



ROYAUME DU MAROC  
*Université Mohammed V - Rabat*  
*Faculté de Médecine et de Pharmacie*  
RABAT



Année 2021

N°: MM0172021

MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »  
OPTION : « BIOMEDICALE »

Intitulé

**Le Statut PD-L1 dans le cancer  
du sein triple négatif**

Présenté par :

**CHTATI En-nacer**

Soutenu Le :

**15/06/2022**

Devant le jury composé de :

**Pr. IBRAHIMI Azeddine**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Président

**Pr. EL KHANNOUSSI Basma**, Institut national d'oncologie, Encadrante

**Pr. CHAHDI Hafsa**, Hopital Militaire Mohamed V de Rabat, examinatrice

**Pr. OUADGHIRI Mouna**, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, Examinatrice



## **REMERCIEMENTS**

JE TIENS TOUT D'ABORD À REMERCIER MES CHERS PARENTS ET MA FEMME POUR TOUS LES SACRIFICES QU'ILS ONT FAIT ET LEURS CONSTANTS ENCOURAGEMENTS TOUT AU LONG DE MON PARCOURS.

AU PR. BASMA EL KHANNOUSSI MON CHEF DE SERVICE ET MON ENCADRANTE AU SERVICE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE DE L'INSTITUT NATIONAL D'ONCOLOGIE DE RABAT POUR SON ENCADREMENT, SON SOUTIEN, M'AVOIR ACCUEILLI AU SEIN DE SON LABORATOIRE, ET SES ENCOURAGEMENTS. PERMETTEZ-MOI DE VOUS PRÉSENTER DANS CE TRAVAIL LE TÉMOIGNAGE DE MA RECONNAISSANCE ET RESPECT.

AU DR. KHMOU MOUNA , MÉDECIN SPÉCIALISTE EN ANATOMIE PATHOLOGIE, MME MOUNJID CHAIMAA, DOCTORANTE À LA FACULTÉ DES SCIENCES. RABAT, POUR M'AVOIR AIDÉ PENDANT TOUT LE TRAVAIL, POUR VOS CONSEILS PERTINENTS ET VOTRE PROFONDE GENTILLESSE, C'ÉTAIT UN RÉEL PLAISIR DE TRAVAILLER AVEC VOUS ET IL SERA TOUJO.

A MR. YASSARA SOUFIANE, MME IMANE BOUDALAA, MME IMANE EDDAHBY, MME CHBIHI FATIMA ZAHRA QUI SE SONT TOUJOURS MONTRÉS À L'ÉCOUTE ET TRÈS DISPONIBLES TOUT AU LONG DE LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE DE L'INSTITUT NATIONAL D'ONCOLOGIE DE RABAT.

JE REMERCIE INFINIMENT LES MEMBRES DE JURY. VÉUILLEZ ACCEPTER MA PROFONDE RECONNAISSANCE ET ADMIRATION ET MES REMERCIEMENTS LES PLUS SINCÈRES D'AVOIR ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL.

UN GRAND MERCI COLLECTIF À TOUS LES ENSEIGNANTS DU MASTER BIOTECH, JE LEUR ADRESSE MES SINCÈRES REMERCIEMENTS POUR TOUT CE QU'ILS NOUS ONT OFFERT COMME ENSEIGNEMENTS, ET LEURS CONSEILS DURANT CETTE FORMATION.

## Résumé :

**Introduction:** Le cancer du sein triple négatif (CSTN), particulièrement agressif, se définit par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux oestrogéniques (RE) et progestéroniques (RP), ainsi que l'absence de surexpression de l'HER2. Il représente 15 % à 20% des cancers du sein et s'accompagne d'un risque élevé de récurrence, d'où l'intérêt d'explorer de nouvelles pistes thérapeutiques. **Objectives:** Le but de notre travail est d'évaluer l'expression du PD-L1 chez des patientes suivies pour un CSTN afin de décrire l'état des lieux initialement, et par la suite proposer une solution thérapeutique adaptée. **Matériels et Méthodes :** Il s'agit d'une étude prospective s'étalant sur 1 an (de janvier à Décembre 2021). Les échantillons fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) provenant des femmes avec un cancer du sein ont été analysés par la technique d'immunohistochimie (RE, RP et HER2). Après avoir sélectionné les cas avec un CSTN (RE-, RP- et HER2-), nous avons procédé à la mise en évidence de l'expression du PDL1 par immunohistochimie. Des données épidémiologiques et clinico-pathologique de nos patientes ont été recueillies afin d'étudier la corrélation entre le statut PDL1 et ces caractéristiques. **Résultats :** Au total, 41 cas atteints de CSTN ont fait l'objet de l'étude du statut PDL1 dont 22% étaient métastatiques d'emblée. L'âge moyen était de  $53 \pm 14,65$  ans avec des extrêmes allant de 32 ans jusqu'à 81 ans. 44% de nos patientes étaient classées pour un T3 (taille tumorale  $\geq 5$ cm) et le type histologique le plus fréquent était le carcinome mammaire invasif de type non spécifique (91%). Le grade SBR III était le plus fréquent avec un taux de 69%. Les embolus vasculaires étaient présents chez 13% des cas seulement. Pour le statut PDL1, 32% des cas avaient un score  $CPS \geq 10$ . Enfin, aucune relation statistiquement significative entre les caractéristiques des patients atteints de CSTN et le statut PDL1 n'a été trouvée. **Discussion et conclusions :** Les études sur l'expression de PD-L1 dans le CSTN ont pris de l'importance au cours de ces dernières années. Il est largement admis que PD-L1 est fortement exprimé dans les cas de CSTN. Nos résultats suggèrent que le score CPS de l'expression du PD-L1 chez les patientes avec un CSTN était  $\geq 10$  chez 13 patientes (32%), un peu élevé de ce qui a été trouvé dans d'autres études (20%). Ce résultat signifie que le 1/3 de nos patientes sont candidates à l'immunothérapie. Le fondement biologique par lequel l'expression de PD-L1 augmente pourrait être expliqué par d'autres caractéristiques clinicopathologiques non explorées dans notre étude. Une autre étude, portant sur un plus grand nombre de patients atteints de CSTN avec un suivi de leurs évolutions est recommandée afin de mettre en évidence la valeur prédictive et pronostique de l'expression du de PD-L1 dans le CSTN.

**Auteur:** CHTATI En-nacer

**Titre :** Le Statut PD-L1 dans le cancer du sein triple négatif

**Mots clé :** Cancer du sein triple négatif, PD-L1, immunohistochimie, immunothérapie

## Abstract:

**Introduction:** Triple-negative breast cancer (TNBC) is particularly aggressive and is defined by the absence of estrogenic (ER) and progesterone (PR) hormone receptor expression, as well as the absence of HER2 overexpression. It represents 15% to 20% of breast cancers and is accompanied by a high risk of recurrence, hence the interest in exploring new therapeutic approaches. **Objectives:** Our work aims to evaluate the expression of PD-L1 in patients followed up for TNBC to describe the initial situation and then propose an adapted therapeutic solution. **Materials and Methods:** This is a prospective study lasting 1 year (January to December 2021). Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens from women with breast cancer were analyzed by immunohistochemistry technique (RE, RP and HER2). After selecting the cases with TNBC (RE-, RP- and HER2-), we proceeded to demonstrate PDL1 expression by immunohistochemistry. Epidemiological and clinico-pathological data of our patients were collected to study the correlation between PDL1 status and these characteristics. **Results:** A total of 41 cases with TNBC were studied for PDL1 status, of which 22% were metastatic at baseline. The mean age was  $53 \pm 14.65$  years with extremes ranging from 32 years to 81 years. 44% of our patients were classified as T3 (tumor size  $\geq 5$ cm) and the most frequent histological type was invasive breast carcinoma of nonspecific type (91%). SBR grade III was the most frequent with a rate of 69%. Vascular emboli were present in only 13% of cases. For PDL1 status, 32% of cases had a CPS score  $\geq 10$ . Finally, no statistically significant relationship between the characteristics of patients with TNBC and PDL1 status was found. **Discussion and Conclusions:** Studies on PD-L1 expression in TNBC have gained importance in recent years. It is widely accepted that PD-L1 is highly expressed in TNBC. Our results suggest that the CPS score of PD-L1 expression in patients with TNBC was  $\geq 10$  in 13 patients (32%), a little high than what has been found in other studies (20%). This result means that 1/3 of our patients are candidates for immunotherapy. The biological basis by which PD-L1 expression increases could be explained by other clinicopathological features not explored in our study. Another study, involving a larger number of TNBC patients with a follow-up of their evolution, is recommended to highlight the predictive and prognostic value of PD-L1 expression in TNBC.

**Author:** CHTATI En-nacer

**Title:** PD-L1 Status in Triple Negative Breast Cancer

**Keywords:** Triple-negative breast cancer, PD-L1, immunohistochemistry, immunotherapy

## ملخص

**مقدمة:** سرطان الثدي السلبي الثلاثي (س.ث.س.ث.)، العدوانى بشكل خاص، يتم تعريفه من خلال عدم وجود تعبير عن مستقبلات هرمون الاستروجين (ه.س.) والبروجسترون (ه.ب.)، وكذلك عدم وجود إفراط في التعبير عن مستقبل عامل نمو البشرة البشري 2. يمثل 15% إلى 20% من سرطانات الثدي ويصاحبها مخاطر عالية للظهور من جديد بعد أو خلال العلاج، ولذلك الأبحاث تهتم باستكشاف طرق علاجية جديدة **الأهداف:** الهدف من عملنا هو تقييم تعبير ب.د.ل.1 في المرضى المتابعين لس.ث.س.ث. من أجل وصف الحالة في البداية، ثم اقتراح حل علاجي مناسب

**الأدوات والطرق:** هذه دراسة مستقبلية تمت لمدة عام واحد (من يناير إلى ديسمبر 2021). تم تحليل عينات مثبتة بالفورمالين من نساء مصابات بسرطان الثدي بواسطة تقنية الكيمياء الهستولوجية المناعية. بعد اختيار الحالات التي تعاني من س.ث.س.ث.، شرعنا في إظهار البحث عن ب.د.ل.1 عن طريق الكيمياء المناعية. تم جمع البيانات الوبائية والمرضية السريرية من مرضانا من أجل دراسة العلاقة بين ب.د.ل.1 حالة وهذه الخصائص

**النتائج:** تمت دراسة 41 حالة مصابة بس.ث.س.ث. من أجل حالة ب.د.ل.1، منها 22% كانت المرضى منتشر فيها في الأساس. كان متوسط العمر  $53 \pm 14.65$  سنة مع حدود قصوى تراوحت من 32 سنة إلى 81 سنة، 44% من مرضانا صُنّفوا على أنهم ط3 (حجم الورم  $\leq 5$  سم) وكان النوع النسيجي الأكثر شيوعاً هو سرطان الثدي الغازي من النوع غير النوعي (91%). كانت الدرجة الثالثة الأكثر شيوعاً بمعدل 69%. الصمات الوعائية كانت موجودة في 13% فقط من الحالات. بالنسبة لحالة ب.د.ل.1، كان لدى 32% من الحالات درجة أكبر من 10. أخيراً، لم يتم العثور على علاقة ذات دلالة إحصائية بين خصائص مرضى س.ث.س.ث. وحالة ب.د.ل.1.

**المناقشة والاستنتاجات:** اكتسبت الدراسات حول التعبير عن ب.د.ل.1 في س.ث.س.ث. أهمية في السنوات الأخيرة. من المقبول على نطاق واسع أن ب.د.ل.1 يتم التعبير عنه بشكل كبير في حالات س.ث.س.ث. . تشير نتائجنا إلى أن درجة تعبير ب.د.ل.1 أكثر من 10 عند المرضى الذين يعانون من س.ث.س.ث. من بين 13 مريضاً (32%)، وهي نسبة مرتفعة قليلاً عما تم العثور عليه في دراسات أخرى (20%). تعني هذه النتيجة أن ثلث مرضانا مرشحين للعلاج المناعي. يمكن تفسير الأساس البيولوجي الذي من خلاله يزيد تعبير ب.د.ل.1 من خلال ميزات إكلينيكية أخرى لم يتم استكشافها في دراستنا. يوصى بدراسة أخرى، تشمل عددًا أكبر من المرضى الذين يعانون من س.ث.س.ث. مع متابعة تطورهم من أجل إبراز القيمة التنبؤية والتنبؤية للتعبير لب.د.ل.1 في س.ث.س.ث.

**المؤلف:** شتاتي اناصر

**العنوان:** حالة PD-L1 في سرطان الثدي الثلاثي السلبي

## Liste des abréviations

- AR** : Androgen Receptor,  
**ATM**: Ataxia Telangiectasia Mutated,  
**ATR**: Ataxia Telangiectasia Related,  
**ATP** : Adénosine triphosphate  
**CCIS** : Carcinome canalaire in situ  
**CISL** :Carcinome lobulaire in situ  
**CSTN** : Cancer du sein triple négatif  
**DNMT**: DNA methyltransferase  
**INO** : Institut national d'oncologie  
**EML4** : Echinoderm Microtubule associated protein Like 4  
**FISH** : Hybridation in Situ en Fluorescence  
**HE** : Hématoxyline-Eosine  
**IHC** : Immunohistochimie  
**ITK** : Inhibiteur de Tyrosine Kinase  
**MAPK** : Mitogen-Activated Protein Kinase  
**Me** : Methyl group  
**RAF** : rapidly accelerated fibrosarcoma kinase  
**RE** : recepteur endrogène  
**RP** : recepteur progesterone  
**PI3K** : Phosphoinositide 3-kinases PI3K  
**AKT** : protein kinase B  
**OMS** : Organisation mondiale de la santé  
**PCR** : Réaction de Polymérisation en Chaîne  
**PD1** : Programmed Death-1

**PDL-1** : Programmed Death-ligand 1

**TPS** : Score de Proportion Tumorale

## Listes des figures :

Figure 1 : Anatomie de sein (Collins P et al. 1995) .....	15
Figure 2: Incidence et taux de mortalité des différents cancers selon le sexe aux Etats-Unis ....	17
Figure 3: Classification de l’OMS des tumeurs du sein.....	22
Figure 4: Classification pTNM des cancers du sein et stades cliniques (AJCC, 8ème édition 2017).....	23
Figure 5: Profil immunohistochimique du sous-type luminal A( REFE ) .....	24
Figure 6: Profil immunohistochimique du sous-type luminal B .....	25
Figure 7: Profil immunohistochimique du sous-type HER2 like .....	25
Figure 8: Les cibles thérapeutiques dans les TNBC (Andrechek, 2017) .....	27
Figure 9. Cibles thérapeutiques pour l’hormonothérapie du cancer du sein (Nicolas CLERE et al, 2018).....	29
Figure 10: Corrélation du marquage HER2 entre l’IHC, FISH et CISH. (A,B,C= score 0),.....	31
Figure 11: Mécanisme d’action de lapatinib (D’Amato, 2015) .....	31
Figure 12: Rôle cytotoxique antitumoral de lymphocyte CD8 (Ann Byrne, 2020).....	33
Figure 13: Théorie de l’immuno-surveillance et de l’échappement (Gavin P.Dunn, 2004) .....	34
Figure 14: Inhibition médiée par PD-1 des lymphocytes T.(Hui E, 2017) .....	36
Figure 15: Inhibition médiée par CTLA-4 sur les lymphocytes T.....	37
Figure 16: Voie de signalisation du PD-1 ( Beldi-Ferchiou A, 2014) .....	38
Figure 17: Mécanisme d’expression du point de contrôle PD-1/PDL-1 .....	39
Figure 18: L’axe PD-1/PD-L1 inhibe l’activation, la prolifération, la sécrétion cytotoxique et la survie des lymphocytes T. (Han Y, 2020).....	39
Figure 19: Le mécanisme d’action de l’atezolizumab (guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique-juin2022) .....	40
Figure 20: Le mécanisme d’action du pembrolizumab ( guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique-juin2022 ) .....	41
Figure 21: Tumorectomie de sein (laboratoire d’anatomie pathologique – INO).....	46
Figure 22: Tumorectomie de sein (laboratoire d’anatomie pathologique – INO).....	46
Figure 23: Les étapes de l’enrobage (service anatomie pathologique INO) .....	47
Figure 24: Cassette insérée dans le porte-objet du microtome (service anatomie pathologique INO) .....	47
Figure 25: Appareil de coloration (service anatomie pathologique INO).....	48
Figure 26: Automate autstainerAS48 IHC (service anatomie pathologique INO) .....	48

Figure 27: marquage membranaire anti-Cerb B2 (HER2-neu) des cellules tumorales.....	49
Figure 28: Répartition des patientes selon l'âge .....	51
Figure 29: Répartition des patientes selon la présence de métastases.....	52
Figure 30 : Répartition des patientes selon la taille tumorale .....	53
Figure 31: Répartition des patientes selon le type histologique .....	54
Figure 32: Répartition des patientes selon le grade SBR .....	54
Figure 33: Répartition des patientes selon la présence d'emboles vasculaires .....	55
Figure 34: Répartition des patientes selon le score CPS du PD-L1 .....	55
Figure 35: marquage membranaire anti PD-L1 (Laboratoire d'anatomie pathologique INO) ...	56

## Listes des tableaux :

Tableau 1: corrélation entre l'âge et PD-L1 .....	57
Tableau 2: corrélation entre métastases et PD-L1 .....	57
Tableau 3: Corrélation entre la taille de la tumeur et l'expression du PD-L1 .....	58
Tableau 4: Corrélation entre le type histologique et l'expression PD-L1 .....	58
Tableau 5: Corrélation entre le grade SBR et l'expression PD-L1 .....	59
Tableau 6: Corrélation entre les embolies vasculaires et l'expression PD-L1 .....	60

## Table des matières

Introduction .....	13
<b>Partie bibliographique .....</b>	<b>15</b>
<b>I. Rappels anatomiques et histologiques .....</b>	<b>15</b>
<b>II. Epidémiologie.....</b>	<b>16</b>
<b>III- Les facteurs de risques .....</b>	<b>17</b>
<b>V. Dépistage et diagnostic clinique .....</b>	<b>18</b>
1. Dépistage .....	18
2. Diagnostic clinique .....	19
a. Examen clinique .....	19
c. Echographie .....	19
d. Biopsie mammaire.....	20
<b>VI. Classifications histologiques .....</b>	<b>20</b>
1. Classification OMS des tumeurs du sein (WHO 2019) .....	20
b. Le carcinome infiltrant .....	21
2. Classification pTNM (AJCC, 8ème édition) .....	22
<b>VII. Classification moléculaire .....</b>	<b>24</b>
1 Tumeurs luminales :.....	24
2. Tumeurs non luminales.....	25
<b>VIII. Les moyens thérapeutiques.....</b>	<b>27</b>
1. La chirurgie .....	28
a. Le traitement conservateur .....	28
2. La radiothérapie .....	28
3. Chimiothérapie .....	29
4. L'hormonothérapie .....	29
5. Les thérapies ciblées anti-HER2 .....	30
<b>IX. Immunothérapie .....</b>	<b>32</b>
1. Rappels physiologiques .....	32
2. Immunothérapie anti-PDL1 .....	35
<b>Partie pratique.....</b>	<b>42</b>

<b>IX. Matériel et méthodes</b> .....	<b>45</b>
1. Recrutement des patientes : .....	45
2. Macroscopie des biopsies et pièces opératoires : .....	45
3. déshydratation et éclaircissement .....	46
4. microtomie et coloration .....	47
5. Immunohistochimie.....	48
6. Collecte des données épidémiologiques .....	50
7- Analyses des données collectées : .....	50
<b>IX. Résultats</b> .....	<b>51</b>
1. Métastases : .....	52
2. Taille de la tumeur : .....	52
3- Association de l'expression PD-L1 avec la taille de la tumeur :.....	57
4- Association de l'expression PD-L1 avec le type histologique : .....	58
5- Association de l'expression PD-L1 avec le grade SBR :.....	59
6- Association de l'expression PD-L1 et les emboles vasculaires : .....	59
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>61</b>
<b>Conclusion</b> : .....	<b>63</b>
<b>Références bibliographiques</b> : .....	<b>64</b>

## Introduction

Le cancer du sein est le premier cancer féminin et constitue un problème de santé publique à l'échelle du globe. Il a été recensé plus de 2,3 millions nouveaux cas et 685 000 de décès par ce cancer en 2020 (CIRC, 2020. Agence sanitaire mondiale de l'ONU, 2020)

Sur le plan histologique, la classification OMS dénombre plusieurs types de carcinomes infiltrants. On distingue de façon simplifiée, le carcinome infiltrant du sein de type non spécifique (NOS), qui constitue la majorité des carcinomes mammaires ; et les carcinomes infiltrants de type spécifique (ex.: Carcinome infiltrant lobulaire, carcinome tubulaire, carcinome cribriforme, carcinome mucineux, carcinome métaplasique, ...) (Référence: WHO Classification of Tumors Editorial Board. Breast tumors. International Agency for Research on Cancer: Lyon; 2019).

Sur le plan moléculaire, la classification établie par Sorlie et Perou se base sur l'analyse moléculaire des profils d'expression transcriptomique des carcinomes infiltrants du sein, afin d'améliorer la compréhension de la carcinogenèse mammaire. Les données des profils d'expression ont permis d'individualiser les principaux sous-types moléculaires parmi les carcinomes infiltrants : luminal A, luminal B, HER2 et triple négatif.

Le CSTN est un sous type moléculaire qui n'exprime pas les récepteurs d'œstrogène (ER) et de progestérone (PR) et ne surexprime pas le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2). C'est un sous type de mauvais pronostic avec un risque élevé de métastases et de récives. Le CSTN n'est pas sensible à la thérapie endocrinienne, et la chimiothérapie reste le principal traitement systémique (Pankaj Kumar, 2016), d'où l'intérêt d'explorer d'autres options thérapeutiques.

L'étude des implications du système immunitaire dans le développement des cancers est un domaine en plein essor, ayant abouti à intégrer l'immunothérapie dans arsenal thérapeutique disponible. En effet, depuis Novembre 2021, un médicament anti-checkpoint immunitaire (Anti-PD-L1) s'est vu octroyer l'autorisation de mise en marché en France. Il sera utilisé en association à une chimiothérapie dans le traitement des patients atteints d'un cancer du sein triple négatif

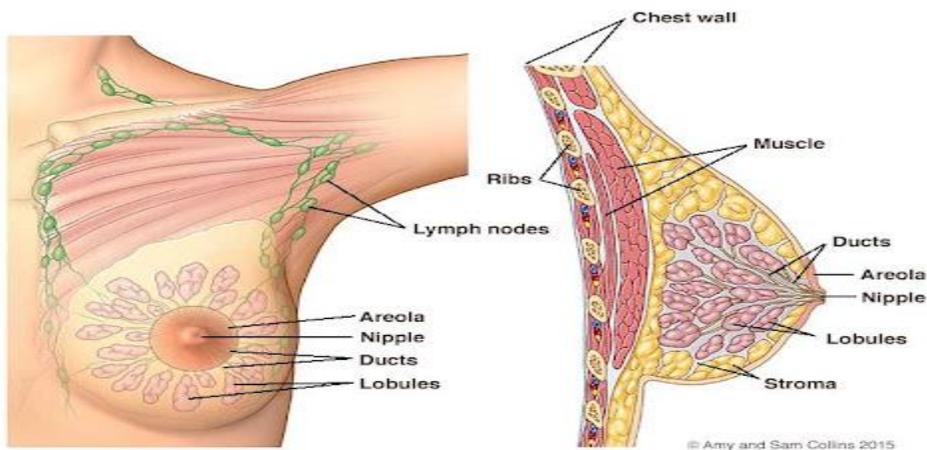
localement récurrent non résécable ou métastatique, dont les tumeurs exprimant le PD-L1 avec un CPS  $\geq$  10.

Dans cette étude, nous avons évalué l'expression du biomarqueur PD-L1, par immunohistochimie, dans le cancer du sein triple négatif. Ceci afin de mieux décrire ce phénotype particulier et par la suite, d'identifier une population pouvant être potentiellement éligible à l'immunothérapie.

# Partie bibliographique

## I. Rappels anatomiques et histologiques

Le sein est un organe pair, abritant une glande mammaire. Il occupe la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre la troisième et la septième côte.



**Figure 1 : Anatomie de sein (Collins P et al. 1995)**

Le sein a une architecture bien définie, il est composé d'une unité spécialisée, les lobules, qui assurent la production du lait. Un ensemble de lobules constitue ainsi un lobe, la principale composante de la glande mammaire.

Les lobes sont séparés par un tissu adipeux et reliés au mamelon par des canaux mammaires. On trouve également dans le sein des vaisseaux sanguins et un réseau lymphatique complexe (**figure 1**).

## II. Epidémiologie

L'incidence mondiale des cancers est estimée à **18,1 millions** nouveaux cas et **9,6 millions** décès en 2018. Un homme sur cinq et une femme sur six dans le monde développeront un cancer au cours de leur vie ; un homme sur huit et une femme sur 11 en mourront.

Le cancer du sein est le cancer féminin le plus fréquent à l'échelle mondiale, et ce, quel que soit le niveau socio-économique. L'incidence de nouveaux cas au monde est passée de **1,7 millions** en 2012 à **2,3 millions** en 2020 (**D'après l'agence sanitaire mondiale de l'ONU, 2020**)

Le cancer du sein est également la première cause de mortalité par cancer chez les femmes dans presque tous les pays. Le taux de mortalité est passé de **522 000 décès** en 2012 à **685 000** en 2020 (**CIRC, 2020**). Dans les pays développés, il a été noté une meilleure survie des patientes. En effet, le cancer du sein arrive au deuxième rang des causes de décès par cancer, après le cancer du poumon. (**HélèneSancho-Garnier, 2019**)

Aux Etats-Unis, le nombre total de cancer du sein était de **279 100** nouveaux cas, avec **43 210** décès en 2020 (Rebecca.L, 2020). En France, le nombre de nouveaux cas de cancer du sein s'élève à **59 000** et **12 000** de décès en 2017. (**Anne Cowpli-Bony, 2019**)

Au Maroc, selon le **registre de la Région du Grand Casablanca** l'incidence annuelle des cancers du sein est de **4794** nouveaux cas chez les femmes.



Figure 2: Incidence et taux de mortalité des différents cancers selon le sexe aux Etats-Unis

[\(researchgate.net\)](https://www.researchgate.net)

### III- Les facteurs de risques

Le facteur de risque se définit comme tout facteur dont l'exposition augmente le risque de développer un cancer.

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle, plusieurs facteurs de risque ont été identifiés grâce à des études épidémiologiques, il est difficile d'en tirer un bilan exhaustif. En effet les facteurs identifiés interagissent entre eux et réalise souvent un effet synergique.

Les principaux facteurs de risque identifiés sont :

- ✚ Le sexe féminin
- ✚ L'âge avancé
- ✚ Les antécédents familiaux de cancer du sein
- ✚ Les facteurs hormonaux endogènes
  - L'âge précoce des ménarches,

- **La Ménopause tardive**
- ✚ **Les facteurs hormonaux exogènes**
  - **Les contraceptifs hormonaux**
  - **Le traitement hormonal substitutif (THS)**
- ✚ **Les facteurs liés à la reproduction**
  - **L'âge tardif de la première grossesse**
  - **L'allaitement naturel : facteur protecteur**
- ✚ **Les facteurs hygiéno-diététiques**
  - **L'alimentation riche en glucides et en lipides**
  - **L'alcool**
  - **Le manque d'activité physique (AP) et obésité**
- ✚ **Les facteurs environnementaux**
  - **Les radiations ionisantes**

## **V. Dépistage et diagnostic clinique**

### **1. Dépistage**

Le dépistage est un processus qui s'applique sur des patients asymptomatiques, ayant une condition pré morbide ou un facteur de risque, visant à faire un diagnostic précoce et par conséquent améliorer le pronostic. Dans le cas du cancer du sein le dépistage surtout précoce représente une étape critique dans la guérison de la maladie. Le dépistage peut même permettre d'éviter l'apparition d'un cancer, grâce au repérage et au traitement d'une anomalie qui aurait pu évoluer vers un cancer. L'intérêt est de pouvoir soigner ce cancer plus facilement et de limiter les séquelles liées à certains traitements.

Plusieurs actions peuvent être mises en place afin de favoriser une détection précoce du cancer du sein :

- L'autopalpation

-La consultation d'un médecin en cas de constatations d'anomalie au niveau des seins.

-Une mammographie de dépistage (examen radiologique) : proposée tous les deux ans aux femmes de 50 à 74 ans.

Il est recommandé de faire un examen clinique suivi par des examens radiologiques, dès l'âge de 20 ans chez les femmes à haut risque ou qui ont des antécédents familiaux sont recommandées à. **(Institut National du Cancer)**

Au Maroc le programme national de dépistage du cancer a été lancé en 2010 par le Ministère de la Santé avec le soutien de la Fondation Lalla Salma de lutte contre le cancer (FLSC), du Fonds des Nations Unies pour la population (FNUAP) et de l'Organisation mondiale de la Santé (OMS).

## 2. Diagnostic clinique

### a. Examen clinique

L'examen clinique comprend le recueil minutieux des antécédents de la patiente, l'inspection visuelle des seins, la palpation des deux seins, de la région axillaire et sus claviculaire, de même que la formation de chaque patiente à l'auto-examen des seins et, plus particulièrement, à la détection de nodules mammaires. **(D'après l'OMS)**

### b. Mammographie

La mammographie est une technique de diagnostic fiable, valide et reproductible visant à détecter plus tôt le cancer de sein surtout chez les femmes asymptomatiques et celles avec un risque plus élevé que la moyenne de développer la maladie.

Lorsque la mammographie est pratiquée par un équipement certifié et interprétée par des radiologues expérimentés, un taux de précision de 85 à 90% peut être atteint pour identifier les tumeurs précliniques non palpables. **(Coleman, 2017)**

### c. Echographie

Technique basée sur l'utilisation des ultra-sondes dans le but de produire des images à l'intérieur de sein. Elle est pratiquée par un radiologue.

Dans le diagnostic de cancer de sein, l'échographie a une place importante dans la détection des anomalies et des lésions mammaires, il est utilisé majoritairement dans :

- ✓ La confirmation de l'existence des anomalies détectées par la mammographie.
- ✓ Lorsque la densité des seins est élevée et ne permet pas d'obtenir des images de qualité en mammographie.
- ✓ Chez les femmes enceintes (pas de risque sur le fœtus par rapport à la mammographie).
- ✓ Pour guider le radiologue lors une biopsie.

#### **d. Biopsie mammaire**

Une biopsie consiste à prélever des fragments de tissus au niveau d'une anomalie du sein. Le procédé est percutané lorsqu'il est réalisé à l'aide d'une aiguille à travers la peau. La biopsie est dite échoguidée et stéréotaxique lorsqu'elle est guidée par l'échographie et la mammographie et en fin chirurgicale lorsqu'il nécessite une intervention chirurgicale. Les biopsies sont analysées au microscope afin de déterminer le diagnostic de cancer, d'en identifier le type et de chercher les facteurs prédictifs et pronostiques pour pouvoir orienter les médecins sur le choix du traitement.

## **VI. Classifications histologiques**

### **1. Classification OMS des tumeurs du sein (WHO 2019)**

La notion de "Cancer du sein" relève d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble d'entités, qui correspondent à des proliférations néoplasiques de la glande mammaire qui diffèrent sur les plans histologique, phénotypique, moléculaire ainsi que pronostic. Ces différentes entités sont décrites par la classification de l'OMS des tumeurs du sein (5<sup>ème</sup> édition parue en 2019), largement adoptée par les anatomo-pathologistes et les cliniciens (**Figure 3**)

Le carcinome du sein est une prolifération maligne des cellules épithéliales mammaires, en effet, on distingue :

#### **a. Le carcinome in situ**

Il s'agit d'une prolifération tumorale carcinomateuse limitée par l'assise myoépithéliale et n'ayant donc pas encore franchi la membrane basale il y a :

- ❖ **Carcinome canalaire in situ (CCIS)** : le plus fréquent parmi les formes de carcinome non infiltrant et représente de 3 à 4% des cancers asymptomatiques et 17% des cancers détectés à la mammographie. Plusieurs études ont montré le risque d'évolution d'un CCIS vers un cancer invasif en absence de traitement.
- ❖ **Carcinome lobulaire in situ (CISL)** dénommé actuellement néoplasie in situ lobulaire est beaucoup moins fréquent que le CCIS ; il représente 0,5% des cancers asymptomatiques et 1% des cancers détectés à la mammographie. **(Cserni G, 2020)**

#### **b. Le carcinome infiltrant**

Les carcinomes deviennent infiltrants lorsque les cellules cancéreuses franchissent la membrane basale. Elles peuvent par conséquent migrer à travers des vaisseaux sanguins ou lymphatiques à d'autres sites en créant des métastases.

Les carcinomes infiltrants de type non spécifique sont plus fréquents.

Les carcinomes infiltrants dits spécifiques sont beaucoup moins fréquents (carcinome lobulaire, carcinome tubuleux, carcinome cribriforme, carcinome mucineux ...). **(Cserni G, 2020)**

## WHO classification of epithelial tumours of the breast

<b>Benign epithelial proliferations and precursors</b>		<b>Invasive breast carcinoma</b>	
	Usual ductal hyperplasia	8500/3	Infiltrating duct carcinoma NOS
	Columnar cell lesions, including flat epithelial atypia	8290/3	Oncocytic carcinoma
	Atypical ductal hyperplasia	8314/3	Lipid-rich carcinoma
		8315/3	Glycogen-rich carcinoma
		8410/3	Sebaceous carcinoma
<b>Adenosis and benign sclerosing lesions</b>		8520/3	Lobular carcinoma NOS
	Sclerosing adenosis	8211/3	Tubular carcinoma
8401/0	Apocrine adenoma	8201/3	Cribriform carcinoma NOS
	Microglandular adenosis	8480/3	Mucinous adenocarcinoma
	Radial scar / complex sclerosing lesion	8470/3	Mucinous cystadenocarcinoma NOS
		8507/3	Invasive micropapillary carcinoma of breast
<b>Adenomas</b>		8401/3	Apocrine adenocarcinoma
8211/0	Tubular adenoma NOS	8575/3	Metaplastic carcinoma NOS
8204/0	Lactating adenoma		
8503/0	Duct adenoma NOS	<b>Rare and salivary gland-type tumours</b>	
<b>Epithelial-myoepithelial tumours</b>		8550/3	Acinar cell carcinoma
8940/0	Pleomorphic adenoma	8200/3	Adenoid cystic carcinoma
8983/0	Adenomyoepithelioma NOS		Classic adenoid cystic carcinoma
8983/3	Adenomyoepithelioma with carcinoma		Solid-basaloid adenoid cystic carcinoma
8562/3	Epithelial-myoepithelial carcinoma		Adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation
<b>Papillary neoplasms</b>		8502/3	Secretory carcinoma
8503/0	Intraductal papilloma	8430/3	Mucoepidermoid carcinoma
8503/2	Ductal carcinoma in situ, papillary	8525/3	Polymorphous adenocarcinoma
8504/2	Encapsulated papillary carcinoma	8509/3	Tail cell carcinoma with reversed polarity
8504/3	Encapsulated papillary carcinoma with invasion		
8509/2	Solid papillary carcinoma in situ	<b>Neuroendocrine neoplasms</b>	
8509/3	Solid papillary carcinoma with invasion	8240/3	Neuroendocrine tumour NOS
8503/3	Intraductal papillary adenocarcinoma with invasion	8240/3	Neuroendocrine tumour, grade 1
		8249/3	Neuroendocrine tumour, grade 2
<b>Non-invasive lobular neoplasia</b>		8246/3	Neuroendocrine carcinoma NOS
	Atypical lobular hyperplasia	8041/3	Neuroendocrine carcinoma, small cell
8520/2	Lobular carcinoma in situ NOS	8013/3	Neuroendocrine carcinoma, large cell
	Classic lobular carcinoma in situ		
	Florid lobular carcinoma in situ		
8519/2	Lobular carcinoma in situ, pleomorphic		
<b>Ductal carcinoma in situ (DCIS)</b>			
8500/2	Intraductal carcinoma, non-infiltrating, NOS		
	DCIS of low nuclear grade		
	DCIS of intermediate nuclear grade		
	DCIS of high nuclear grade		

**Figure 3: Classification de l'OMS des tumeurs du sein**

Breast Tumours, WHO Classification of Tumours, 5th Edition, ed. WHO Classification Editorial Board, 2019.

## 2. Classification pTNM (AJCC, 8<sup>ème</sup> édition)

Il s'agit d'une classification internationale qui permet de définir le stade d'un cancer. Dans cette classification, la description anatomique du cancer du sein repose sur trois critères :

- La taille et l'extension tumorale (**T**).
- L'absence ou la présence d'envahissement ganglionnaire régionales (**N**).
- La présence ou non d'une métastase **M** (figure 4).

**T0** Pas de tumeur primitive

**Tis (DCIS)** Carcinome *in situ* de type canalaire (Tis DCIS)

**Tis (Paget)** Maladie de Paget du mamelon sans lésion invasive associée ni DCIS ailleurs

**T1** Tumeur ≤ 20 mm

**T1mi** : lésion micro-invasive ≤ 1 mm

**T1a** : 1 mm < Tumeur ≤ 5 mm (arrondir à 2 mm les tailles entre 1.0 et 1.9 mm)

**T1b** : 5 mm < Tumeur ≤ 10 mm

**T1c** : 10 mm < Tumeur ≤ 20 mm

**T2** 20 mm < Tumeur ≤ 50 mm

**T3** Tumeur > 50 mm

**T4** Tumeur (quelle que soit la taille) avec atteinte directe **(a)** de la paroi thoracique (l'atteinte du muscle pectoral seule n'est pas considérée comme une atteinte pariétale), **(b)** de la peau (ulcération, nodules satellites homolatéraux, œdème et peau d'orange), **(c)** ou aux deux, ou **(d)** carcinome de type inflammatoire

**Note** : définition d'un carcinome inflammatoire : définition basée sur une peau d'orange (érythème et œdème de la peau) intéressant au moins un tiers de la surface cutanée mammaire. La présence d'embolies ou une lésion de grande taille ne sont pas suffisants pour le définir mais peuvent s'y rencontrer.

**pN0** Absence de métastase ganglionnaire régionale détectée en histologie standard (y compris un amas de cellules tumorales de moins de 0,2 mm).  
Un suffixe «+» indique la présence de cellules détectées en HE ou en immunohistochimie et dont la taille globale est de moins de 0,2 mm et de moins de 200 cellules.  
Un suffixe «mol+» indique la détection de cellules tumorales par des techniques de biologie moléculaire

**pN1mi** Micrométastase (entre 0,2 mm et/ou plus de 200 cellules ET < à 2,0 mm)

**pN1a** Atteinte de 1 à 3 ganglions axillaires (dont au moins une métastase > 2 mm)

**pN1b** Atteinte de la chaîne mammaire interne

**pN1c** pN1a et pN1b

**pN2a** Atteinte de 4 à 9 ganglions axillaires (dont au moins une métastase > 2 mm)

**pN2b** Atteinte de la chaîne mammaire interne (avec ou sans confirmation microscopique) avec une absence d'atteinte axillaire

**pN3a** Atteinte d'au moins 10 ganglions axillaires (dont au moins une métastase > 2 mm)

**pN3b** pN1a ou pN2a en présence d'une atteinte clinique de la chaîne mammaire interne ou pN2a et pN1b

**pN3c** Atteinte du groupe sus claviculaire homolatéral

**Note 1** : (sn) ajout pour qualifier qu'il s'agit de ganglions sentinelles ; si plus de 6 ganglions sentinelles ou non examinés ne plus mettre (sn)

**Note 2** : y préfixe pour l'évaluation post thérapeutique néo-adjuvante

**M0** Absence de métastase à distance

**M1** Métastase à distance

	<b>Stade 0</b>	Tis N0 M0
	<b>Stade IA</b>	T1 N0 M0
	<b>Stade IB</b>	T0 N1mi M0
100	<b>Stade IIA</b>	T1 N1mi M0 T0 N1 M0
100	<b>Stade IIB</b>	T1 N1 M0 T2 N0 M0 T2 N1 M0
100	<b>Stage IIIA</b>	T3 N0 M0 T0 N2 M0 T1 N2 M0 T2 N2 M0
100	<b>Stade IIIB</b>	T3, N1 ou N2 M0
100	<b>Stade IIIC</b>	T4, N0 ou N1 ou N2, M0
100	<b>Stade IV</b>	Quel que soit T, N3, M0 Quels que soient T et N, M1

**Figure 4: Classification pTNM des cancers du sein et stades cliniques (AJCC, 8ème édition 2017)**

## VII. Classification moléculaire

Les analyses moléculaires des profils d'expression transcriptomique des carcinomes infiltrants du sein ont permis de mieux approcher la carcinogénèse mammaire, de définir les différentes entités, et ainsi de personnaliser la prise en charge. Les données des profils d'expression ont permis d'individualiser les principaux sous-types moléculaires parmi les carcinomes infiltrants : luminal A, luminal B, HER2, basal.

### 1 Tumeurs lumineales :

Sont les tumeurs ER positives distinguées par une forte expression de gènes normalement exprimés par les cellules mammaires épithéliales lumineales, ils sont classés en deux catégories :

- ✓ **Luminal A** : sont des tumeurs caractérisées par une forte expression des gènes associés aux récepteurs d'œstrogène et des récepteurs de progestérogène, ils ne surexpriment pas HER2 avec une estimation de prolifération faible (Ki67<20%) et un bas grade.

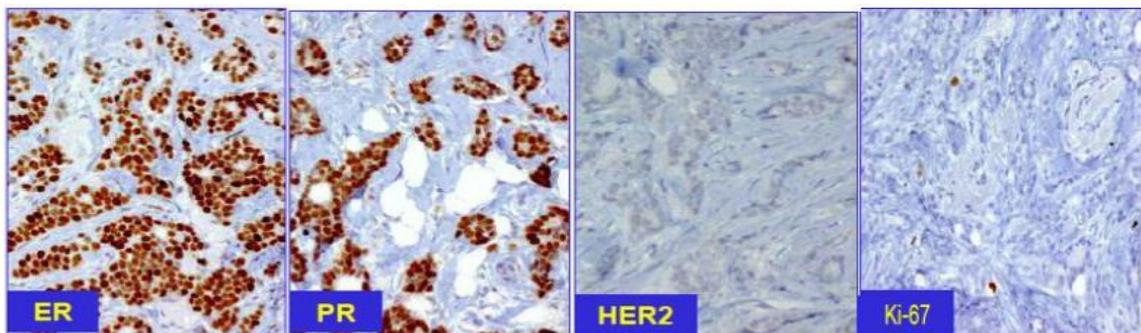


Figure 5: Profil immunohistochimique du sous-type luminal A( REFE )

- ✓ **Luminal B** :elles expriment les récepteurs d'œstrogènes et de progestérogènes avec une perte de surexpression de HER2et une forte prolifération estimée par Ki 67(Darina Vuong, 2014). Ainsi, Luminal B est une tumeur RE+ / RP+/- et Ki67  $\geq$  20% ,et RH + HER2+.

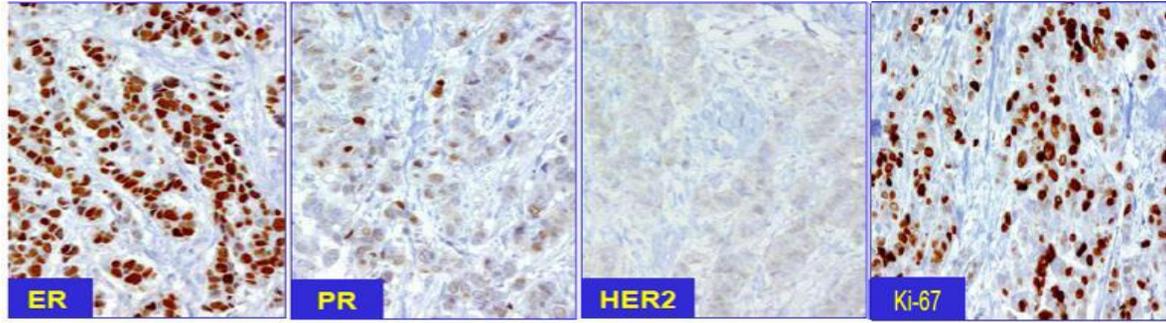


Figure 6: Profil immunohistochimique du sous-type luminal B

## 2. Tumeurs non lumineales

Ce sont les tumeurs ER négative caractérisé par une expression des gènes à caractère basal dans les cellules basales et myoépithéliales. Plusieurs groupes sont classés dans ce groupe :

### a. HER2 :

Caractérisées par une surexpression de la protéine HER2 ou une amplification de gène qui code pour la protéine HER2. Ce sous-type représente 15 à 30 % des cancers de sein invasifs et qui en présents des implications à la fois pronostiques et prédictives.

Les tumeurs surexpriment HER2 sont agressives et se développent rapidement.

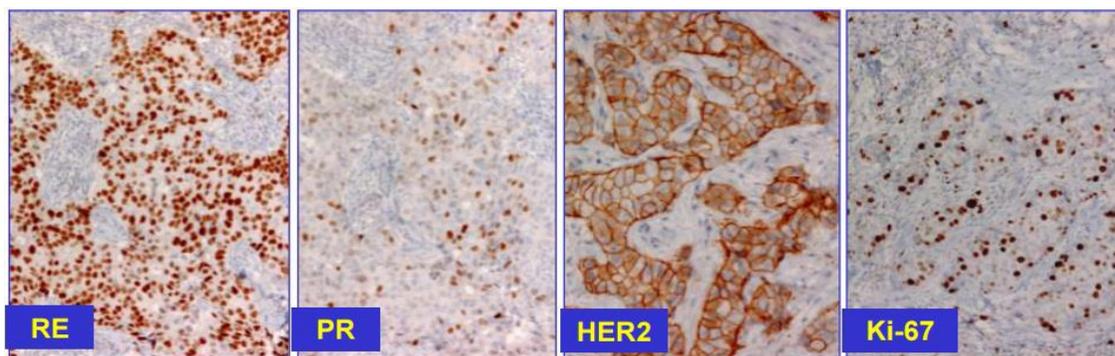


Figure 7: Profil immunohistochimique du sous-type HER2 like

### b. Tumeurs triple négative

Les cancers du sein triples négatifs représentent environ 15% (12-17%) des cancers de sein infiltrants. Il s'agit d'un groupe hétérogène des tumeurs tant sur le plan génomique, transcriptomique que morphologique, clinique et pronostique.

Les cancers du sein triple négatifs (CSTN), ainsi nommés car ils n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes (RE), ni les récepteurs à la progestérone (RP) et ni le récepteur HER2. **(Aurélié Roulot, 2016)**

### **c. Tumeurs basale-like**

Il est fondamental de bien comprendre les différences entre les tumeurs triples négatives (définies par la triple négativité de RE, RP et HER2 en immunohistochimie) et les tumeurs basales like qui sont aussi les plus souvent triples négatives (85% des cancers de sein TN appartiennent à la classe BL). Ces deux groupes ne sont pas synonymes.

Les tumeurs basales likes (BL) est une famille des cancers de sein triples négatif de type canalaire invasif. **(Aurélié Roulot, 2016)**

Les tumeurs BL sont caractérisées par l'expression des molécules de haut poids moléculaire comme **les cytokératines de type basal 5/6**, 14 et 17 (Ck5/6, Ck14 et Ck17) déterminés classiquement par puce à ADN et aujourd'hui par immunohistochimie. 60 à 70 % des tumeurs de phénotype basal expriment les Ck5/6 mais les seuils de positivité sont très variables d'une étude à l'autre (certaines considèrent un marquage comme positif dès qu'il existe une seule cellule marquée tandis que d'autres définissent le seuil de positivité respectivement à 1 %, 5% et 10 % de cellules marquées).

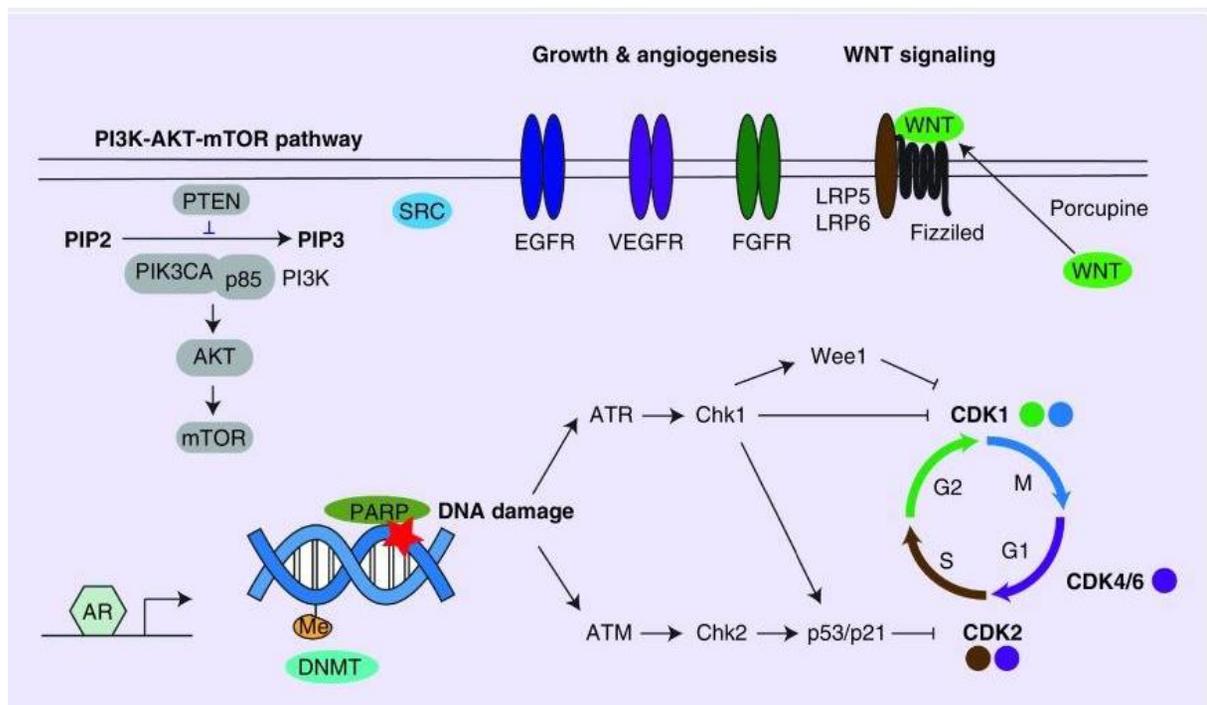
Les tumeurs BL présentent des altérations génétiques et épigénétiques importantes, ce qui améliore la réponse à la chimiothérapie à base de cisplatine. Plusieurs altérations génétiques ont été décrites, **la délétion de gène P53** et *PIK3CA*, la perte de *PTEN* et *RBI*, l'amplification de la *cycline E1* et une expression accrue de *Myc* et *HIF1-α*, une amplification supplémentaire de plusieurs gènes (tels que *CDK4*, *MCL1*, *JAK2*, *AKT1* et *EGFR* et la perte de mutations dans *BRCA1/2*, *ATM* et *CDKN2A*. Ces altérations pourraient bien avoir un impact sur le développement de thérapies ciblées. **(Andrechek, 2017)**

L'épigénétique est un mode de régulation de l'expression des gènes sans altération de la structure intrinsèque de l'ADN, c'est l'ensemble des modifications post-traductionnelles

(méthylation, phosphorylation, acétylation...) des protéines histones et la méthylation de l'ADN qui favorise l'expression ou la répression des gènes.

Les altérations épigénétiques sont impliquées aussi dans le processus de cancérogénèse, BRCA1 est l'un des gènes altérés par mécanisme épigénétique dans le cancer de sein.

Donc les cibles thérapeutiques dans les tumeurs triples négatives sont importantes, le choix de chacun subi à plusieurs paramètres clinicopathologiques.



**Figure 8: Les cibles thérapeutiques dans les TNBC (Andrechek, 2017)**

**AR:** Androgen Receptor, **ATM:** Ataxia Telangiectasia Mutated, **ATR:** Ataxia Telangiectasia Related, **DNMT:** DNA methyltransferase, **Me:** Methyl group

## VIII. Les moyens thérapeutiques

## 1. La chirurgie

### a. Le traitement conservateur

Au niveau du sein, la tumorectomie (synonymes : segmentectomie, quadrantectomie, mastectomie partielle) définit l'ablation de la tumeur avec une marge de tissu sain (en principe 1 cm), par une incision radiaire ou périmamelonnaire.

### b. Mastectomie totale

La mastectomie radicale conservatrice, ou opération de Patey, procède à l'ablation du sein avec son revêtement cutané, de l'aréole, du mamelon et des ganglions axillaires. Les muscles pectoraux sont conservés, sauf en cas d'envahissement du corps musculaire (**opération de Halsted**).

### c. Curage ganglionnaire

Un curage ganglionnaire a pour but d'enlever toutes les cellules cancéreuses qui auraient pu se propager jusqu'aux ganglions lymphatiques et ainsi de réduire le risque de récurrence de la maladie. Il permet aussi de préciser si la maladie progresse au-delà du sein et donc de contribuer au choix des traitements complémentaires à la chirurgie.

## 2. La radiothérapie

Les rayons X peuvent détruire les cellules cancéreuses avec deux modalités, soit par un effet direct ciblant directement les macromolécules nobles de la cellule ou par un effet indirect par la radiolyse de l'eau et la génération des ROS.

La radiothérapie postopératoire a pour objectif principal de réduire le risque de récurrences locales. L'irradiation est réalisée sur la glande mammaire restante après tumorectomie, ou la paroi thoracique après mastectomie. Pour les cancers de localisation centrale ou interne, elle est étendue à la chaîne mammaire interne et aux ganglions sus-claviculaires. Le traitement distribue une dose de base de 45 à 50 Gy en quatre à cinq semaines et un complément de 10 à 20 Gy sur la cicatrice de tumorectomie. Les études cliniques les plus récentes ont confirmé que la radiothérapie postopératoire permettait une réduction des récurrences locales et avait aussi un impact sur la survie des malades.

### 3. Chimiothérapie

La chimiothérapie détruit directement les cellules cancéreuses ou les empêchent de se multiplier, elle est devenue un traitement standard, pour une majorité de patientes traitées pour un cancer du sein. Le traitement de référence est une polychimiothérapie avec anthracyclines et taxanes.

### 4. L'hormonothérapie

Le cancer de sein est un cancer hormonodépendant, le traitement endocrinien ou l'hormonothérapie vise à bloquer les sources hormonales, l'œstrogène et la progestérone par plusieurs mécanismes :

- **Bloquer l'axe hypothalamo-hypophysaire** Diverses molécules sont utilisées pour bloquer l'axe hypothalamo-hypophysaire et inhibées les hormones sexuelles à titre d'exemple les progestatifs comme l'**acétate de mégéstrole** à forte dose permet un effet anti-œstrogénique utile à la prise en charge de cancer de sein métastatique.

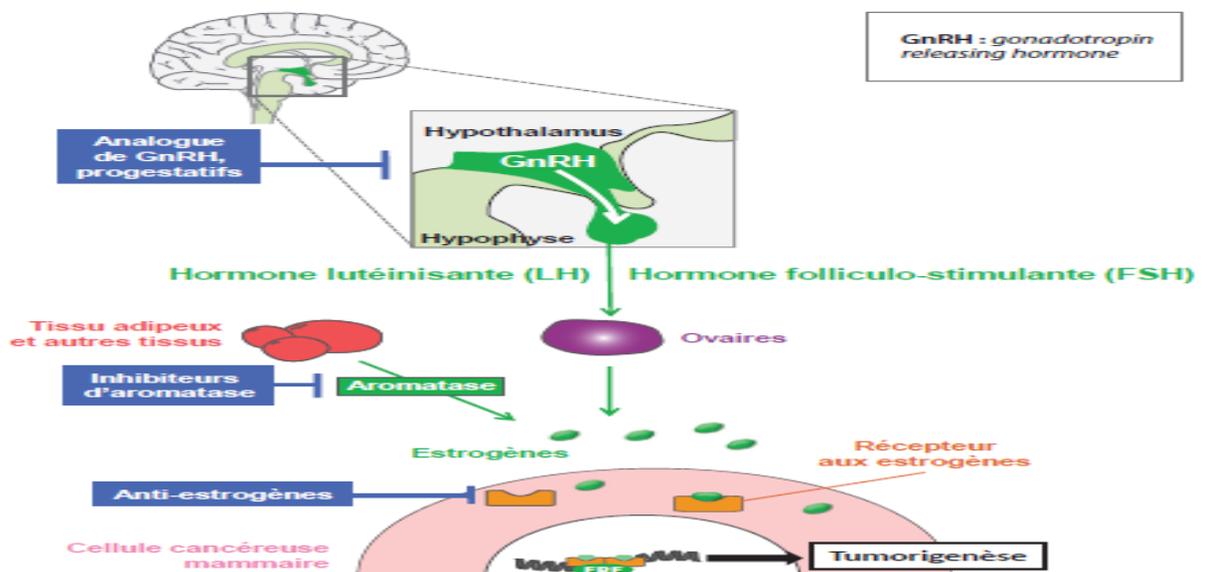


Figure 9. Cibles thérapeutiques pour l'hormonothérapie du cancer du sein (Nicolas CLERE et al, 2018).

- **Inhiber l'action des hormones**

Les molécules utilisées pour inhiber l'action des hormones sont des antagonistes des récepteurs hormonaux, le **Tamoxifène** (Nolvadex®) est un antiœstrogène modulateur sélectif des récepteurs aux œstrogènes métabolisé en endoxifène, il se lie aux récepteurs des œstrogènes et bloque ainsi d'une manière compétitive la liaison de ces hormones avec leurs récepteurs, de ce fait il empêche la prolifération des cellules tumorales mammaires.

**Le Fulvestrant, le Torémifène** sont aussi utilisés comme des antiestrogènes.

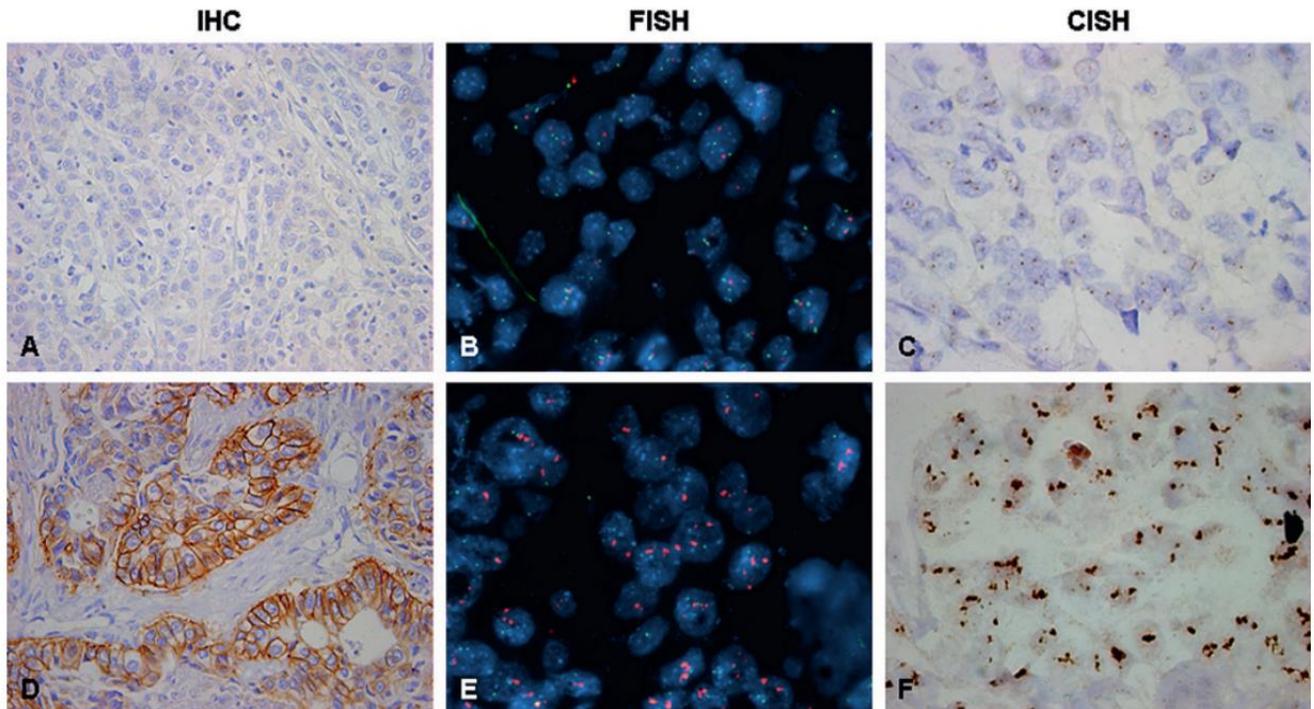
- **Inhiber la synthèse hormonale périphérique**

La synthèse périphérique des hormones est assurée par les aromatasesspar aromatisation des androgènes dans le tissu adipeux ou d'autres organes. Les inhibiteurs d'aromatase est une option thérapeutique post-ménopausique. **Anastrozole**(Arimidex®), **Létrozole**(Femara®) sont des inhibiteurs des aromatasess.(Clere, 2018)

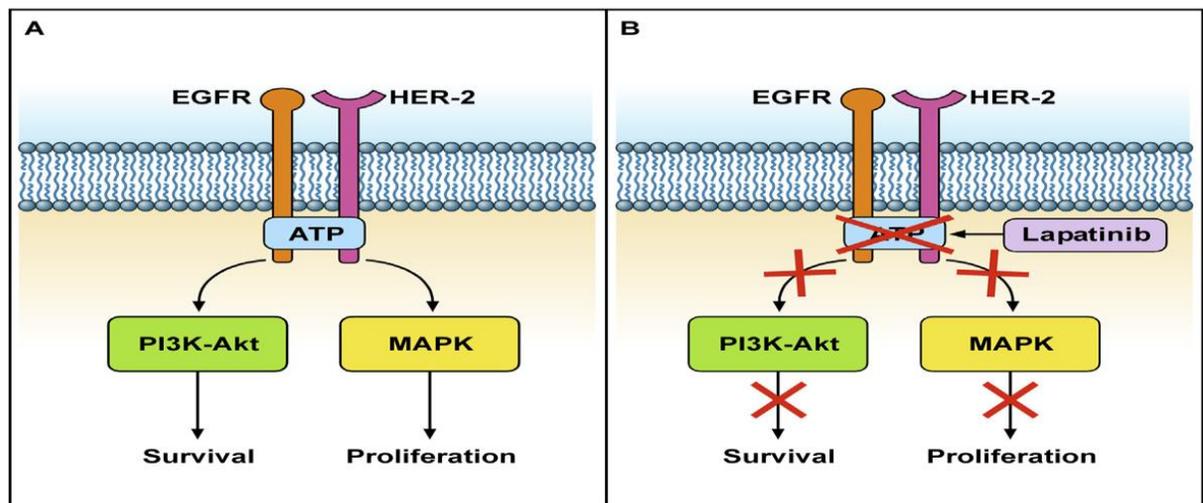
## 5. Les thérapies ciblées anti-HER2

Les antis HER2 sont indiqués pour des cancers du sein HER 3+ positif en immunohistochimie ou pour les cas HER2 2+ en immunohistochimie et amplifié après la réalisation de la technique d'hybridation in situ en fluorescence (FISH), le trastuzumab (Herceptin®) est le premier traitement anti HER2.

Nous avons également Le lapatinib ; une petite molécule approuvée par TKI pour les patientes atteintes d'un cancer du sein. Ce double inhibiteur est capable de cibler les domaines TK des deux récepteurs EGFR et HER2, agissant comme un concurrent à l'ATP. L'interaction avec les récepteurs empêche la phosphorylation et la transduction subséquente du signal des voies MAPK et PI3K / Akt, entraînant une inhibition de la prolifération cellulaire et une induction de l'apoptose.(Kunte S et al, 2020)



**Figure 10: Corrélation du marquage HER2 entre l'IHC, FISH et CISH. (A,B,C= score 0), (DEF= score 3+). Le signaux orange et vert représente respectivement le gène HER2 et le centromère du chromosome 17.( Yan B et al, 2010)**



**Figure 11: Mécanisme d'action de lapatinib (D'Amato, 2015)**

## **IX. Immunothérapie**

### **1. Rappels physiologiques**

Le système immunitaire a la capacité d'identifier et de détruire les cellules tumorales directement : il est capable de détecter les cellules dysplasiques ou cancéreuses et de les détruire avant que la tumeur ne se développe. Ce phénomène est appelé "immuno-surveillance antitumorale". Cependant, malgré cette surveillance opérée par le système immunitaire, certaines cellules tumorales peuvent se développer. Le concept d'immuno-surveillance a donc laissé la place à la théorie de l'immuno-édition. Cette théorie définit les relations entre les cellules transformées et le système immunitaire selon 3 phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. (Gavin P. Dunn, 2002)

Les effecteurs de la réponse immunitaire antitumorale sont:

#### **Les cellules dendritiques (CD)**

Les CD ont la capacité d'ingérer les antigènes des tumeurs par endocytose et phagocytose prévenant de débris ou de corps apoptotiques des cellules cancéreuses, puis les cellules dendritiques migrent vers les ganglions de drainage en réponse à plusieurs sécrétions cytokinines, pour présenter l'antigène tumorale aux cellules effectrices de la réponse antitumorale, les cellules T cytotoxiques et T auxiliaire.

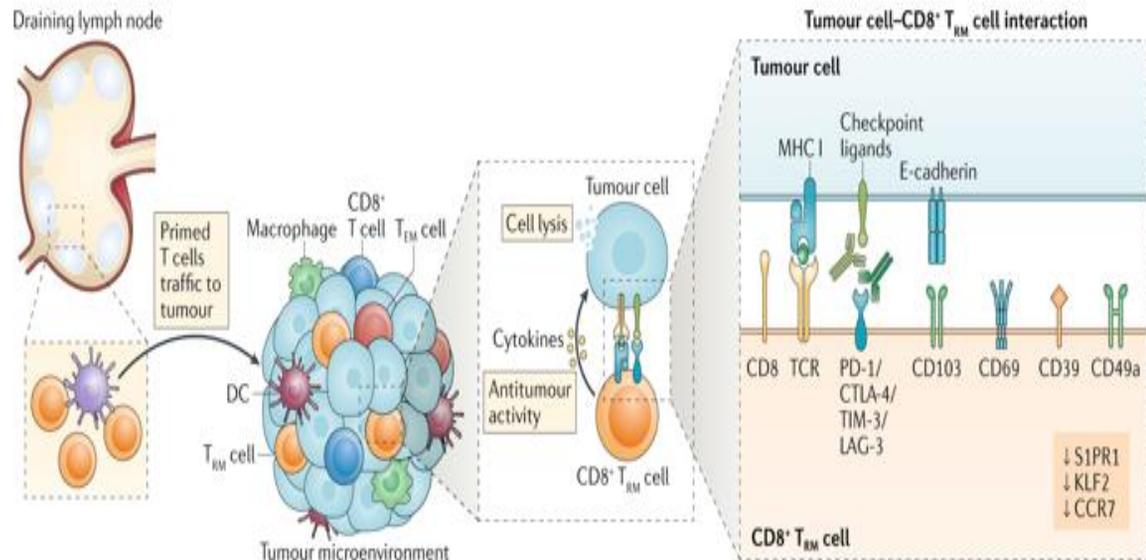
#### **Les lymphocytes T CD4**

Les LTCD4 reconnaissent d'une façon spécifique via leurs récepteurs TCR (T CellReceptor) les antigènes tumoraux associés avec CMH II présentés par les CDs. Les LTCD4 deviennent actifs et chaque population sécrète des cytokines anti ou procancéreux.

#### **Les lymphocytes T CD8**

La présentation des antigènes aux cellules CD8 dans le ganglion abouti à une migration de ces cellules vers le site de la tumeur, les CD8 reconnaissent les cellules cancéreuses via le CMH de classe I qui est exprimé à la surface de toutes les cellules.

La reconnaissance du complexe CMH-peptide via leur TCR les active et induit leur fonction tueuse. Ainsi, ils acquièrent la capacité de lyser les cellules tumorales par différents mécanismes. Par ailleurs, ces cellules sont capables de sécréter l'IFN $\gamma$ .



**Figure 12: Rôle cytotoxique antitumoral de lymphocyte CD8 (Ann Byrne, 2020)**

## Les cellules NK

Les cellules NK appartiennent au système immunitaire inné, il s'agit d'une population de cellules qui repense face aux tumeurs précocement parce qu'elles ne nécessiteront pas une reconnaissance d'antigène par les cellules présentatrice. La cytotoxicité naturelle se déclenche en réponse à des signaux activateurs on les appelle récepteurs de cytotoxicité naturelle (NCR), et s'inhibe par des signaux inhibiteurs.

Les cellules NK sont des cellules tueuses capables de tuer les cellules tumorales qui, contrairement aux cellules normales, n'expriment plus les molécules inhibitrices bloquant les fonctions tueuses des NK.

## a. Immunité anti-tumorale et phénomènes d'échappement

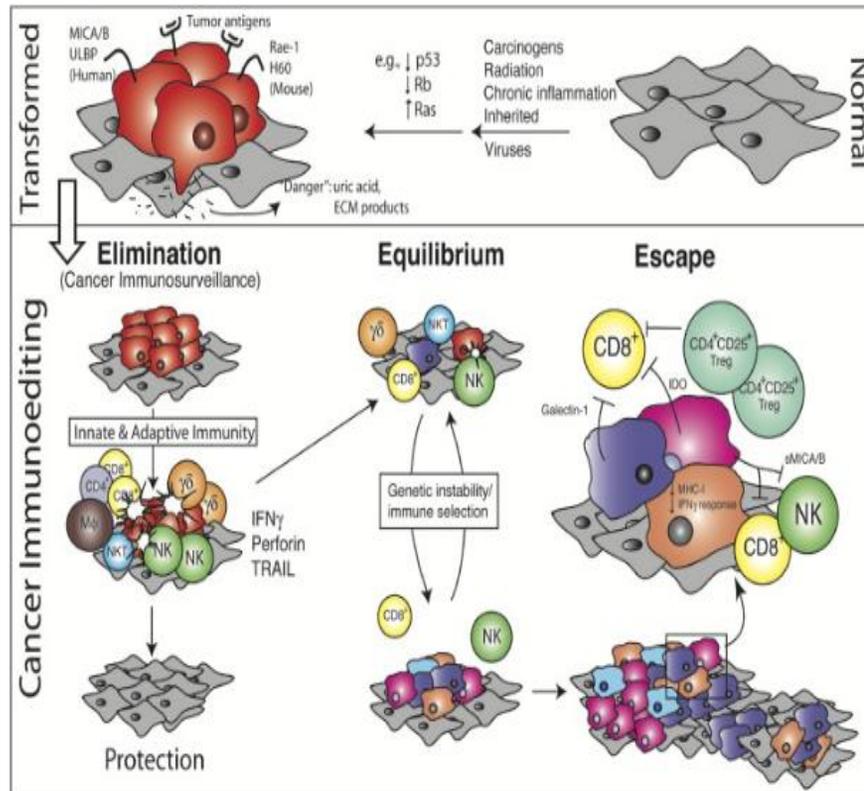


Figure 13: Théorie de l'immuno-surveillance et de l'échappement (Gavin P.Dunn, 2004)

### a. Elimination

L'interaction entre le système immunitaire inné et adaptatif est vitale pour la reconnaissance immunitaire et l'élimination des tumeurs du sein. Le système immunitaire détecte les cellules néoplasiques par la reconnaissance des protéines tumorales ou par l'expression inappropriée de soi ou d'antigènes mutés.

### b. Phase d'équilibre

Dans la phase d'équilibre, le système immunitaire contrôle la croissance nette des cellules tumorales, dans le plus souvent restent en dormance et cliniquement indivisible pour l'hôte. (JA, 2007), (Matthew D. Vesely, 2011)

### c. Phase d'échappement

La phase d'échappement représente l'échec du système immunitaire à éliminer et contrôler le développement des cellules transformées, permettant aux variantes de cellules tumorales de survivantes de croître de manière immunologiquement illimitée.

Deux processus ont été impliqués dans cette immuno-évasion :

**-Immuno-sélection** : les cellules immunitaires exercent une pression sur les variantes tumorales, les plus aptes et agressives forment un cancer manifeste chez l'hôte immunocompétent. Les souches sélectionnées peuvent acquérir des défauts issus de l'instabilité génétique au sein des cellules transformées en particulier dans les voies de la présentation antigénique ce qui peut empêcher leur reconnaissance par les cellules de système adaptatif.

**-Immuno-subversion** : processus actif par lequel les cellules cancéreuses créent un microenvironnement immunosuppresseur ou régulent à la hausse les points de contrôle immunitaire :

## 2. Immunothérapie anti-PDL1

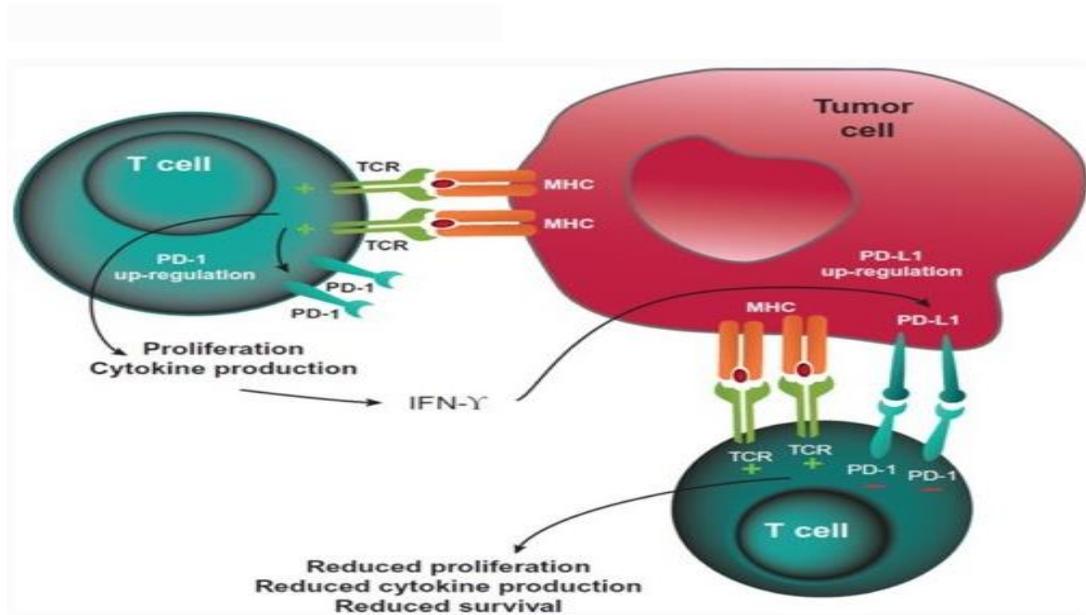
### a. Les points de contrôle immunitaires :

Les récepteurs délivrant des signaux co-inhibiteurs fonctionnent comme un « point de contrôle immunitaire » et leur rôle est de maintenir la tolérance périphérique et de prévenir l'auto-immunité (VA, 2017) . Dans les cancers les points de contrôle sont des molécules sécrétées en réponse à la tumeur pour faire empêcher la réaction immunitaire, ces molécules peuvent se fixer sur plusieurs composantes de l'immunité antitumorale.

L'activation des cellules T nécessite l'engagement du TCR (récepteur des cellules T) et du CD28 (un récepteur co-stimulant) sur les molécules du CMH et de B7 respectivement exprimées par les cellules présentant l'antigène. S'il n'y a pas de co-stimulation ou s'il y a un signal de co-inhibition (au lieu de celui de co-stimulation), les cellules immunitaires deviennent anergiques ou meurent par apoptose. (Rosenblum MD, 2015)

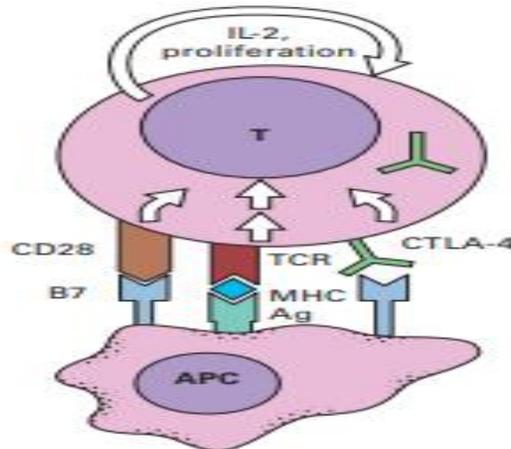
L'un des récepteurs co-inhibiteurs (points de contrôle immunitaires) les plus étudiés est le récepteur programmé de mort (PD-1, CD279). PD-1 est un récepteur inhibiteur des

lymphocytes T qui appartient à la superfamille B7 / CD28 / CTLA-4. L'interaction entre PD-1 et son ligand de mort programmé par ligand 1 (PD-L1, B7-H1) inhibe les cellules T activées et régule à la baisse la réponse des cellules T et en inhibant l'activation médiée par le TCR et la co-stimulation CD28 (Hui E, 2017)



**Figure 14: Inhibition médiée par PD-1 des lymphocytes T.(Hui E, 2017)**

L'antigène 4 associé aux lymphocytes T cytotoxiques (CTLA-4), une molécule immunorégulatrice puissante, peut réguler à la baisse l'activation des lymphocytes T et inhiber la réponse immunitaire antitumorale.



**Figure 15: Inhibition médiée par CTLA-4 sur les lymphocytes T.**

### **b. Le point de contrôle PD-1 et son ligand PD-L1**

Le récepteur de surface Programmed cell Death protein 1 (PD-1) dénommé aussi CD279, a été découvert en 1992 sur un hybridome de cellules T murines. PD1 est une protéine transmembranaire qui appartient à la superfamille B7-CD28, de 55 kDa avec 288 acides aminés. Ce récepteur est exprimé sur les lymphocytes T, B activés, les macrophages, les cellules NK, les cellules dendritiques et les monocytes, ainsi que son expression sur les cellules T spécifique de la tumeur est forte . **(Han Y, et All 2020)** PD-1 possède deux ligands : PD-L1 et PD-L2. **(Seidel JA,2018)** La liaison entre PD-1 et PD-L1 assure une médiation du signal co-inhibiteur de l'activation des cellules T, et joue un rôle de régulation négative dans la réponse immunitaire humaine. **(Prospects of Immunotherapy for Triple-Negative Breast Cancer)**

Trois mécanismes essentiels interviennent dans la régulation de l'expression tumorale de PD-L1:

- le mécanisme oncogénique : des évènements oncogéniques intracellulaire comme l'activation de voie de signalisation (pI3K-AKT), des altérations chromosomiques, et des amplifications de gènes pouvant être à l'origine de l'expression de PD-L1;
- le mécanisme adaptatif secondaire à la réponse immunitaire antitumorale dont l'expression de PD-L1 est physiologiquement inductible en présence d'interféron gamma (IFN $\gamma$ ), qui est sécrété par les lymphocytes T activés et les NK activés. Des cytokines telles que l'IL-2 peuvent aussi induire son expression. Ce mécanisme n'est pas seulement

un indicateur d'un système immunitaire adaptatif active mais aussi un outil de résistance à l'immunité anti tumorale.

- le mécanisme lié à l'hypoxie : HIF(Hypoxia inducible Factor) qui est une molécule impliquée dans l'angiogénèse tumorale, peut induire une hypoxie à la surface des cellules immunosuppressives. (Granier C, 2017)

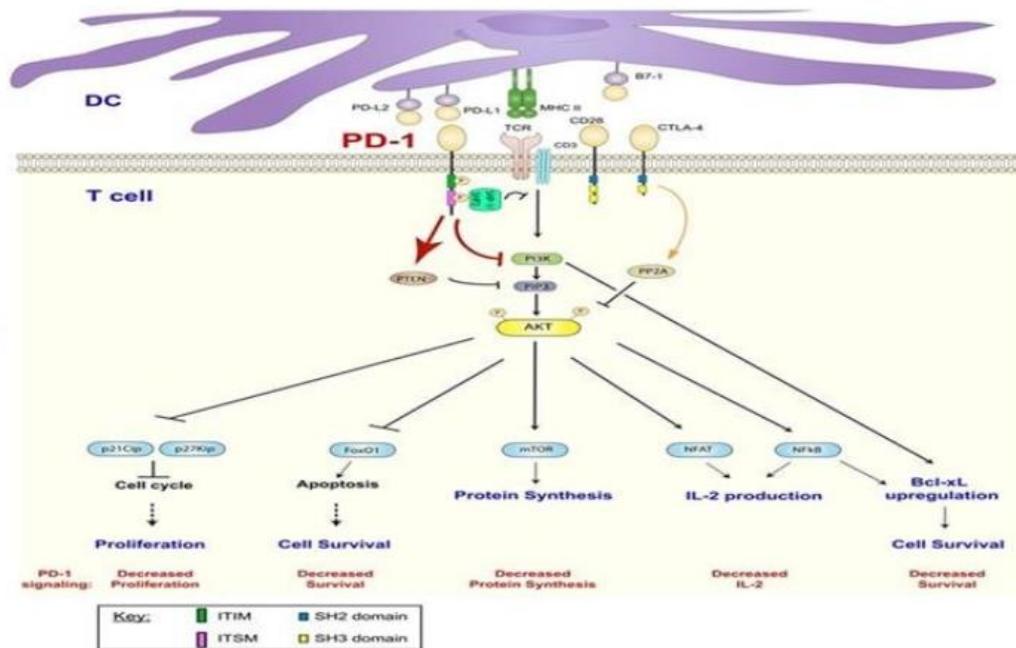


Figure 16: Voie de signalisation du PD-1 ( Beldi-Ferchiou A, 2014)

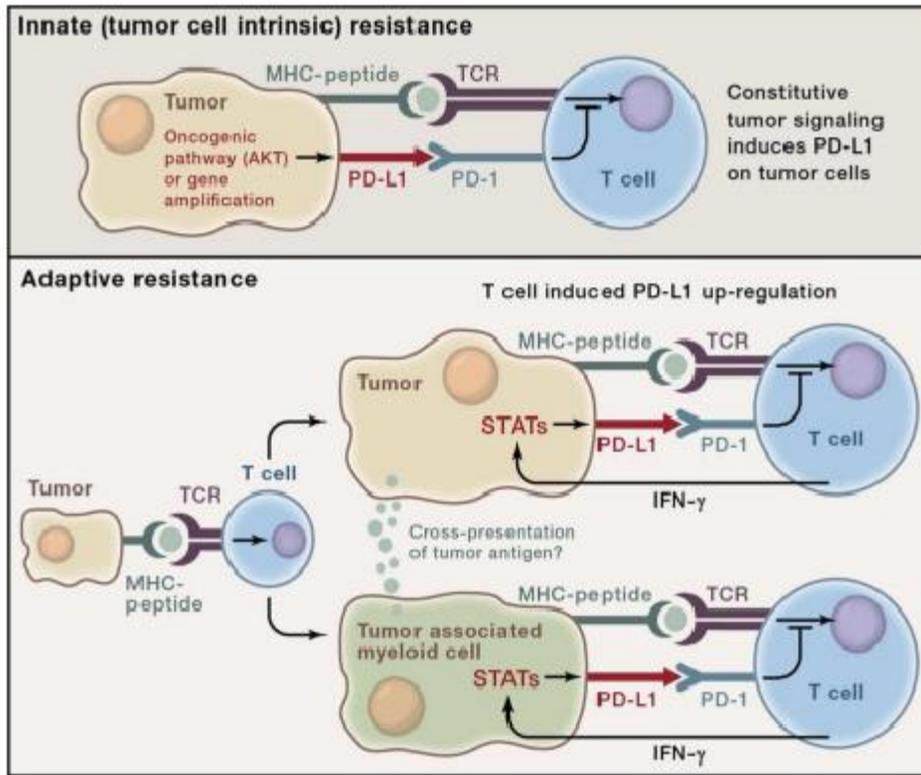


Figure 17: Mécanisme d'expression du point de contrôle PD-1/PDL-1

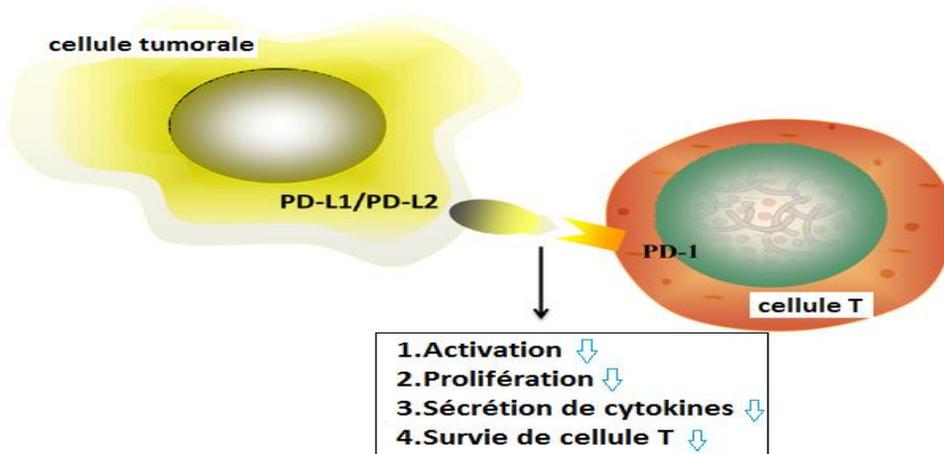
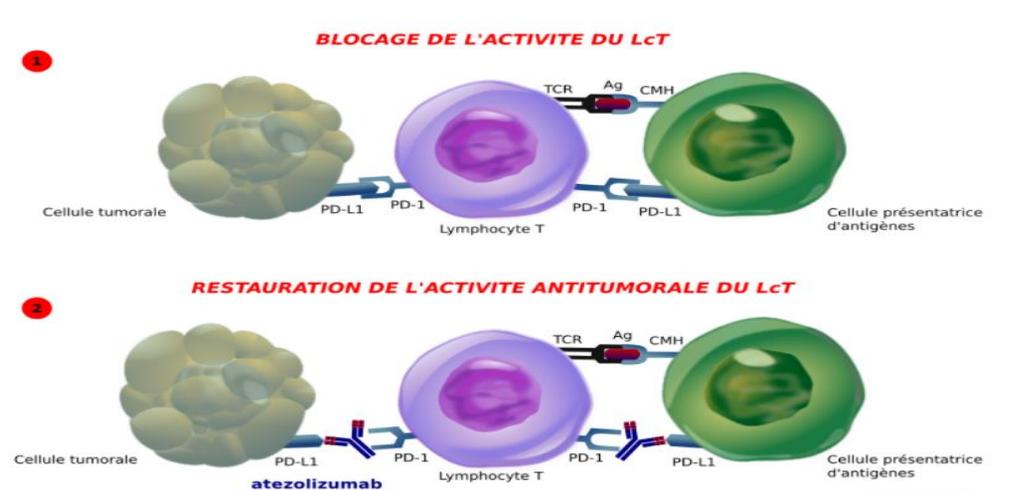


Figure 18: L'axe PD-1/PD-L1 inhibe l'activation, la prolifération, la sécrétion cytotoxique et la survie des lymphocytes T. (Han Y, 2020)

Les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires, tels que PD-1 et son ligand PD-L1, sont devenus de nouvelles cibles thérapeutiques importantes qui modulent l'activation des cellules T et suppriment la croissance tumorale. Les principales molécules reconnues à ce jour, et qui ont l'AMM au Maroc sont :

### Atezolizumab :

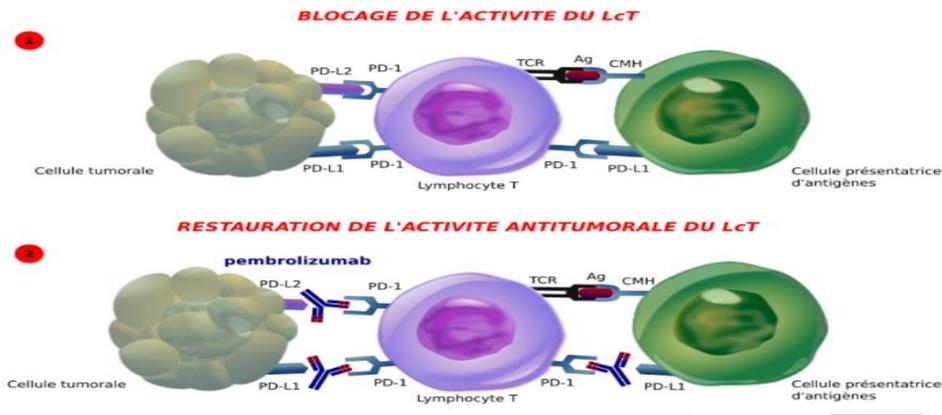
L'atezolizumab est un anticorps monoclonal humain de type immunoglobuline G1 (IgG1) contre PD-L1 présentés par les cellules tumorales, il inhibe la liaison de PD-L1 à ses récepteurs PD-1 ou CD80 à la surface des lymphocytes T. ce qui conduit à la suppression de la régulation négative et rétablit la fonction des lymphocytes T ainsi que leur capacité à tuer les cellules tumorales.



**Figure 19: Le mécanisme d'action de l'atezolizumab (guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique-juin2022)**

### Pembrolizumab :

Le pembrolizumab est un anticorps monoclonal humain à type immunoglobuline G4 (IgG4) qui cible PD-1. La liaison de l'anticorps à PD-1 bloque l'interaction entre PD-1 sur les cellules T et le ligand PD-L1 sur les cellules tumorales. ainsi, la réponse immunitaire est activée, et est augmentée pour exercer son rôle antitumoral. (Bou Zerdan M,2022) (Tavares D,2021) sur la base de l'étude KEYNOTE-355, le pembrolizumab a été approuvé en 2020 en association avec la chimiothérapie pour le traitement de première ligne du cancer du sein métastatique triple négatif PD-L1+, et sur la base des résultats de l'étude KEYNOTE-522, il a été approuvé en 2021 en association avec la chimiothérapie pour le traitement du cancer du sein au stade précoce. (Tolba MF, 2021)



**Figure 20: Le mécanisme d'action du pembrolizumab ( guide des anticorps monoclonaux à usage thérapeutique-juin2022 )**

### Détection de l'expression de PDL-1 dans le cancer du sein triple négative

Avec L'importance des immunothérapies ciblant PD-1/ PD-L1 qui évolue, il a désormais indispensable de considérer des tests de diagnostic permettant d'évaluer le niveau de ces molécules et alors de prédire les résultats chez les patients atteints de cancer.

PD-L1 est un biomarqueur prédictif essentiel, de la réponse à l'inhibition du point de contrôle PD-1 et son ligand PD-L1 dans le cancer du sein triple négatif. L'immunohistochimie est couramment utilisée pour mesurer l'expression de PD-L1. Actuellement, de nombreux tests commercialisés sont conçus par des clones d'anticorps qui détectent la présence de la protéine PD-L1. En outre, il existe de nombreux scores et seuils d'expression.

Parmi les scores PD-L1 se trouvent le score des cellules tumorales, le score de la proportion de tumeurs, le score des cellules immunitaires et le score positif combiné. La FDA a approuvé quatre tests immunohistochimiques (IHC) PD-L1 utilisant quatre anticorps PD-L1 différents (SP142, 22C3, SP263,28-8), sur deux plateformes immunohistochimie différentes (Ventana et Dako), avec un système de score spécifique pour chacun d'eux. Des études d'harmonisation sont en cours pour rechercher les tests et les clones d'anticorps les plus fiables. malgré que l'immunohistochimie PD-L1 puisse être utilisée pour prédire la réponse à l'immunothérapie anti-PD-1 ou anti-PD-L1, une proportion de patients négatifs peut avoir une réponse à ces traitements, il est donc nécessaire d'identifier des biomarqueurs alternatifs pour affiner la sélection des patients les plus susceptibles d'avoir une réponse à ces thérapies. . (Bou Zerdan M, 2022)

## Partie pratique

### *Description de cadre de travail*

L'anatomie et cytologie pathologiques est une spécialité médicale qui étudie les modifications morphologiques, phénotypiques et moléculaires des tissus au cours de processus pathologiques divers. Par conséquent, cette discipline revêt une importance prépondérante, dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge globale des patients.

Elle se sert des connaissances fondamentales d'anatomie, d'histologie et de cytologie normales pour reconnaître des anomalies morphologiques liées à la maladie. Elle s'appuie sur des techniques de macroscopie, de microscopie, de chimie, d'immunohistochimie, de cytogénétique et de biologie moléculaire. Cette spécialité médicale a pour mission d'établir un diagnostic et suivre le traitement d'un cancer. L'obtention d'un diagnostic histologique avant le traitement d'un cancer est indispensable.

Les examens initiaux doivent conduire à préciser le pronostic local et à distance de la maladie (stade d'extension d'une tumeur maligne, grade histologique), et mettre en évidence d'éventuels marqueurs permettant de prédire la réponse thérapeutique. Elle est aussi importante dans le dépistage et indispensable dans le cadre du suivi des patients. En effet, elle permet d'apprécier l'effet d'un traitement en cours et de surveiller l'évolution de la maladie, de diagnostiquer une éventuelle récurrence, voire l'apparition d'un nouveau cancer. Elle joue un rôle important d'interface dans les protocoles de recherche/développement entre clinique et biologie. L'anatomo-cytopathologie est une spécialité en évolution constante et occupe une place essentielle dans la lutte contre le cancer.

## **L'Institut National d'Oncologie (INO)**

L'institut national d'oncologie Sidi Mohamed Ben Abdellah est une institution publique inauguré en 1983.

Il a pour principales missions de :

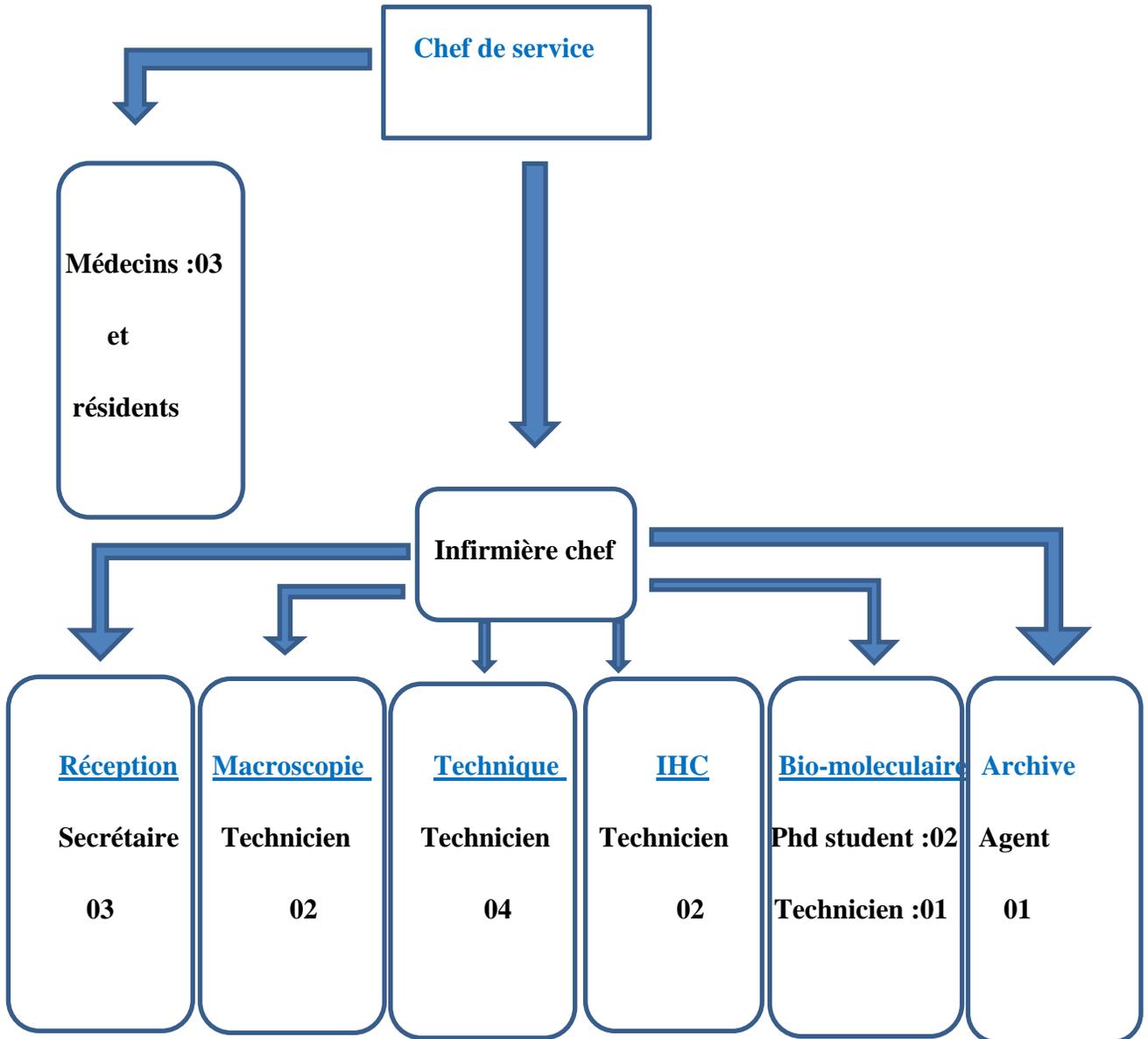
- Réaliser le Diagnostic, le traitement et la surveillance des malades.
- Réaliser une étude épidémiologique des cancers.
- Effectuer des Recherches sur les modalités de diagnostic et de traitement dans un cadre de multidisciplinarité.
- Participer à l'enseignement médical, paramédical et scientifique.
- La recherche scientifique via la plateforme de biologie moléculaire

## **Service de l'anatomie pathologique**

Le service d'anatomie pathologique est situé au 1<sup>ère</sup> étage de l'hôpital chargé à examiner les pièces opératoires, les biopsies et cytologie de tout type de pathologie cancéreuse (mammaire, digestive, hépatique, pulmonaire ...) de l'hôpital, ainsi que les relectures intervenant d'autres établissements.

.

## Organigramme du service d'anatomie pathologie -INO



## **IX. Matériel et méthodes**

### **1. Recrutement des patientes :**

Il s'agit d'une étude prospective s'étalant sur une période de 1 an (de janvier à décembre 2021), réalisée au laboratoire d'anatomie pathologique de l'Institut National d'Oncologie de Rabat. L'objectif de notre étude était d'évaluer l'expressions de PDL1 chez les patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif

#### **Critères d'inclusion :**

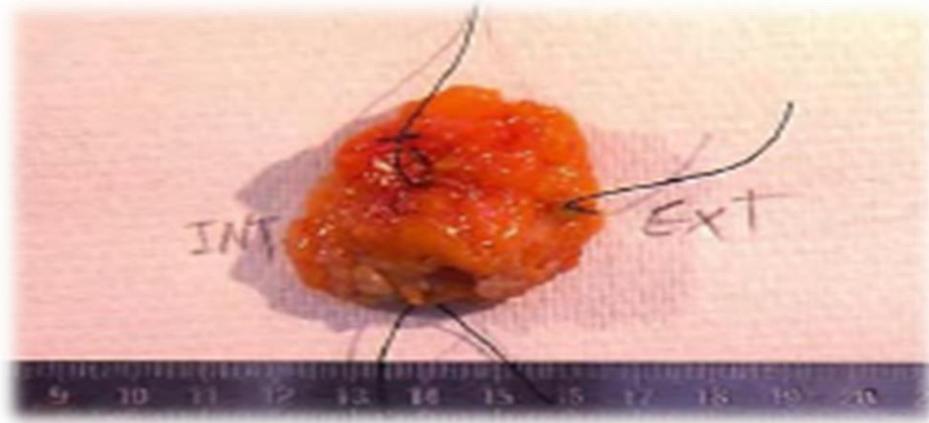
- Toutes femmes avec un CSTN confirmés par étude immunohistochimique réalisées à l'INO;
- Les biopsies et les pièces opératoires internes et externes à l'INO de Rabat;

#### **Critères d'exclusion :**

- Le sexe masculin ;
- Femmes avec CSTN confirmés hors l'INO
- Femmes perdues de vue avant la confirmation du cancer du sein triple négatif ;
- Femmes avec autres types de cancer du sein (Luminal A, B et Her2+) ;
- Matériel tumoral exigü.

### **2. Macroscopie des biopsies et pièces opératoires :**

Après réception des pièces et biopsies du sein dans le laboratoire, ces dernières ont été fixées entre 6 a 72h au formol neutre tamponnée à 4%. Ensuite les fragments biopsiques et les prélèvements réalisé sur les pièces opératoires ont été mis dans des cassettes étiquetées.



**Figure 21: Tumorectomie de sein (laboratoire d'anatomie pathologique – INO)**

NB : les prélèvements qui n'ont pas respecté le temps d'ischémie froide et le temps de fixation ont été écartés de l'étude.

### **3. déshydratation et éclaircissement**

Après avoir rassemblé les cassettes contenant les prélèvements, ces dernières ont été mises dans l'automate de circulation pour déshydratation en les passant dans 6 bains d'alcool à une concentration croissante, puis les prélèvements ont été éclaircis grâce à des passages dans 3 bains de toluène, par la suite nos échantillons ont été imprégnés dans de la paraffine (figure 22). Enfin, les cassettes sont sorties de l'automate et incluses dans des moules (enrobage) (figure 23).



**Figure 22: Tumorectomie de sein (laboratoire d'anatomie pathologique – INO)**



**Figure 23: Les étapes de l'enrobage (service anatomie pathologique INO)**

#### **4. microtomie et coloration**

Après enrobage, les coupes de 3 à 5  $\mu\text{m}$  ont été réalisées à l'aide d'un microtome, puis étalées sur une lame en verre et colorées en Hématoxyline / Eosine ( protocole voir annexe2 ) pour visualiser l'histologie tissulaire.



**Figure 24: Cassette insérée dans le porte-objet du microtome (service anatomie pathologique INO)**



**Figure 25: Appareil de coloration (service anatomie pathologique INO)**

### **5. Immunohistochimie**

Après lecture des lames HE par l'anatomopathologiste, la technique d'immunohistochimie a été réalisée pour les quartes biomarqueurs ( RE, RP, HER2, Ki67 ) pour toutes les cas avec un cancer du sein confirmé histologiquement ( protocole voir annexe 3 )



**Figure 26: Automate autstainerAS48 IHC (service anatomie pathologique INO)**

Puis on a trié les dossiers avec une résultats triple négatif c'est-à-dire

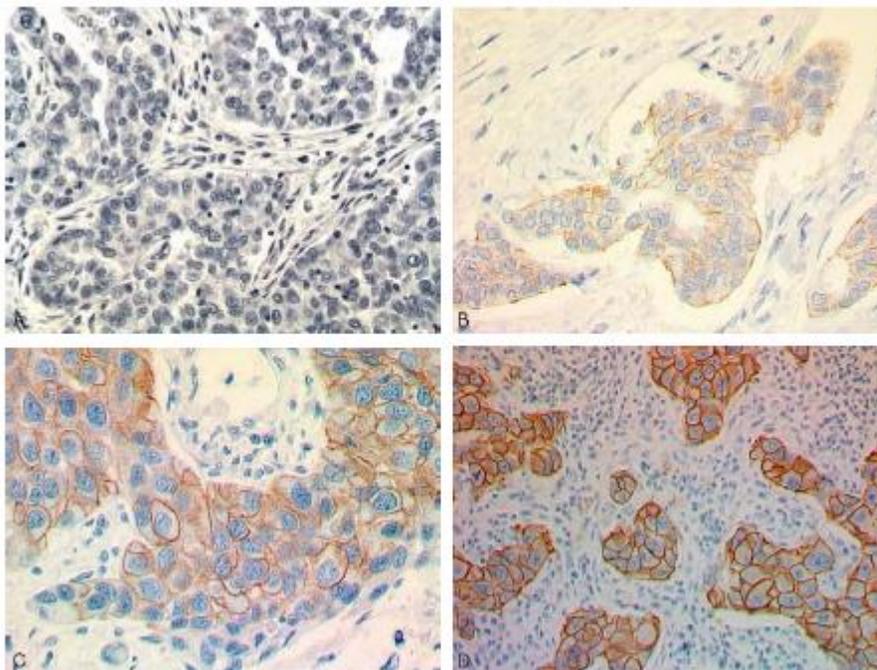
\_RE : négatif

\_RP : négatif

\_HER2 : score 0, 1, ou 2 non amplifié

Au total on a trouvé 41 dossiers après élimination des blocs épuisés

Après lecture des lames d'immunohistochimie pour les quatre biomarqueurs, les patientes RH+ et HER2+ ont été éliminées et les cas cancer du sein triple négatif ont été retenues pour cette étude. Ensuite, nous avons procédé à l'immunohistochimie pour un autre biomarqueur appelé PD-L1 sur automate Autostainer AS48 ( protocole voir annexe 3)



**Figure 27: marquage membranaire anti-Cerb B2 (HER2-neu) des cellules tumorales**

- a. Témoin négatif (pas de marquage).
- b. Témoin positif, intensité faible (+).
- c. Témoin positif, intensité modérée (++)
- d. Témoin positif, intensité forte (+++).

## 6. Collecte des données épidémiologiques

A l'aide d'une base de données en ligne dite ENOVA incluant tous les dossiers des malades de l'hôpital, les données épidémiologiques des patientes répondant aux critères d'inclusions de cette étude ont été recueillies. Les données ont été recueillies en respectant l'anonymat (collecte des informations sans identifier les patientes).

Une fiche d'exploitation a été dûment remplie pour chaque cas (**Annexe 1**)

Les données recueillies comprenaient :

- L'âge,
- La taille de la tumeur
- Les métastases,
- Le type histologique,
- Le grade de la tumeur selon le système histologique de Scarff Bloom et Richardson,
- Les embolies vasculaires,
- Résultat score CPS PD-L1.

## 7- Analyses des données collectées :

Les études descriptives et analytiques ont été réalisées via des analyses statistiques à l'aide du logiciel SPSS 22.0 (IBM Corporation Armonk, NY, USA). Les données descriptives ont été indiquées en pourcentage ou en médiane ou en moyenne  $\pm$  l'écart type. L'étude de corrélation des caractéristiques des patients avec le statut PDL1 a été réalisée par le test du chi carré et le test student. Les valeurs  $P < 0,05$  ont été considérées comme statistiquement significatives.

## IX. Résultats

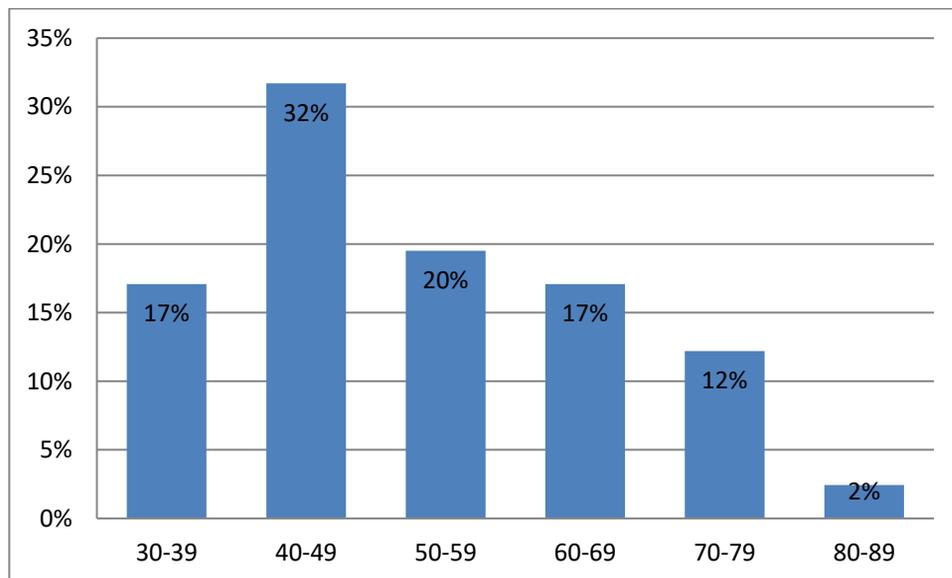
Après avoir sélectionné les cas répondant à nos critères d'inclusions et d'exclusions, nous avons pu inclure 41 cas de CSTN dans cette étude.

### Caractéristiques des patientes :

#### ➤ Caractéristique épidémiologique :

##### 1- L'âge

Dans notre série l'âge moyen des patientes était de 53 ans, avec des extrêmes allant de 32 à 81 ans. La femme jeune (<40 ans) représentait 17 % des patientes, en revanche les femmes âgées entre 40 et 50 représentaient 32 %, et les femmes entre 50 et 60 ans représentaient 20%. La femme âgée ( $\geq 60$  ans) représentait 31 % des patientes (**figure 28**).

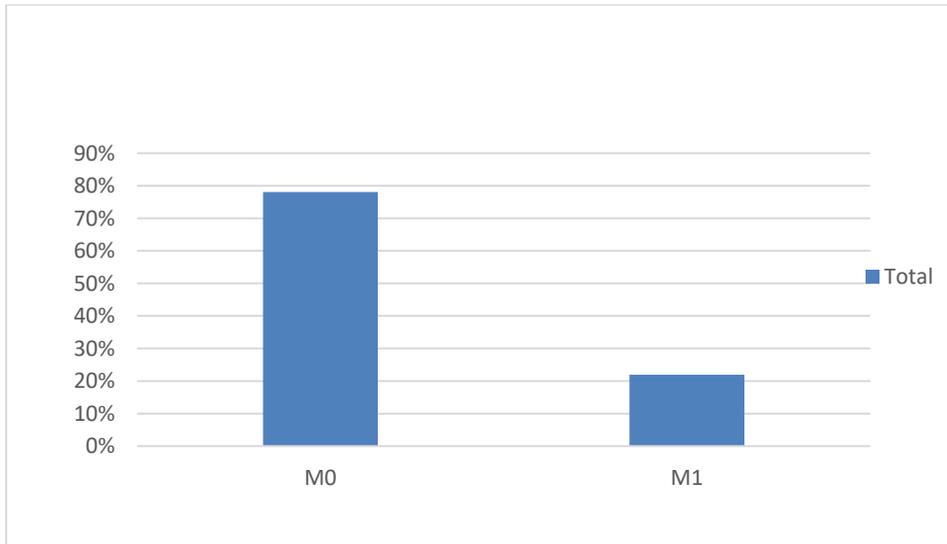


**Figure 28: Répartition des patientes selon l'âge**

➤ **Caractéristiques cliniques :**

**1. Métastases :**

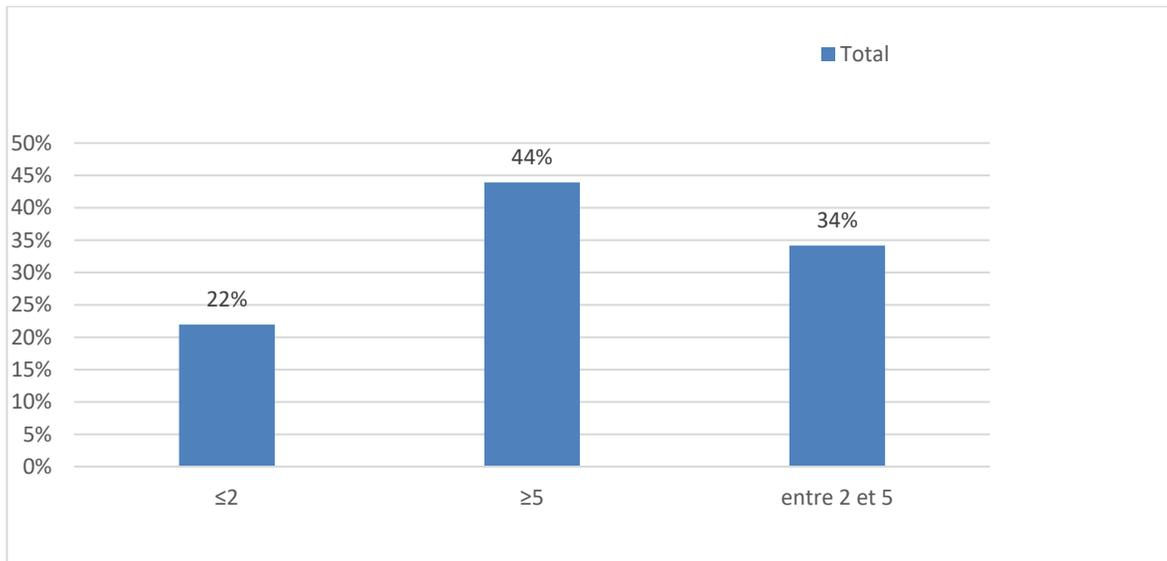
La présence de métastases est observée chez 9 patientes, ce que représente 22% des cas de CSTN. (Figure 29)



**Figure 29: Répartition des patientes selon la présence de métastases**

**2. Taille de la tumeur :**

La taille tumorale histologique variait de 0,7 à 12 cm avec une moyenne de 6,35 cm. 44% des tumeurs avait une taille supérieure à 5cm. (Figure 30)

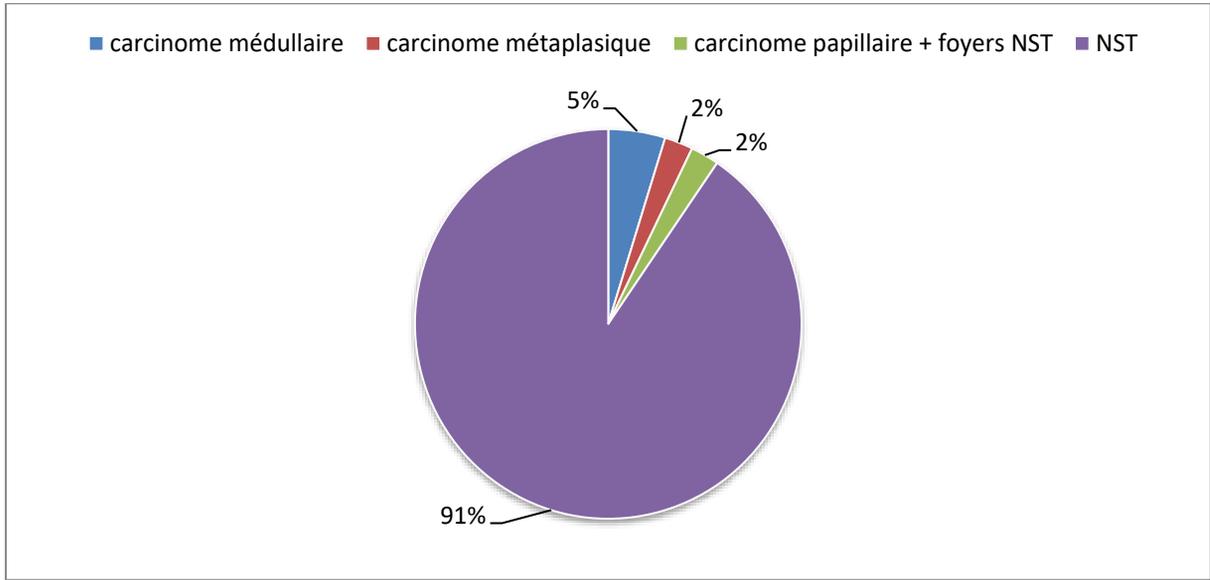


**Figure 30 : Répartition des patientes selon la taille tumorale**

➤ **Caractéristiques histologiques :**

1- *Type histologique*

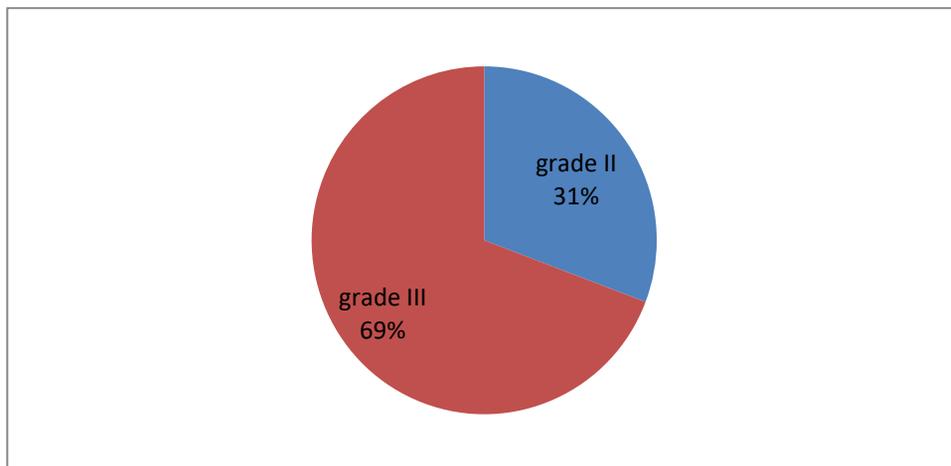
Le type histologique a été précisé presque chez toutes les patientes. Le carcinome mammaire invasif de type non spécifique (NST) était le plus prédominant avec un taux de 91 %, suivi du carcinome médullaire avec un taux de 5% et du carcinome métaplasique et carcinome papillaire avec un taux de 2% chacun. **(Figure 31)**



**Figure 31: Répartition des patientes selon le type histologique**

## 2- *Grade SBR modifié par Elis et Elston*

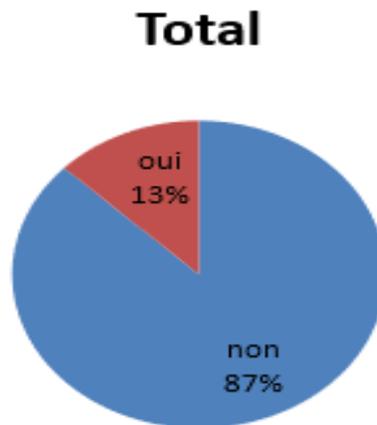
Le grade histopronostique de Scarff-Bloom et Richardson (SBR) a été précisé chez presque toutes les patientes. Le grade SBR III était le plus fréquent avec un taux de 69%, suivi du grade SBR II à un taux de 31%. (**Figure 32**)



**Figure 32: Répartition des patientes selon le grade SBR**

### 3- Embolies vasculaires :

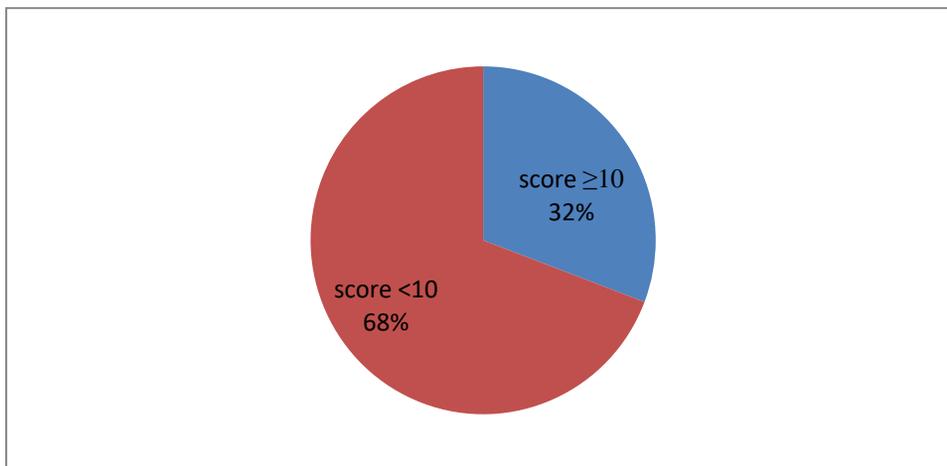
La recherche d'embolies vasculaires a été précisée chez presque toutes nos patientes dont 34/39 étaient négatifs soit un taux de 87 % et seulement 5 patientes étaient positives ce qui représente 13 % des cas. **(Figure 33)**



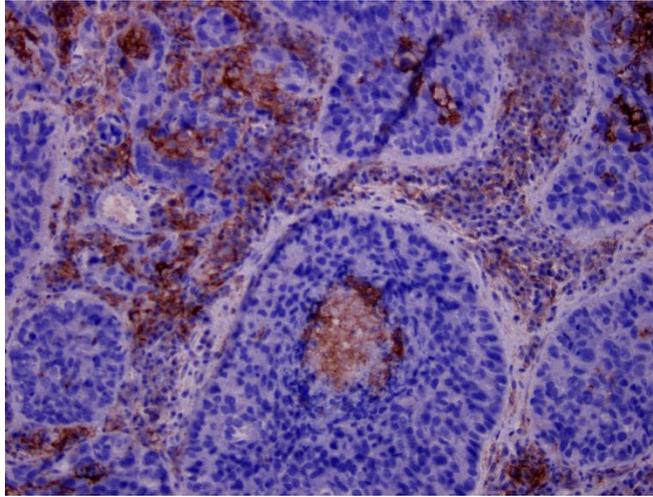
**Figure 33: Répartition des patientes selon la présence d'embolies vasculaires**

#### ➤ Caractéristique moléculaire :

L'évaluation de l'expression du biomarqueur PD-L1 chez nos patientes a montré un score CPS  $\geq 10$  chez 13 cas (32%). **(Figure 34)**



**Figure 34: Répartition des patientes selon le score CPS du PD-L1**



**Figure 35: marquage membranaire anti PD-L1 (Laboratoire d'anatomie pathologique INO)**

-l'image montre un marquage membranaire chez les cellules tumorales

➤ **Etude de corrélation :**

Le test khi-deux et le test student ont été utilisé pour étudier l'association entre nos variables afin d'évaluer la liaison entre l'expression du biomarqueur PD-L1 et nos variables (âge, métastases, taille tumeur, type histologique, grade SBR et embolies vasculaires) chez les patientes Marocaines atteintes de CSTN.

**1- Association de l'expression PD-L1 avec l'âge :**

L'analyse statistique par test-student n'a pas montré une association significative entre l'expression du PD-L1 et l'âge des patientes ( $p=0,8$ ).

**Tableau 1: corrélation entre l'âge et PD-L1**

: corrélation entre l'âge et PD-L1

Statistiques de groupe					
	PDL1	N	Moyenne	Ecart type	Moyenne erreur standard
Age	classe 1	23	53,17	14,699	3,065
	classe 2	16	53,25	14,830	3,708

Test des échantillons indépendants					
		Test de Levene sur l'égalité des variances		Test t pour égalité des moyennes	
		F	Sig.	t	ddl
Age	Hypothèse de variances égales	,064	,802	-,016	37
	Hypothèse de variances inégales			-,016	32,241

**2- Association de l'expression PDL1 avec la présence de métastases :**

L'analyse statistique par test Khi-deux entre l'expression PDL1 avec la présence de métastases n'a pas montré de différence statistiquement significative (p=0,69).

**Tableau 2: corrélation entre métastases et PD-L1**

: corrélation entre métastases et PD-L1

Tableau croisé métastases * PDL1				
Effectif		PDL1		Total
		classe 1	classe 2	
métastases	M0	19	13	32
	M1	6	3	9
Total		25	16	41

Tests du khi-carré					
	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Sig. exacte (bilatérale)	Sig. exacte (unilatérale)
khi-carré de Pearson	,157 <sup>a</sup>	1	,692		
Correction pour continuité	,000	1	,992		
Rapport de vraisemblance	,159	1	,690		
Test exact de Fisher				1,000	,503
N d'observations valides	41				

**3- Association de l'expression PD-L1 avec la taille de la tumeur :**

L'analyse statistique par test Khi-deux entre l'expression PD-L1 et la taille tumorale n'a pas montré de différence statistiquement significative ( $p=0,25$ ).

**Tableau 3: Corrélacion entre la taille de la tumeur et l'expression du PD-L1**

: Corrélacion entre la taille de la tumeur et l'expression du PD-L1

**Tableau croisé taille \* PDL1**

Effectif

		PDL1		Total
		classe 1	classe 2	
taille	T1	6	1	7
	T2	13	12	25
	T3	6	3	9
Total		25	16	41

**Tests du khi-carré**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	2,769 <sup>a</sup>	2	,250
Rapport de vraisemblance	3,030	2	,220
N d'observations valides	41		

#### 4- Association de l'expression PD-L1 avec le type histologique :

L'analyse statistique par test Khi-deux entre l'expression PD-L1 et la taille et le type histologique n'a pas montré de différence statistiquement significative ( $p=0,22$ ).

**Tableau 4: Corrélacion entre le type histologique et l'expression PD-L1**

: Corrélacion entre le type histologique et l'expression PD-L1

**Tableau croisé type histologique \* PDL1**

Effectif

		PDL1		Total
		classe 1	classe 2	
type histologique	carcinome médullaire	0	2	2
	carcinome métaplasique	1	0	1
	carcinome papillaire + foyers NST	1	0	1
	NST	23	14	37
Total		25	16	41

**Tests du khi-carré**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)
khi-carré de Pearson	4,427 <sup>a</sup>	3	,219
Rapport de vraisemblance	5,765	3	,124
N d'observations valides	41		

## 5- Association de l'expression PD-L1 avec le grade SBR :

L'analyse statistique par test Khi-deux entre l'expression du PDL1 et le grade SBR n'a pas montré de différence statistiquement significative ( $p=0,32$ ).

**Tableau 5: Corrélation entre le grade SBR et l'expression PD-L1**

: Corrélation entre le grade SBR et l'expression PD-L1

**Tableau croisé grade SBR \* PDL1**

Effectif

		PDL1		Total
		classe 1	classe 2	
grade SBR	II	10	4	14
	III	15	12	27
Total		25	16	41

**Tests du khi-carré**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Sig. exacte (bilatérale)	Sig. exacte (unilatérale)
khi-carré de Pearsor	,976 <sup>a</sup>	1	,323		
Correction pour continuité	,423	1	,515		
Rapport de vraisemblance	,999	1	,318		
Test exact de Fisher				,501	,260
N d'observations valides	41				

## 6- Association de l'expression PD-L1 et les embolies vasculaires :

L'analyse statistique par test Khi-deux entre l'expression PD-L1 et les embolies vasculaires n'a pas montré de différence statistiquement significative ( $p=0,76$ ).

## Tableau 6: Corrélation entre les embolies vasculaires et l'expression PD-L1

: Corrélation entre les embolies vasculaires et l'expression PD-L1

**Tableau croisé EV \* PDL1**

Effectif		PDL1		Total
		classe 1	classe 2	
EV	non	21	14	35
	oui	4	2	6
Total		25	16	41

**Tests du khi-carré**

	Valeur	ddl	Signification asymptotique (bilatérale)	Sig. exacte (bilatérale)	Sig. exacte (unilatérale)
khi-carré de Pearson	,096 <sup>a</sup>	1	,757		
Correction pour continuité	,000	1	1,000		
Rapport de vraisemblance	,097	1	,755		
Test exact de Fisher				1,000	,566
N d'observations valides	41				

## DISCUSSION

Le biomarqueur PD-L1 est exprimé sur les différents types de cellules, y compris les cellules tumorales et les cellules immunitaires, et la présence de PD-L1 dans le microenvironnement semble indiquer une résistance immunitaire à l'activité antitumorale endogène. **(Rabia Doğukan, et All, 2019)** Les études sur l'expression de PD-L1 dans les cancers du sein ont pris de l'importance au cours de ces dernières années. Dans ces études, on observe des taux différents d'expression de PD-L1 dans chacun des sous-groupes de cancer du sein. Pour cette raison, la fréquence d'expression de PD-L1 varie selon les études. **(Gizem Oner, 2021)** Les valeurs pronostiques et prédictives de PD-L1 dans les études publiées sont également controversées. **(Gizem Oner, 2021)**

Dans notre étude, l'âge moyen au diagnostic était 53 ans, ces résultats sont en accord avec les résultats observés chez les femmes algériennes **(Haddad S, 2018)**, mais ils sont moins élevés que les femmes brésiliennes. **(Rafael Ribeiro da Costa, 2021)** Avec la tranche d'âge la plus fréquente était 40 à 49 ans.

Les tumeurs triple-négatives sont généralement volumineuses, en effet 44% des tumeurs avaient une taille supérieure à 5cm ainsi. Ceci pourrait être dû d'une part à l'agressivité des tumeurs triples négatives et d'autre part au diagnostic tardif de ces tumeurs, ces résultats sont plus élevés que ceux observés chez **NA YUAN. (Yuan N et All, 2013)**

Toutes les tumeurs sont de haut grade (III et II) représentent respectivement 69% et 31%. Les résultats obtenus sont en accord avec la littérature. **(Akasbi Y, 2011) (Yuan N et All, 2013)** Les cancers du sein triple négatifs sont principalement des carcinomes invasifs de type non spécifique (NST) (91%) suivi par les carcinomes médullaires infiltrants (CMI) (5%), le NST chez nos patientes a été plus élevé que celui rapporté par **Seifeddine Ben Hammouda (82,5 %) (Ben hamouda S, 2020)**.

Notre série a montré une atteinte métastatique dans 22% des cas. Ces résultats sont conformes aux données de la littérature. **(O Al jarroudi, 2017) (Ghizlane Rais, 2012)**

L'invasion des vaisseaux lymphatiques (LVI) et l'invasion des vaisseaux sanguins (BVI) a été observée chez 13% de nos patientes. Ce résultat est plus élevé que celui rapporté par **Rais (7,8%) (Ghizlane Rais, 2012)** et moins élevé que celui de **Hajime Kurada (35%) (Kurada H, 2010)**.

Les résultats de grandes cohortes dans le cancer du sein triple négatif n'ont pas montré de relation statistiquement significative entre le statut d'expression tumorale ou microenvironnementale de PD-L1 et les principaux paramètres épidémio-clinico-pathologiques tels que l'âge, la taille de la tumeur, le type histologique, grade tumoral, envahissement lymphovasculaire ( emboles vasculaires ), la récurrence et/ou état métastatique, une corrélation entre l'expression de PD-L1 et nos paramètres épidémio-clinico-pathologiques (âge, taille de la tumeur, métastases, types histologique, grade SBR, et emboles vasculaire). Notre étude a révélé que les scores élevés de l'expression du PD-L1 se n'étaient pas associés significativement avec l'âge, taille de la tumeur, métastases, types histologique, grade SBR, et emboles vasculaires. Une étude réalisée en 2019 par **Rabia Doğukan** a montré les mêmes conclusions. (**Rabia Doğukan, et All, 2019**) Malgré qu'il existe plusieurs études dans la littérature qui rapportent une relation significative entre certains de ces paramètres et l'expression tumorale de PD-L1. (**Chenxi Y, 2019**)

Le fondement biologique par lequel l'expression de PD-L1 augmente pourrait être expliquée par d'autres paramètres non explorés dans notre étude tel que l'indice de prolifération Ki67. Des études avec de plus grandes séries peuvent clarifier la relation entre l'expression du PD-L1 et le microenvironnement.

Dans notre étude nous avons trouvé que le score CPS de l'expression du PD-L1 chez les patientes avec cancer du sein triple négatif était  $\geq 10$  chez 13 patientes (32%), plus élevé que le résultat d'**Elizabeth A** (19%) (**Elizabeth A, et All 2015**). ce qui représente une perspective thérapeutique de l'immunothérapie chez le 1/3 de ces patientes. Malheureusement nous avons pas pu faire le suivi pour ces femmes avec CSTN vu la durée de notre étude mais nous comptons le faire dans de prochains projets.

## **Conclusion :**

En conclusion, le taux d'expression de PD-L1 était remarquable à la fois dans la tumeur et dans le microenvironnement tumoral des cancers de sein triple négatif. Il n'y avait pas d'association statistiquement significative entre la positivité tumorale PD-L1 et les paramètres clinico-histologiques tels que la taille tumorale, le type histologique, aucune relation n'a été trouvée entre l'expression de PD-L1 et ces facteurs pronostiques. Les données présentées par d'autres rapports dans la littérature sont très variables en raison de différences techniques et de l'utilisation de plusieurs clones PD-L1 et des paramètres choisis.

À l'avenir, l'inhibition de PD-1/PD-L1 également peut être une option alternative de traitement adjuvant pour Patientes TNBC avec la charge tumorale résiduelle après chimiothérapie néoadjuvante, mais d'autres investigations sont nécessaires pour améliorer notre compréhension de PD-L1.

## Références bibliographiques :

- Adeline.Criniera, E. M. (2019). Helper-like innate lymphoid cells and cancer immunotherapy. Seminars in Immunology.*
- O Al jarroudi1 \*, N Abda2 , SA Brahmi1 , S Afqir. (2017). Triple Negative Breast Cancer at the University Hospital Mohammed VI – Oujda*
- Álvaro Ruibal, P. A. (2014). CA15.3 Serum Concentrations in Older Women with Infiltrating Ductal Carcinomas of the Breast. Int J Mol Sci, 19870–19876.*
- André Nkondjock, P. G. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. Medecin sciences, 175-180.*
- André Nkondjock, P. G. (2005). Risk factors and risk reduction of breast cancer. médecine sciences, 115-221 .*
- Andrechek, J.-R. J. (2017). Triple-negative breast cancer and the potential for targeted therapy. Future Medicine .*
- Ann Byrne, P. S. (2020). Tissue-resident memory T cells in breast cancer control and immunotherapy responses. Nature Reviews Clinical Oncology .*
- Anne Cowppli-Bony, M. C. (2019). Épidémiologie descriptive des cancers en France métropolitaine : incidence, survie. Bulletin du Cancer, 617-634.*
- Armando E Giuliano, S. B. (2018). Eighth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual: Breast Cancer. Ann Surg Oncol, 1783-1785.*
- Aurélié Roulot, D. H.-M. (2016). Tumoral heterogeneity of breast cancer. Ann Biol Clin, 653-660.*
- Bannister LH, Berry MM, Collins P, et al, éditeurs. Anatomie de Gray. 38e éd. New York: Churchill Livingstone, 1995:417-24.*
- Beldi-Ferchiou A, Etude des mecanismes regulateurs des cellules NK: role de la molecule PD-1 et de la PGE2*
- ben Hamouda S et All. Cancer du sein triple négatif: particularités anatomo-cliniques et moléculaires*
- Bou Zerdan M, Ghorayeb T, Saliba F, et al. Triple Negative Breast Cancer: Updates on Classification and Treatment in 2021. Cancers. 2022;14(5):1253. doi:10.3390/cancers14051253*
- Chenxi Yuan, et All. (2019). Expression of PD-1/PD-L1 in primary breast tumours and metastatic axillary lymph nodes and its correlation with clinicopathological parameters*

- C.Freund L.Mirabel, K. (2005). *Breastfeeding and breast cancer. Gynécologie Obstétrique & Fertilité*, 739-744.
- Chun-Chin Chen, W. F. (2018). *Homology-Directed Repair and the Role of BRCA1, BRCA2, and Related Proteins in Genome Integrity and Cancer. Annu Rev Cancer Biol*, 313–336.
- Clere, N. &. (2018). *L'hormonothérapie anticancéreuse. Actualités Pharmaceutiques*. 8–11.
- Coleman, C. (2017). *Early Detection and Screening for Breast Cancer. Seminars in Oncology Nursing*, 141–155.
- Cserni G. *Histological type and typing of breast carcinomas and the WHO classification changes over time. Pathologica*. 2020;112(1):25-41.
- D'Amato, V. R. (2015). *Mechanisms of lapatinib resistance in HER2-driven breast cancer. Cancer Treatment Reviews*, 877–883.
- David G. DeNardo, P. A. (2010). *Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. Cancer Metastasis Rev*, 309–316.
- Elizabeth A. Mittendorf<sup>1</sup>, Anne V. Philips<sup>1</sup>, Funda Meric-Bernstam<sup>1</sup>, Na Qiao<sup>1</sup>, (2015). *PD-L1 Expression in Triple Negative Breast Cancer*
- G.Marinari, C.-R. C. (2019). *Physical activity, obesity and breast cancer: which practical conclusions? Science & Sports*, 191-198.
- Gavin P. Dunn, A. T. (2002). *Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. Nat Immunol.*, 991-998.
- Gavin P.Dunn, L. J. (2004). *The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. Cell Press*, 137-148.
- Goddard ET, B. S. (2019). *Association Between Postpartum Breast Cancer Diagnosis and Metastasis and the Clinical Features Underlying Risk. JAMA Netw Open*. .
- Gompel, A. (2019). *Hormones et cancers de sein. Presse Med*.
- Granier C, Soumelis V, Mandavit M, et al. *Les « immune checkpoints », comment ça marche. Ann Pathol*. 2017;37(1):18-28.
- Gizem Oner, et All (2021). *Clinical impact of PD-L1 expression in triple-negative breast cancer patients with residual tumor burden after neoadjuvant chemotherapy*
- Haddad S, et All ( 2018). *Descriptive study of triple negative breast cancer in Eastern Algeria*
- Han Y, Liu D, Li L (2020). *PD-1/PD-L1 pathway: current researches in cancer. :16*

- Heisey.R, C. (2016). *Identification et prise en charge des femmes ayant des antécédents familiaux de cancer du sein: Guide pratique à l'intention des médecins. Europe PMC, 572-577.*
- HélèneSancho-Garnier, M. C. (2019). *Épidémiologie des cancers du sein. La Presse Médicale, 1076-1084.*
- Hui E, C. J. (2017). *T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition. Science, 1428-1433.*
- JA, A.-G. (2007). *Models, mechanisms and clinical evidence for cancer dormancy. Nat Rev Cancer. , 834-846.*
- JS, O. (2006). *Human natural killer cell deficiencies. curr opin allergy clin immunol , 399–409.*
- kurada H *Vascular Invasion in Triple-Negative Carcinoma of the Breast Identified by Endothelial Lymphatic and Blood Vessel Markers*
- Karl-Johan.Malmberg, M. A.-G. (2017). *Natural killer cell-mediated immunosurveillance of human cancer. Seminars in Immunology, 20-29.*
- Louise Maumy, G. H. (2020). *Impact of nutrition on breast cancer mortality and risk of recurrence, a review of the evidence. Bulletin du Cancer, 61-71.*
- Kunte S, Abraham J, Montero AJ (2020). *Novel HER2-targeted therapies for HER2-positive metastatic breast cancer. Cancer 2020;126:4278–88.*
- Mahmoud.SM. (2011). *Tumor-infiltrating CD8+ lymphocytes predict clinical outcome in breast cancer. J Clin Oncol., 1949-1955.*
- Mariya Rozenblit, all(2020) *Comparison of PD-L1 protein expression between primary tumors and metastatic lesions in triple negative breast cancers*
- Matthew D. Vesely, M. H. (2011). *Natural Innate and Adaptive Immunity to Cancer. Annual Review of Immunology, 235-271.*
- Meriem Elbachiri, S. F. (2017). *Cancer du sein chez l'homme: à propos de 40 cas et revue de la littérature. Pan African Medical Journal.*
- Niell BL, F. P. (2017). *Screening for Breast Cancer. Radiol Clin North Am.*
- Park R, Winnicki M, Liu E, Chu WM (2019). *Immune checkpoints and cancer in the immunogenomics era. Brief Funct Genomics. 2019*
- Rabia Doğukan , et All(2019). *Correlation between the Expression of PD-L1 and Clinicopathological Parameters in Triple Negative Breast Cancer Patients*
- Rafael Ribeiro da Costa et All (2021) *Prognostic factors in triple-negative breastcancer: a retrospective cohort*
- Seidel JA, Otsuka A, Kabashima K. *Anti-PD-1 and Anti-CTLA-4 Therapies in Cancer: Mechanisms of Action, Efficacy, and Limitations. Front Oncol. 2018;8:86.*

- Rosenblum MD, R. K. (2015). *Mechanisms of human autoimmunity. J Clin Invest* , 2228-3223.
- Salmon, J.-F. M.-L. (2015). *Le cancer du sein. France: Masson.*
- Shao Y., Sun X., He Y., Liu C. and Liu H. (2015) *Elevated levels of serum tumor markers CEA and CA15-3 are prognostic parameters for different molecular subtypes of breast cancer.*
- Sun X., Kaufman P.D. *Ki-67: More than a proliferation marker. Chromosoma. 2018;127:175–186.*
- Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. . *Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. Int J Biol Sci (2017) 13(11):1387–97.*
- Tavares D, Chaves Ribeiro V, Moreira Cardoso-Júnior L, Rhangel Gomes Teixeira T, Ramos Varrone G, Lopes Britto R. *Immunotherapy using PD-1/PDL-1 inhibitors in triple-negative breast cancer: a systematic review. Oncol Rev. 2021;15(2)*
- Tolba MF, Santa-Maria CA, Albin A, Chimusa ER, Al-Ramadi BK, Tolaney SM. *Editorial: Immunotherapy as an Evolving Approach for the Treatment of Breast Cancer. Front Oncol. 2021;*
- VA, B. (2017). *Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway. N Engl J Med, 1767–1778.*
- Yuan N et All, (2013). *Clinical characteristics and prognostic analysis of triple-negative breast cancer patients*
- Yan B, Yau EX, Bte Omar SS, et al. *A study of HER2 gene amplification and protein expression in gastric cancer. J Clin Pathol (2010);63:839-42.*
- Zhiyuan Li, D. L. (2015). *FOXP3+ regulatory T cells and their functional regulation. nature:cellular & molecular immunology, 558-565.*

# ANNEXE 1

## Fiche d'exploitation

- Épidémiologie :

Nom et prénom :

Numéro de dossier :

Age :

- Classification TNM :

Taille tumorale (cm):      ≤2                    ≥5

Ganglions :                    Oui                    Non

Métastase :                    Oui                    Non

- Anatomie pathologique :

Type histologique :

Adénocarcinome NST

Carcinome lobulaire

Carcinome métaplasique

Carcinome micropapillaire

Autre:

Grade histopronostique de Scarff Bloom et Richardson (SBR) :

Grade I

Grade II

Grade III

Emboles vasculaires:                    Présents                    Absents

Composante intra-canaulaire :                    Présente                    Absente

- Expression de PD-L1 :

Score CPS :

Moins de 10%

Plus de 10%

## **ANNEXE 2**

**Protocole de la coloration HE sont les suivantes**

- ✓ **Mise dans une étuve à 60 degrés pendant une heure (afin d'éliminer l'eau)**
- ✓ **Déparaffinage par le toluène (3 bains de 5 minutes chacun).**
- ✓ **Réhydratation avec de l'alcool à concentration décroissante (3 bains de 3 minutes chacun)**
- ✓ **Coloration à l'hématoxyline 1 à 3 min selon le colorant.**
- ✓ **Rinçage dans l'eau courant.**
- ✓ **Eau acidifiée pour éliminer l'excès d'hématoxyline.**
- ✓ **Rinçage dans l'eau courant.**
- ✓ **Eau ammoniacale pour la différenciation.**
- ✓ **Rinçage dans l'eau courant.**
- ✓ **Coloration à l'éosine de 30 à 1 min selon le colorant.**
- ✓ **Rinçage dans l'eau courant.**
- ✓ **Déshydratation à concentration croissante d'alcool (3 bains, un passage de bain).**
- ✓ **Imprégner les lames dans un bain de toluène.**
- ✓ **Montage : fixer une lamelle sur la lame avec de la colle.**

## **ANNEXE 3**

### **Protocole d'immunohistochimie pour RE, RP, HER2, Ki67**

- ✓ Déparaffinage et démasquages (PTlink a pH 9( RE, RP) et pH 6 (HER2, Ki67))
- ✓ Blocage des peroxydes endogènes pour inhiber les sites antigéniques non spécifiques ( 5 minutes ), rincer dans wash buffer ( 5 minutes )
- ✓ Application d'un anticorps primaire : Couvrir l'anticorps primaire ( incubé (20 à 30 minutes) puis rincer dans le wash buffer (5 minutes)
- ✓ Application de l'amplificateur du marquage (mousse linkers), incubé (20 minutes), rincer dans le wash buffer (5 minutes)
- ✓ Application de l'anticorps secondaire (streptavidine-biotine) : couvrir avec l'anticorps secondaire, incubé ( 30 minutes), rincer dans le wash buffer (5 minutes)
- ✓ Application du substrat chromogène (diaminobenzidine ou DAB) : Diluer la DAB chromogène dans le substrat( une goutte de chromogène / 1 ml de substrat ), couvrir les lames avec ce complexe qui forme une couleur brune au site de l'antigène cible. Incuber (5 minutes), rincer dans wash buffer ( 5 minutes )
- ✓ Passage dans l'hématoxyline incubé ( 30 secondes )
- ✓ Déshydratation : Passage dans l'alcool à concentration croissante et dans deux bains de toluène.
- ✓ Montage

## **ANNEXE 4**

### **Protocole d'immunohistochimie pour le PDL 1**

- **Déparaffinage et démasquages (PTlink a pH 9)**
- **Blocage des peroxydes endogènes pour inhiber les sites antigéniques non spécifiques ( 5 minutes ), rincer dans wash buffer ( 5 minutes )**
- **Application d'un anticorps primaire : Couvrir l'anticorps anti P-DL1, incuber (20 minutes) puis rincer dans le wash buffer (5 minutes)**
- **Application de l'amplificateur du marquage (mousse linkers), incuber (20 minutes), rincer dans le wash buffer (5 minutes)**
- **Application de l'anticorps secondaire (streptavidine-biotine) : couvrir avec l'anticorps secondaire, incuber ( 30 minutes), rincer dans le wash buffer (5 minutes)**
- **Application du substrat chromogène (diaminobenzidine ou DAB) : Diluer la DAB chromogène dans le substrat( une goutte de chromogène / 1 ml de substrat ), couvrir les lames avec ce complexe qui forme une couleur brune au site de l'antigène cible. Incuber (5 minutes), rincer dans wash buffer ( 5 minutes )**
- **Application du réactif DAB inhancer incuber ( 5minutes ), rincer a l'eau distillée ( 5min )**
- **Passage dans l'hématoxyline incuber ( 30 secondes )**
- **Déshydratation : Passage dans l'alcool à concentration croissante et dans deux bains de toluène.**
- **Montage**