triple-negative breast cancer : challenges and opportunities of a heterogeneous disease. *Nat. Publ. Gr.* 13(11):674–90

Bland KI. 2011. *Surgery in Breast Cancer and Melanoma*. Springer

Boire A, Covic L, Agarwal A, Jacques S, Sherifi S, Kuliopulos A. 2005. PAR1 Is a Matrix Metalloprotease-1 Receptor that Promotes Invasion and Tumorigenesis of Breast Cancer Cells. *Cell*. 120(3):303–13

Botti G, Collina F, Scognamiglio G, Rao F, Peluso V, et al. 2017. Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) Tumor Expression Is Associated with a Better Prognosis and Diabetic Disease in Triple Negative Breast Cancer Patients. . 1:1–10

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, et al. 2006. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 295(21):2492

Carmichael AR. 2006. Obesity as a risk factor for development and poor prognosis of breast cancer. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* 113(10):1160–66

Chandrakanth Are, MBBS, MBA, FRCS F. 2015. *Cancer on the Global Stage: Incidence and Cancer-Related Mortality in Algeria - The ASCO Post*. http://www.ascopost.com/issues/november-10-2015/cancer-on-the-global-stage-incidence-and-cancer-related-mortality-in-algeria/

Chinai JM, Janakiram M, Chen F, Chen W, Kaplan M, Zang X. 2015. New immunotherapies targeting the PD-1 pathway. *Trends Pharmacol. Sci.* 36(9):587–95

Cochaud S, Giustiniani J, Thomas C, Laprevotte E, Garbar C, et al. 2013. IL-17A is produced by breast cancer TILs and promotes chemoresistance and proliferation through ERK1/2. *Sci. Rep.* 3:3456

Cook MT, Liang Y, Besch-Williford C, Hyder SM. 2017. Luteolin inhibits lung metastasis, cell migration, and viability of triple-negative breast cancer cells. *Breast cancer (Dove Med. Press.* 9:9–19

Coujard R, Poirier J, Racadot J (Jean). 1980. *Précis D'histologie Humaine*. Masson

Dako/Agilent. 2016. PD-L1 IHC 28-8 pharmDx: Interpretation Manual: Non-Squamous Non-Small Cell Lung Cancer. *Education*

DeCensi A, Gennari A. 2011. Insulin breast cancer connection: Confirmatory data set the stage for better care. *J. Clin. Oncol.* 29(1):7–10

DeNardo DG, Coussens LM. 2007. Inflammation and breast cancer. Balancing immune response: crosstalk between adaptive and innate immune cells during breast cancer progression. *Breast Cancer Res.* 9(4):212

Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R et al. 2015. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Clin. Oncol.*

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, et al. 2007. Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Features and Patterns of Recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13(15):4429–34

Desantis C, Siegel R, Jemal A. 2015. Breast cancer Facts and Figures 2015-2016

Dimri G, Band H B V. 2005. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. Breast Cancer Res 7: 171-179 Article · Feb 2005 · Breast cancer research: B. *Br. J. Cancer*

Disis ML, Stanton SE. 2015. Triple-Negative Breast Cancer: Immune Modulation as the New Treatment Paradigm. *Am. Soc. Clin. Oncol. Educ. B.* 35:e25–30

Erebi Patricia Tawari B. 2016. Investigation of chemoresistant mechanisms in triple negative breast cancer cell lines and development of a nano-enabled Disulfiram for breast cancer treatment KNOWLEDGE ▪ INNOVATION ▪ ENTERPRISE

Eroles P, Bosch A, Alejandro Pérez-Fidalgo J, Lluch A. 2012. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* 38(6):698–707

Fife BT, Bluestone JA. 2008. Control of peripheral T-cell tolerance and autoimmunity via the CTLA-4 and PD-1 pathways. *Immunol. Rev.* 224(1):166–82

Finally, targeted therapies for triple-negative breast cancer: Promising clinical trials of IMMU-132, vantictumab and atezolizumab against TNBC -- ScienceDaily. 2016. https://www.sciencedaily.com/releases/2016/06/160604050637.htm

Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, et al. 2009. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. *J. Exp. Med.* 206(13):3015–29

Galant C, Berlière M, Leconte I, Marbaix E. 2010. Nouveautés dans les facteurs histopronostiques des cancers du sein. *Imag. la Femme*. 20(1):9–17

Garaka Rabel. 2009. *The Anatomy of Breast*

García-Teijido P, Cabal ML, Fernández IP, Pérez YF. 2016. Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Triple Negative Breast Cancer: The Future of Immune Targeting. *Clin. Med. Insights. Oncol.* 10(Suppl 1):31–39

Gatalica Z, Snyder C, Maney T, Ghazalpour A, Holterman DA, et al. 2014. Programmed cell death 1 (PD-1) and its ligand (PD-L1) in common cancers and their correlation with molecular cancer type. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 23(12):2965–70

Grade of Breast Cancer

Grenier J1, Soria JC, Mathieu MC, Andre F, Abdelmoula S, Velasco V, Morat L, Besse B, Dunant A, Spielmann M DS. 2007. Differential immunohistochemical and biological profile of squamous cell carcinoma of the breast

He J, Hu Y, Hu M, Li B. 2015. Development of PD-1/PD-L1 Pathway in Tumor Immune Microenvironment and Treatment for Non-Small Cell Lung Cancer. *Sci. Rep.* 5:13110

Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, et al. 2014. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 515(7528):563–67

Iii T, Sabatier P. 2010. Doctorat de l'université de toulouse

Iii T, Sabatier P. 2011. T h è s e

Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. 1992. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J.* 11(11):3887–95

Jerusalem G, Collignon J, Schroeder H, Lousberg L. 2016. Triple-negative breast cancer: treatment challenges and solutions. *Breast Cancer Targets Ther.* 8:93

Jin L. 2015. Fighting Cancer from Within: The emerging immunotherapy paradigm of cancer treatment

Johanna A. Joyce & Jeffrey W. Pollard. 2009. Figure 1 : Microenvironmental regulation of

metastasis : Nature Reviews Cancer. *Nature*

Keir ME, Butte MJ, Freeman GJ, Sharpe AH. 2008. PD-1 and Its Ligands in Tolerance and Immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26(1):677–704

Kerr DJ, Haller DG, van de Velde CJH, Baumann M, eds. 2016. *Oxford Textbook of Oncology*. Oxford University Press

Landskron G, De la Fuente M, Thuwajit P, Thuwajit C, Hermoso MA. 2014. Chronic inflammation and cytokines in the tumor microenvironment. *J. Immunol. Res.* 2014:149185

Lange CA, Yee D. 2008. Progesterone and Breast Cancer. *Women's Heal.* 4(2):151–62

Lu P, Weaver VM, Werb Z. 2012. The extracellular matrix: a dynamic niche in cancer progression. *J. Cell Biol.* 196(4):395–406

Mahshid Ghoncheh, Zahra Pournamdar, Hamid Salehiniya. 2016. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pacific J. Cancer Prev. Cancer Control West. Asia Spec. Issue J Cancer Prev Cancer Control West. Asia Spec. Issue*. 17(17):43–46

Makki J. 2015. Diversity of breast carcinoma: Histological subtypes and clinical relevance. *Clin. Med. Insights Pathol.* 8(1):23–31

Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. 2010. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. *Cancer Biol. Ther.* 10(10):955–60

Mantovani A, Sica A, Allavena P, Garlanda C, Locati M. 2009. Tumor-associated macrophages and the related myeloid-derived suppressor cells as a paradigm of the diversity of macrophage activation. *Hum. Immunol.* 70(5):325–30

Mao Y, Keller ET, Garfield DH, Shen K, Wang J. 2013. Stromal cells in tumor microenvironment and breast cancer. *Cancer Metastasis Rev.* 32(1–2):303–15

Marieb EN, Hoehn K. 2013. *Human Anatomy & Physiology*. Pearson

Maskarinec G, Woolcott CG, Kolonel LN. 2010. Mammographic density as a predictor of breast cancer outcome. *Future Oncol.* 6(3):351–54

Mathieu M, Cotta-Grand N, Daudelin J-F, Thébault P, Labrecque N. 2013. Notch signaling regulates PD-1 expression during CD8+ T-cell activation. *Immunol. Cell Biol.* 91(1):82–88

Merck & Co., Inc., Kenilworth N. 2017. TIL Levels Signal Pembrolizumab Response in Metastatic TNBC

Migali C, Milano M, Trapani D, Criscitiello C, Esposito A, et al. 2016. Strategies to modulate the immune system in breast cancer: checkpoint inhibitors and beyond. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 8(5):360–74

Moinfar F. 2007. *Essentials of Diagnostic Breast Pathology : A Practical Approach*. Springer

Mombelli S. 2014. Cancers du sein et Immunologie anti-tumorale. . (547):184

Mori H, Kubo M, Yamaguchi R, Nishimura R. 2017a. The combination of PD-L1 expression and decreased tumor- infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. . 8(9):15584–92

Mori H, Kubo M, Yamaguchi R, Nishimura R, Osako T, et al. 2017. The combination of PD-L1 expression and decreased tumor-infiltrating lymphocytes is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Oncotarget*. 8(9):15584–92

N.GHERIB; A.KOUCHKAR et l. 2015. Les cancers du sein triple négatif

Nanda R, Chow LQM, Dees EC, Berger R, Gupta S, et al. 2016. Pembrolizumab in Patients With Advanced Triple-Negative Breast Cancer: Phase Ib KEYNOTE-012 Study. *J. Clin. Oncol.* 34(21):2460–67

Nieman KM, Romero IL, Van Houten B, Lengyel E. 2013. Adipose tissue and adipocytes support tumorigenesis and metastasis. *Biochim. Biophys. Acta*. 1831(10):1533–41

Nkondjock A, Ghadirian P. 2005. Facteurs de risque du cancer du sein. . 21:

Oakman C, Viale G, Di Leo A. 2010. Management of triple negative breast cancer. *The Breast*. 19(5):312–21

Ohaegbulam KC, Assal A, Lazar-Molnar E, Yao Y, Zang X. 2015. Human cancer immunotherapy with antibodies to the PD-1 and PD-L1 pathway. *Trends Mol. Med.* 21(1):24–33

Park K, Han S, Kim HJ, Kim J, Shin E. 2006. HER2 status in pure ductal carcinoma in situ and in the intraductal and invasive components of invasive ductal carcinoma determined by fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. *Histopathology*. 48(6):702–7

Patsoukis N, Bardhan K, Chatterjee P, Sari D, Liu B, et al. 2015. PD-1 alters T-cell metabolic reprogramming by inhibiting glycolysis and promoting lipolysis and fatty acid oxidation. *Nat. Commun.* 6:6692

Pattabiraman DR, Weinberg RA. 2014. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13(7):497–512

Pattabiraman DR, Weinberg RA. 2014. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? *Nat. Rev. Drug Discov.* 13(7):497–512

Pink Ribbon and B-MS. 2017. Promising Response Rates in Patients with Metastatic TNBC Treated with Nivolumab After Induction Treatment

Pronostic et survie pour le cancer du sein - Société canadienne du cancer

Puddu M, Tafforeau J. IPH/EPI Reports Nr. 2005 -001 Opportunité de dépistage du cancer du sein chez les femmes de 40 à 49 ans Etat des connaissances et données disponibles pour le développement d'une politique de santé en Belgique

Puddu M, Tafforeau J. 2005. Opportunité de dépistage du cancer du sein chez les femmes de 40 à 49 ans Etat des connaissances et données disponibles pour le développement d'une politique de santé en Belgique. *Inst. Sci. Santé publique*. (2005–001):

Quail DF, Joyce JA. 2013. Microenvironmental regulation of tumor progression and

metastasis. *Nat Med*. 19(11):1423–37

Radosevic-Robin N. 2016. Classif_histo moléculaire_cancers_sein_triple_négatif___Correspondances_Oncothéranostic_2015.pdf

Richardson RD& AWV& AWMM& RT& P. 2014. Gray's Anatomy for Students

Robbins SL (Stanley L, Kumar V, Cotran RS. 2010. *Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease.* Saunders/Elsevier

Russo J. 2016. The Pathobiology of Breast Cancer. . 111–16

S. Giacche> et A. de Roquancourt. 2015. Rôle de l'infiltrat lymphocytaire dans les cancers du sein (TIL)

Sakaguchi S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell*. 101(5):455–58

Sanae MC, Obtention PL, Doctorat DU, Medecine EN. 2009. LA CLASSIFICATION MOLÉCULAIRE

Santarpia M, Karachaliou N. 2015. Tumor immune microenvironment characterization and response to anti-PD-1 therapy. *Cancer Biol. Med.* 12(2):74–78

Schnitt SJ, Collins LC. 2015. *Biopsy Interpretation of*

Sharma GN, Dave R, Sanadya J, Sharma P, Sharma KK. 2010. Various types and management of breast cancer: an overview. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.* 1(2):109–26

Shimoda M, Mellody KT, Orimo A. 2010. Carcinoma-associated fibroblasts are a rate-limiting determinant for tumour progression. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21(1):19–25

Shin DS, Zaretsky JM, Escuin-Ordinas H, Garcia-Diaz A, Hu-Lieskovan S, et al. 2017. Primary resistance to PD-1 blockade mediated by JAK1/2 mutations. *Cancer Discov.* 7(2):188–201

Sjoblom T, Jones S, Wood LD, Parsons DW, Lin J, et al. 2006. The Consensus Coding Sequences of Human Breast and Colorectal Cancers. *Science (80-.).* 314(5797):268–74

Smith J, Robida MD, Acosta K, Vennapusa B, Mistry A, et al. 2016. Quantitative and qualitative characterization of Two PD-L1 clones : *Diagn. Pathol.* 1–9

Solinas G, Germano G, Mantovani A, Allavena P. 2009. Tumor-associated macrophages (TAM) as major players of the cancer-related inflammation. *J. Leukoc. Biol.* 86(5):1065–73

Solinas G, Marchesi F, Garlanda C, Mantovani A, Allavena P. 2010. Inflammation-mediated promotion of invasion and metastasis. *Cancer Metastasis Rev.* 29(2):243–48

Stagg J, Allard B. 2013. Immunotherapeutic approaches in triple-negative breast cancer: latest research and clinical prospects. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 5(3):169–81

Staron MM, Gray SM, Marshall HD, Parish IA, Chen JH, et al. 2014. The transcription factor FoxO1 sustains expression of the inhibitory receptor PD-1 and survival of antiviral CD8(+) T cells during chronic infection. *Immunity*. 41(5):802–14

Taube JM, Klein AP, Brahmer JR, Xu H, Pan X, et al. 2014a. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.*

Taube JM, Klein A, Brahmer JR, Xu H, Pan X, et al. 2014b. Association of PD-1, PD-1 ligands, and other features of the tumor immune microenvironment with response to anti-PD-1 therapy. *Clin. Cancer Res.* 20(19):5064–74

Tavassoéli F.A DP. 2003. Tumors of the breast and femal genital organs

Taylor P. 2014. Revisiting the antitumor immune response potential in breast cancer PD-L1 expression and tumor-infiltrating lymphocytes. . (May 2015):1–4

Teng MWL, Foong Ngiow S, Ribas A, Smyth MJ. 2015. Classifying cancers based on T cell infiltration and PD-L1

Tian T, Ruan M, Yang W, Shui R. 2016. Evaluation of the prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers. *Oncotarget*. 7(28):44395–405

Topalian SL, Taube JM, Anders RA, Pardoll DM. 2016. Mechanism-driven biomarkers to guide immune checkpoint blockade in cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer*. 16(5):275–87

Tortora GJ, Derrickson B. 2014. *Principles of Anatomy & Physiology*

Travis RC, Key TJ. 2003. Oestrogen exposure and breast cancer risk. *Breast Cancer Res.* 5(5):239–47

Uscanga-Perales GI, Santuario-Facio SK, Ortiz-López R. 2016. Triple negative breast cancer: Deciphering the biology and heterogeneity. *Med. Univ.* 18(71):105–14

Verret B, Loirat D. 2016. Immunothérapie et cancer du sein. *Oncologie*. 18(9–10):551–58

Vincent-Salomon BS-Z. 2009. Precision Molecular Pathology of Breast Cancer

Walavalkar V, Khan A, Kandil D. 2015. Familial Breast Cancer and Genetic Predisposition in Breast Cancer. , pp. 15–37

WANG YY. 2013. T h è s e

What Is Cancer? - National Breast Cancer Foundation. 2016. http://www.nationalbreastcancer.org/what-is-cancer

Wimberly H, Brown JR, Schalper K, Haack H, Silver MR, et al. 2015. PD-L1 Expression Correlates with Tumor-Infiltrating Lymphocytes and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer. *Cancer Immunol. Res.* 3(4):326–32

Xie R, Chung J-Y, Ylaya K, Williams RL, Guerrero N, et al. 2011. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. *J. Histochem. Cytochem.* 59(4):356–65

Yersal O, Barutca S. 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J. Clin. Oncol.* 5(3):412–24

Yokosuka T, Takamatsu M, Kobayashi-Imanishi W, Hashimoto-Tane A, Azuma M, Saito T.

2012. Programmed cell death 1 forms negative costimulatory microclusters that directly inhibit T cell receptor signaling by recruiting phosphatase SHP2. *J. Exp. Med.* 209(6):1201–17

Young B (Pathologist), O'Dowd G, Woodford P. 2013. *Wheater's Functional Histology : A Text and Colour Atlas.*

Zilberstein Y, Lavy A, Nagler A, Genin O, Pines M. 2012. Involvement of Host Stroma Cells and Tissue Fibrosis in Pancreatic Tumor Development in Transgenic Mice. *PLoS One*. 7(7):e41833

Zou W. 2005. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nat. Rev. Cancer*. 5(4):263–74