

ANNÉE 2015

2015 TOU3 1568

THÈSE

**POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE**  
MÉDECINE SPÉCIALISÉE CLINIQUE

Présentée et soutenue publiquement

par

**Maxime GUERIN**

le 09 octobre 2015

**CARACTERISATION D'UN NOUVEL ANTICORPS MONOCLONAL,  
TWNB**

Directeur de thèse : Dr Philippe ROCHAIX

**JURY**

Monsieur le Professeur	Pierre BROUSSET	Président
Madame le Professeur	Laurence LAMANT	Assesseur
Madame le Professeur	Anne GOMEZ-BROUCHET	Assesseur
Madame le Docteur	Magali LACROIX-TRIKI	Assesseur
Monsieur le Docteur	Philippe ROCHAIX	Suppléant

**TABLEAU du PERSONNEL HU**  
**des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier**  
**au 1<sup>er</sup> septembre 2014**

**Professeurs honoraires**

Doyen Honoraire	M. ROUGE D.	Professeur Honoraire	M. SALVADOR M.
Doyen Honoraire	M. LAZORTHES Y.	Professeur Honoraire	M. BAYARD
Doyen Honoraire	M. CHAP H.	Professeur Honoraire	M. LEOPHONTE
Doyen Honoraire	M. GUIRAUD-CHAUMEIL B.	Professeur Honoraire	M. FABIÉ
Professeur Honoraire	M. COMMANAY	Professeur Honoraire	M. BARTHE
Professeur Honoraire	M. CLAUX	Professeur Honoraire	
Professeur Honoraire	M. ESCHAPASSE	Professeur Honoraire	M. CABARROT
Professeur Honoraire	Mme ENJALBERT	Professeur Honoraire	M. DUFFAUT
Professeur Honoraire	M. GEDEON	Professeur Honoraire	M. ESCAT
Professeur Honoraire	M. PASQUIE	Professeur Honoraire	M. ESCANDE
Professeur Honoraire	M. RIBAUT	Professeur Honoraire	M. PRIS
Professeur Honoraire	M. ARLET J.	Professeur Honoraire	M. CATHALA
Professeur Honoraire	M. RIBET	Professeur Honoraire	M. BAZEX
Professeur Honoraire	M. MONROZIES	Professeur Honoraire	M. VIRENQUE
Professeur Honoraire	M. DALOUS	Professeur Honoraire	M. CARLES
Professeur Honoraire	M. DUPRE	Professeur Honoraire	M. BONAFÉ
Professeur Honoraire	M. FABRE J.	Professeur Honoraire	M. VAYSSE
Professeur Honoraire	M. DUCOS	Professeur Honoraire	M. ESQUERRE
Professeur Honoraire	M. GALINIER	Professeur Honoraire	M. GUITARD
Professeur Honoraire	M. LACOMME	Professeur Honoraire	M. LAZORTHES F.
Professeur Honoraire	M. BASTIDE	Professeur Honoraire	M. ROQUE-LATRILLE
Professeur Honoraire	M. COTONAT	Professeur Honoraire	M. CERENE
Professeur Honoraire	M. DAVID	Professeur Honoraire	M. FOURNIAL
Professeur Honoraire	Mme DIDIER	Professeur Honoraire	M. HOFF
Professeur Honoraire	M. GAUBERT	Professeur Honoraire	M. REME
Professeur Honoraire	Mme LARENG M.B.	Professeur Honoraire	M. FAUVEL
Professeur Honoraire	M. BES	Professeur Honoraire	M. FREXINOS
Professeur Honoraire	M. BERNADET	Professeur Honoraire	M. CARRIERE
Professeur Honoraire	M. GARRIGUES	Professeur Honoraire	M. MANSAT M.
Professeur Honoraire	M. REGNIER	Professeur Honoraire	M. BARRET
Professeur Honoraire	M. COMBELLES	Professeur Honoraire	M. ROLLAND
Professeur Honoraire	M. REGIS	Professeur Honoraire	M. THOUVENOT
Professeur Honoraire	M. ARBUS	Professeur Honoraire	M. CAHUZAC
Professeur Honoraire	M. PUJOL	Professeur Honoraire	M. DELSOL
Professeur Honoraire	M. ROCHICCIOLI	Professeur Honoraire	M. ABBAL
Professeur Honoraire	M. RUMEAU	Professeur Honoraire	M. DURAND
Professeur Honoraire	M. BESOMBES	Professeur Honoraire	M. DALY-SCHWEITZER
Professeur Honoraire	M. GUIRAUD	Professeur Honoraire	M. RAILHAC
Professeur Honoraire	M. SUC	Professeur Honoraire	M. POURRAT
Professeur Honoraire	M. VALDIGUIE	Professeur Honoraire	M. QUERLEU D.
Professeur Honoraire	M. BOUNHOURE	Professeur Honoraire	M. ARNE JL.
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER	Professeur Honoraire	M. ESCOURROU J.
Professeur Honoraire	M. CARTON	Professeur Honoraire	M. FOURTANIER G.
Professeur Honoraire	Mme PUEL J.	Professeur Honoraire	M. LAGARRIGUE J.
Professeur Honoraire Associé	M. GOUZI		M. PESSEY JJ.
Professeur Honoraire	M. DUTAU		
Professeur Honoraire	M. PONTONNIER		
Professeur Honoraire	M. PASCAL		

**Professeurs émérites**

Professeur LARROUY	Professeur JL. ADER
Professeur ALBAREDE	Professeur Y. LAZORTHES
Professeur CONTE	Professeur L. LARENG
Professeur MURAT	Professeur F. JOFFRE
Professeur MANELFE	Professeur J. CORBERAND
Professeur LOUVET	Professeur B. BONEU
Professeur SARRAMON	Professeur H. DABERNAT
Professeur CARATERO	Professeur M. BOCCALON
Professeur GUIRAUD-CHAUMEIL	Professeur B. MAZIERES
Professeur COSTAGLIOLA	Professeur E. ARLET-SUAU
	Professeur J. SIMON



**FACULTE DE MEDECINE TOULOUSE-RANGUEIL**

133, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE Cedex

**Doyen : E. SERRANO****P.U. - P.H.****Classe Exceptionnelle et 1<sup>ère</sup> classe**

M. ACAR Ph	Pédiatrie
M. ALRIC L.	Médecine Interne
M. ARLET Ph (C.E)	Médecine Interne
M. ARNAL J.F	Physiologie
Mme BERRY I.	Biophysique
M. BOUTAULT F. (C.E)	Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale
M. BUSCAIL L.	Hépatogastro-Entérologie
M. CANTAGREL A.	Rhumatologie
M. CARON Ph. (C.E)	Endocrinologie
M. DHAMONTIN B. (C.E)	Thérapeutique
M. CHAVOIN J.P. (C.E)	Chirurgie Plastique et Reconstructrice
M. CHIRON Ph.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
Mme COURTADE SAÏD M	Histologie Embryologie
M. DELABESSE E.	Hématologie
Mme DELISLE M.B. (C.E)	Anatomie Pathologie
M. DIDIER A.	Pneumologie
M. ELBAZ M.	Cardiologie
M. GALINIER M.	Cardiologie
M. JERAUD G.	Neurologie
M. GLOCK Y.	Chirurgie Cardio-Vasculaire
M. GOURDY P.	Endocrinologie
M. GRAND A. (C.E)	Epidémiol. Eco. de la Santé et Prévention
Mme HANAIRE H. (C.E)	Endocrinologie
M. KAMAR N.	Néphrologie
M. LARRUE V.	Neurologie
M. LAURENT G. (C.E)	Hématologie
M. LEVADE T.	Biochimie
M. MALECAZE F. (C.E)	Ophthalmologie
Mme MARTY N.	Bactériologie Virologie Hygiène
M. MASSIF P.	Maladies Infectieuses
M. PLANTE P.	Urologie
M. RAYNAUD J-Ph.	Psychiatrie Infantile
M. RITZ P.	Nutrition
M. ROCHE H. (C.E)	Cancérologie
M. ROSTAING L. (C.E)	Néphrologie
M. ROUGE D. (C.E)	Médecine Légale
M. ROUSSEAU.H.	Radiologie
M. SALVAYRE R. (C.E)	Biochimie
M. SCHMITT L. (C.E)	Psychiatrie
M. SENARD J.M.	Pharmacologie
M. SERRANO E. (C.E)	O. R. L.
M. SOULIE M.	Urologie
M. SUC B.	Chirurgie Digestive
Mme TAUBER M T	Pédiatrie
M. VELLAS B. (C.E)	Généralité

**P.U. - P.H.****2<sup>ème</sup> classe**

M. ACCADBLED F.	Chirurgie Infantile
Mme ANDRIEU S.	Epidémiologie
M. ARBUS Ch.	Psychiatrie
M. BERRY A.	Parasitologie
M. BONNEVILLE F.	Radiologie
M. BUJAN L.	Uro-Andrologie
Mme BURA-RIVIERE A.	Médecine Vasculaire
M. CHAYNES P.	Anatomie
M. CHAUFOUR X.	Chirurgie Vasculaire
M. CONSTANTIN A.	Rhumatologie
M. DELOBEL P.	Maladies Infectieuses
Mme DULY BOUHANICK B.	Thérapeutique
M. COURBON	Biophysique
M. DAMBRIN C.	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire
M. DECRAMER S.	Pédiatrie
M. DELORD JP.	Cancérologie
M. GALINIER Ph.	Chirurgie Infantile
M. GARRIDO-STOWHAS I.	Chirurgie Plastique
Mme GOMEZ-BROUCHET A.	Anatomie Pathologique
M. GROLLEAU RAOUX J.L.	Chirurgie plastique
Mme GUMBAUD R.	Cancérologie
M. HUYGHE E.	Urologie
M. LAFOSSSE J.M.	Chirurgie Orthopédique et Traumatologie
M. LEGUEVAQUE P.	Chirurgie Générale et Gynécologique
M. MARCHEIX B.	Chirurgie thoracique et cardiovasculaire
M. MARQUE Ph.	Médecine Physique et Rééducation
Mme MAZERESSEAU J.	Dermatologie
M. MINVILLE Y.	Anesthésiologie Réanimation
M. MUSCARI F.	Chirurgie Digestive
M. OTAL Ph.	Radiologie
M. ROLLAND Y.	Généralité
M. ROUX F.E.	Neurochirurgie
M. SAILLER L.	Médecine Interne
M. SOULAT J.M.	Médecine du Travail
M. TACK I.	Physiologie
M. VAYSSIERE Ch.	Gynécologie Obstétrique
M. VERGEZ S.	O.R.L.
Mme URO-COSTE E.	Anatomie Pathologique

Professeur Associé de Médecine Générale

Dr VIDAL M.

Professeur Associé en O.R.L.

WOISARD V.

**M.C.U. - P.H.**

M. APOIL P. A.	Immunologie
Mme ARNAUD C.	Epidémiologie
M. BIETH E.	Généraliste
Mme BONGARD V.	Epidémiologie
Mme CASPAR BAUBUJL S.	Nutrition
Mme CASBAING S.	Parasitologie
Mme CONCINA D.	Anesthésie-Réanimation
M. DONGY N.	Immunologie
Mme COURRON	Pharmacologie
Mme DAMASE C.	Pharmacologie
Mme de GLISEZENSKY I.	Physiologie
Mme DELMAS C.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DE MAS V.	Hématologie
M. DUBOIS D.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme DUGUET A.M.	Médecine Légale
M. DUPUI Ph.	Physiologie
Mme FILLAUX J.	Parasitologie
M. GANTET P.	Biophysique
Mme GENNERO L.	Biochimie
Mme GENOUX A.	Biochimie et biologie moléculaire
M. HAMDJ S.	Biochimie
Mme HITZEL A.	Biophysique
M. IRIART X.	Parasitologie et mycologie
M. JALBERT F.	Stomato et Maxillo Faciale
M. KIRZIN S.	Chirurgie générale
Mme LAPEYRE-MESTRE M.	Pharmacologie
M. LAURENT C.	Anatomie Pathologique
Mme LE TINNIER A.	Médecine du Travail
M. LOPEZ R.	Anatomie
M. MONTOYA R.	Physiologie
Mme MOREAU M.	Physiologie
Mme NOGUEIRA M.L.	Biologie Cellulaire
M. PILLARD F.	Physiologie
Mme PRERE M.F.	Bactériologie Virologie
Mme PUISSANT B.	Immunologie
Mme RAGAB J.	Biochimie
Mme RAYMOND S.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme SABOURDY F.	Biochimie
Mme SAUNE K.	Bactériologie Virologie
M. SILVA BIFONTES S.	Réanimation
M. SOLER V.	Ophthalmologie
M. TAFANI J.A.	Biophysique
M. TREINER E.	Immunologie
Mme TREMOILLIERES F.	Biologie du développement
M. TRICOIRE J.L.	Anatomie et Chirurgie Orthopédique
M. VINCENT C.	Biologie Cellulaire

**M.C.U. - P.H.**

Mme ABRAVANEL F.	Bactériologie, Virologie Hygiène
M. BES J.C.	Histologie - Embryologie
M. CAMBUS J.P.	Hématologie
Mme CANTERO A.	Biochimie
Mme CARFAGNA L.	Pédiatrie
Mme CASSOL E.	Biophysique
Mme CAUSSE E.	Biochimie
M. CHASSAING N.	Généraliste
Mme CLAVE D.	Bactériologie Virologie
M. CLAVEL C.	Biologie Cellulaire
Mme COLLIN L.	Cytologie
M. CORRE J.	Hématologie
M. DEDOUIT F.	Médecine Légale
M. DELPLA P.A.	Médecine Légale
M. DESPAS F.	Pharmacologie
M. EDOUARD T.	Pédiatrie
Mme ESQUIROL Y.	Médecine du travail
Mme ESCOURROU G.	Anatomie Pathologique
Mme GALINIER A.	Nutrition
Mme GARDETTE V.	Epidémiologie
M. GASQ D.	Physiologie
Mme GHARE M.	Bactériologie Virologie Hygiène
Mme GUILBEAU-FRUGIER C.	Anatomie Pathologique
Mme GUYONNET S.	Nutrition
Mme INGUENEAU C.	Biochimie
M. LAHARRAGUE P.	Hématologie
M. LAIREZ O.	Biophysique et médecine nucléaire
M. LEANDRI R.	Biologie du dével. et de la reproduction
M. LEPAGE B.	Biostatistique
Mme MAUPAS F.	Biochimie
M. MIEUSSET R.	Biologie du dével. et de la reproduction
Mme PERROUET B.	Nutrition
Mme NASR N.	Neurologie
Mme PRADDAUDE F.	Physiologie
M. RIMAILHO J.	Anatomie et Chirurgie Générale
M. RONGIERES M.	Anatomie - Chirurgie orthopédique
Mme SOMMET A.	Pharmacologie
M. TKACZUK J.	Immunologie
M. VALLET P.	Physiologie
Mme VEZZOSI D.	Endocrinologie

**M.C.U.**

M. BISMUTH S.	Médecine Générale
Mme ROUGE-BUGAT ME.	Médecine Générale
Mme ESCOURROU B.	Médecine Générale

Maîtres de Conférences Associés de Médecine Générale

Dr STILLMUNKES A.	Dr BISMUTH M.
Dr BRILLAC Th.	Dr BOYER P.
Dr ABITTEBOULY.	Dr ANE S.
Dr CHICOULAA B.	

# **Remerciements**

**A notre Maître et Président du jury,  
Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET**

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury et de nous accueillir dans votre service.

Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement et de votre expérience.

Nous vous remercions de votre aide et de votre disponibilité. Nous espérons honorer la confiance que vous nous accordez.

Nous sommes fier et impatient de rejoindre votre équipe du service d'anatomie et cytologie pathologiques.

**A notre jury de thèse,**

**Madame le Professeur Laurence LAMANT,**

Tu nous fais l'honneur de siéger au jury de notre thèse.

Nous te sommes très reconnaissant de l'intérêt que tu as porté à notre travail.

Ton expertise diagnostique et scientifique, tes enseignements, ta disponibilité et ton enthousiasme sont une source d'inspiration pour nous tous.

Nous sommes impatient de travailler à tes côtés.

**Madame le professeur Anne GOMEZ-BROUCHET,**

Tu nous fais l'honneur de siéger à ce jury et nous te sommes très reconnaissant de juger notre travail.

Nous te remercions de nous avoir associé à tes travaux scientifiques.

Nous sommes ravis de bientôt pouvoir travailler à tes côtés.

**Madame le Docteur Magali LACROIX-TRIKI,**

Tu nous fais l'honneur de siéger à notre jury de thèse.

Tes compétences diagnostiques et scientifiques forcent le respect.

Nous tenons à te remercier pour ton implication particulière dans notre travail.

Nous te remercions pour ton soutien, ton enthousiasme et ta bonne humeur au quotidien. Ta porte est toujours restée grande ouverte et tes conseils nous ont toujours été d'une aide précieuse.

Tu as toute notre admiration et notre reconnaissance.

**A notre directeur de thèse,  
Monsieur le Docteur Philippe ROCHAIX,**

Pour nous faire l'honneur de diriger ce travail et de nous avoir fait confiance,  
Pour ta capacité à transmettre ta passion du diagnostique et de la recherche toujours  
avec simplicité et humour.

Tu nous as démontré que rigueur et bonne humeur ne sont pas incompatibles.

Que ce travail soit le témoignage de notre plus grande estime et de notre  
reconnaissance sincère.

**Aux personnes sans qui ce travail n'aurait pas pu voir le jour :**

Ouafa ZAKI et Charley LAGARDE du laboratoire de recherche INSERM.

Alix LE TOUZE, stagiaire.

Thomas FILLERON, Méthodologiste-Biostatisticien du Bureau des Essais Cliniques.

Aux techniciens d'immuno : Audrey, Laurence, Armelle, Gabrielle, Julien, ainsi que tous ceux qui m'ont aidé dans la réalisation de ce travail.

Et à l'ensemble l'équipe du laboratoire d'anatomie et cytologie pathologique de l'IUCT-Oncopole de Toulouse.

**A mes parents,**

Vous m'avez toujours épaulé et encouragé.

Je vous dois tout.

Mon but a toujours été de vous rendre heureux et fiers. Pour le job c'est bien parti, et pour le reste j'espère mieux faire encore.

Merci pour tout.

**A Olivia,**

Mon amour.

Je pourrais cosigner ce travail avec toi tant ton soutien technique a été sans faille.

Nous devons notre rencontre fracassante aux folles nuits toulousaines. Et tu as rapidement pris une place essentielle dans ma vie et nous voilà inséparables.

Chaque jour à tes côtés m'apporte un bonheur indescriptible.

Que notre avenir proche et lointain se remplisse des plus belles choses que la vie pourra nous offrir.

## **A ma famille,**

A Noémie, ma grande sœur. Tu es la littéraire de la famille et ton parcours impose le respect. Aujourd'hui c'est à mon tour d'arriver au bout des études et c'est avec plein de fierté que je partage ce moment avec toi. Je te souhaite plein de réussite pour ton nouveau départ et surtout un parfait bonheur auprès de Guillaume !

A Côme, mon petit frère. Tu es le prochain à passer le cap et j'ai hâte de venir partager ça à tes côtés. Bon, les nuits toulousaines n'ont plus de secret pour toi, c'est donc en connaisseur que tu viens fêter l'événement !

A mes grands parents,

Grand-Père, j'espère vous rendre fier là-haut. Je garde de merveilleux souvenirs de nos voyages et de nos longs échanges.

Mamitou, vous m'avez toujours soutenu et encouragé. C'est avec toute mon affection que je vous dédicace ce travail.

Daddy, tu m'as transmis ta passion pour la médecine. Tu m'as guidé tout au long de mes études et c'est aujourd'hui une grande fierté de te dédier le résultat de ce travail.

Manée, tu as toujours été à nos côtés. Tu as toujours bien pris soin de nous et je te dois d'innombrables et de merveilleux souvenirs d'enfance.

**Aux différents médecins auprès desquels j'ai travaillé et appris pendant ces nombreuses années :**

Au Professeur Georges DELSOL, votre carrière force le respect. C'est un honneur d'avoir pu profiter de votre enseignement.

Au Professeur Marie-Bernadette DELISLE. Nous avons eu le privilège de bénéficier de votre enseignement et de votre expérience. Vos compétences diagnostiques et scientifiques forcent le respect.

Au Docteur Catherine MAZEROLLES. Ce fut un honneur d'avoir appris à tes côtés. Je garde un souvenir ému de nos longs échanges professionnels et personnels. Ton enthousiasme et ton dynamisme nous manquent.

Au Professeur Emmanuelle URO-COSTE.

Aux Docteurs Janick SELVES, Marie DANJOUX, Camille LAURENT, Béatrice BARRES, Isabelle DUGA, Jacqueline AZIZA, Martine DELSOL, Chantal MONDON.

Aux Docteurs Isabelle ROUQUETTE, Ghislaine ESCOURROU, Marie-Laure QUINTYN, Céline GUILBEAU, Nada MOUKARBEL, Caroline CAPUANI.

Aux Docteurs Eliane MERY, Véronique MAISONGROSSE, Sophie LEGUELLEC, Raphaëlle DUPREZ-PAUMIER.

Au Professeur Monique COURTADE-SAÏDI,

Aux Docteurs Céline BASSET, Dominique D'AURE, Laëtitia COLLIN.

A Emilie Tournier, tu m'as coaché quand j'étais un bébé interne, et tu m'as bien soutenu en tant que coloc de bureau à grand renfort de chocolat noir ! Ta gentillesse est au niveau de ton débit verbal ... T'es au top !

A Florence BREIBACH, toujours souriante, toujours sympa, toujours dispo. C'est toujours un vrai plaisir de travailler ensemble !

A Fabrice PROJETTI, tu as finalement réussi à te faire apprécier grâce aux tournées de fraises Tagada... Mais attention, un modjo n'est jamais loin !

A Audrey DELAS, je t'ai montré tes premières lames d'anapath à ton arrivée, aujourd'hui l'élève a dépassé le maître et de loin !

A Vincent ROULEAU. C'est à toi que je dois mes premiers pas en anapath. C'est toi qui m'as communiqué la passion de l'anapath. A tes côtés j'ai vite compris que travailler avec sérieux et rigueur n'est pas synonyme de ennuyeux.

**Aux médecins du CH de Tarbes,**

Au Docteur Virgine SIANI WEMBOU,  
Docteur Anne-Marie BOUDAT,  
Docteur Héléna FLAMME.

**Au service d'anapath du CHU de Pointe à Pitre,**

Au Docteur Abdoulaye DIEDHIOU,  
Au Docteur Yohannes NEGUESSE.

## **A mes co-internes,**

A mes co-internes toulousains des premières heures :

Romain évidemment, premier co-interne, premier complice.

Mr Camille, maître rôtisseur, unicycliste de l'extrême. Avec Céline et maintenant Mr Victor, vous m'avez toujours accueilli et soutenu, merci les amis !

Benjamin « Rodger », jamais le dernier pour partager un bon verre, ou deux, ou plus. 6 mois de coloc ensemble ont laissé des séquelles, mais surtout des souvenirs inoubliables !

Cédric, toujours digne en toute circonstance, ou presque, mais toujours présent dans les bons coups.

Aux internes d'anapath,

A Youri. Tu m'as guidé dans mes premiers pas d'anapath. Je crois que tes éclats de rire résonnent encore dans les couloirs ! See you soon ! Next !

A Thibaud, Mr sarcome et œnologue émérite !

A Thibaut La Galiss, je sens qu'on va former une sacrée équipe d'assistants tous ensemble, j'ai hâte !

A Claire, Aurore, Gwendoline, Sarah, Julie, Laure, Anne Chatou, Quentin, Séb, Charlotte, Claire, Alix, Cécile, Romain, David et tous ceux avec qui j'ai eu la chance de travailler de près ou de loin.

A mes colocs de Tarbes,

Daudé, un film, une croquette et au lit ! Demain je te mets la branlée au squash !

Mag et Baptiste, force pure made in Momo, free ride, rougaille saucisses et rhum Charrette !

Mr Thomas Petit, le spectre à l'humour décapant, et DJ world class à tes heures perdues !

A tous les autres CHTarbais, bande de grands malades ! A Jean-Michel Jarre.

Aux internes de Guadeloupe, que j'ai plus croisés au pic de Petit Havre que dans les couloirs de l'hosto...

## **A mes amis,**

A Thomas, mon ami de toujours ! Toujours présent, jamais bien loin.

Aux colocs du 44:

Thibaut (Fislip), Antoine(Tony 50), Guillaume (El'motte). La grande époque !  
Tellement de souvenirs partagés ! Aujourd'hui on s'est dispersé aux 4 coins du monde, mais je sais que c'est toujours pour mieux se retrouver !

Aux normands :

JF, Hugues, Pierrot, Philou (5eme coloc !), Alex (SNSM forever), Blondin, Samu Silver, Tonton, Ronan, Adé et Xavier (La Suisse naturellement), Manu et Emilie, Nazih et Mathilde, Yves-Marie, Alexis, Olivier, Ophélie et Vincent, Manon, Harold, et tous les autres que je n'oublie pas !

Aux copains du vent :

Kévin et Jordan, le Bro'style, votre gentillesse à terre n'égale que votre talent sur l'eau...et au Vasco...

Benoit, toujours le smile, toujours la motiv, un vrai passionné ! J'associe Babette à la dédicace !

Guillaume et Prisca : vous êtes de bons vivants et c'est toujours un plaisir de passer du temps à vos côtés.

Brieuc, la voix du windsurf freestyle. Tellement de bons moments partagés. Merci de ta simplicité et de ton hospitalité.

Anaëlle, pour ta gentillesse et ton humour. A très vite !

Nico Kazakhstan, notre champion, on est tous fiers de toi ! Et à Eve bien sûr !

A, Pierrot Pikou, Hervé, Nico Barrack et Steph et à tous les autres passionnés de la glisse...

A très vite sur l'eau. Windsurf is not dead !

## Table des matières

<b>PREAMBULE</b> .....	<b>14</b>
<b>Partie I : Caractérisation générale</b> .....	<b>15</b>
<b>A. INTRODUCTION</b> .....	<b>16</b>
1. STRUCTURE ET FONCTION DES ANTICORPS .....	16
2. RAPPELS SUR LES ANTICORPS DIAGNOSTIQUES .....	18
3. RAPPELS SUR LES ANTICORPS THERAPEUTIQUES .....	19
<b>B. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>26</b>
1. PRODUCTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL .....	26
2. TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE UTILISEE .....	29
3. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE .....	31
4. CARACTERISATION PROTEOMIQUE.....	35
<b>C. RESULTATS</b> .....	<b>36</b>
1. CARACTERISATION IMMUNOHISTOCHIMIQUE.....	36
2. PROTEOMIQUE.....	54
<b>Partie II : TWNB et cancer du sein, étude immunohistochimique comparative. ....</b>	<b>56</b>
<b>A. INTRODUCTION</b> .....	<b>57</b>
1. CONTEXTE.....	57
2. GENERALITES SUR LE CANCER DU SEIN.....	57
<b>B. MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>68</b>
1. COHORTE « LAAS ».....	68
2. COHORTE DES « 277 ».....	68
3. TECHNIQUES ET ANALYSES IMMUNOHISTOCHIMIQUES .....	68
4. METHODOLOGIE STATISTIQUE.....	70
<b>C. RESULTATS</b> .....	<b>71</b>
1. DESCRIPTION DES COHORTES CLINIQUES.....	71
2. PROFIL D'EXPRESSION DE TWNB DANS LES COHORTES .....	73
3. TWNB ET LES CARACTERISTIQUES CLINICO – PATHOLOGIQUES.....	75
<b>DISCUSSION</b> .....	<b>85</b>
<b>A. CARACTERISATION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE TWNB</b> .....	<b>86</b>
<b>B. PROTEOMIQUE</b> .....	<b>89</b>
<b>C. COMPARAISON AUX MUCINES</b> .....	<b>90</b>
<b>D. PERSPECTIVES</b> .....	<b>95</b>
1. Aspect diagnostique.....	95
2. Aspect pronostique .....	95
3. Aspect thérapeutique.....	95
<b>E. ORGANISATION ET STANDARDISATION DE LA CARACTERISATION D'UN     ANTICORPS</b> .....	<b>97</b>
<b>CONCLUSION</b> .....	<b>101</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b> .....	<b>103</b>

## Table des Tableaux

Tableau 1: Anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés en France .....	21
Tableau 2: Réactivité de TWNB : Tissu normal humain.....	41
Tableau 3: réactivité de TWNB : Tumeurs épithéliales humaines. ....	48
Tableau 4: Réactivité de TWNB : Tumeurs germinales.....	49
Tableau 5: Réactivité de TWNB : Tumeurs mélanocytaires. ....	49
Tableau 6: Réactivité de TWNB : Lymphomes. ....	49
Tableau 7: Réactivité de TWNB : Tumeurs des tissus mous et tumeurs osseuses..	49
Tableau 8: Réactivité de TWNB : Tumeurs diverses.....	50
Tableau 9: Classification (p)TNM des tumeurs du sein.....	65
Tableau 10: Grade histopronostique .....	66
Tableau 11: Classification des types histologiques de cancer du sein .....	67
Tableau 12: Détails des protocoles immunohistochimiques .....	69
Tableau 13: Caractéristiques des cohortes de cancer du sein.....	72
Tableau 14: Corrélation TWNB / données clinico-pathologiques :cohorte « LAAS »	76
Tableau 15: Corrélation TWNB / données clinico-pathologiques :cohorte « 277».....	79
Tableau 16: Corrélation TWNB / Survie sans métastase, survie globale .....	82

## Table des figures

Figure 1: Structure d'une immunoglobuline.....	16
Figure 2: Fonctions effectrices d'une immunoglobuline .....	17
Figure 3: Différentes générations d'anticorps thérapeutiques.....	19
Figure 4: Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux.....	21
Figure 5: Structure des immunoconjugués cytotoxiques .....	23
Figure 6: Mécanisme d'action de l'immunoconjugué.....	24
Figure 7: Production des anticorps monoclonaux.....	26
Figure 8: Dénomination de l'anticorps monoclonal.....	28
Figure 9: Principe du système de révélation.....	29
Figure 10: Différentes intensités du marquage immunohistochimique TWNB.....	33
Figure 11 : Marquage TWNB d'un carcinome mammaire NST de grade III.....	33
Figure 12 : Localisation du marquage TWNB .....	36
Figure 13 : Marquage TWNB de tissus sains.....	41
Figure 14 : Marquage TWNB de tissus sains.....	42
Figure 15 : Marquage TWNB de tissus sains.....	43
Figure 16 : Marquage TWNB de tissus sains.....	44
Figure 17 : Marquage TWNB et pathologie mélanocytaire.....	50
Figure 18: Marquage TWNB et pathologie tumorale pulmonaire.....	50
Figure 19 : Marquage TWNB et pathologie tumorale digestive.....	51
Figure 20 : Marquage TWNB et pathologie tumorale urothéliale.....	51
Figure 21: Marquage TWNB et pathologie cervicale.....	52
Figure 22 : Marquage TWNB et pathologie rénale et surrénale.....	52
Figure 23: Structure normale du sein.....	58
Figure 24: Schématisation des étapes du processus métastatique.....	60
Figure 25 : Box Plot des scores IRS dans la série « LAAS ».....	72
Figure 26: Carcinome NST de la cohorte LAAS .....	82
Figure 27 : Carcinome mammaire NST de grade III. Morphologie et immunophénotype.....	83
Figure 28: Comparaison entre le marquage TWNB et celui des mucines.....	93
Figure 29: Exemple de tableau de bord.....	98

## PREAMBULE

Les cancers représentent la première cause de mortalité dans le monde. En 2008, le nombre de décès par cancer a été estimé à 7,8 millions soit 13% de la mortalité mondiale. Selon l'INVS, en France, on dénombre 365 500 nouveaux cas de cancers en 2011.

La production d'anticorps monoclonaux est une technique qui a plus de 30 ans et qui ne cesse d'être améliorée. Les premiers anticorps ont été produits à visée diagnostique, initialement appliqués à des techniques d'immunoblotting puis d'immunofluorescence et enfin d'immunohistochimie. On est progressivement passé d'anticorps polyclonaux peu spécifiques à des anticorps monoclonaux murins. En parallèle de leur utilisation diagnostique, les anticorps ont été utilisés pour des applications thérapeutiques (cancers ou maladies inflammatoires) après humanisation partielle ou totale. Les anticorps monoclonaux restent aujourd'hui les outils de diagnostic tissulaire les plus utilisés.

Les progrès réalisés dans la compréhension des mécanismes de cancérogénèse et la complexification des classifications des tumeurs qui en découle ont rendu incontournable l'utilisation de l'immunohistochimie.

Les anticorps monoclonaux diagnostiques sont également de potentielles armes thérapeutiques ciblées. Le couplage à un agent cytotoxique (ADC antibody drug conjugate) est un concept datant des années 1950 avec les premiers essais chez l'animal. Ils font partie de la classe prometteuse des immuno-conjugués avec les radio-immunoconjugués et les immuno-toxines. Ce concept combine donc à la fois la spécificité de l'anticorps et la cytotoxicité de la molécule conjuguée (1).

Le développement de nouveaux anticorps diagnostiques et potentiellement thérapeutiques est donc un enjeu majeur dans le domaine de la cancérologie.

Notre travail s'inscrit dans ce contexte et portera sur la caractérisation d'un nouvel anticorps monoclonal développé au sein de l'équipe de recherche du Pr Brousset au Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT) ; anticorps nommé TWNB.

La caractérisation de la réactivité immunohistochimique de TWNB sera plus particulièrement étudiée sur les cancers du sein en deuxième partie de ce travail.

# **Partie I : Caractérisation générale**

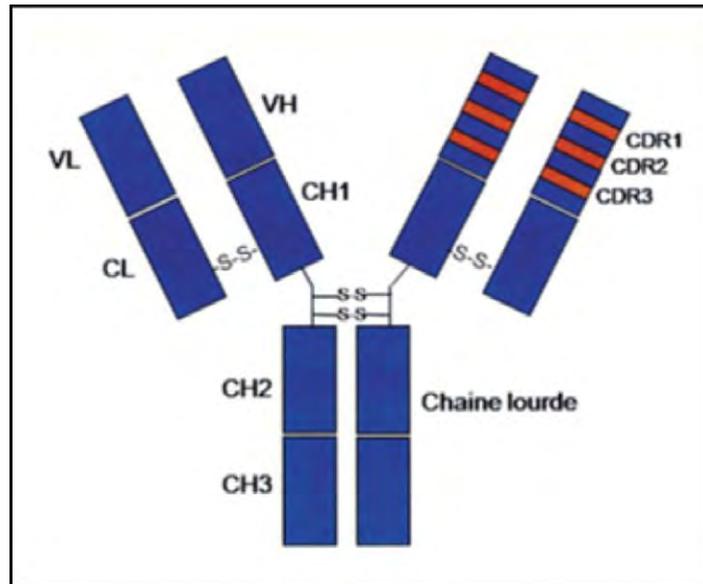
# A. INTRODUCTION

## 1. STRUCTURE ET FONCTION DES ANTICORPS

### a) *Structure protéique des anticorps*

Les anticorps, également appelés immunoglobulines (Ig), sont des molécules produites par les lymphocytes B. Chez l'homme, on observe cinq classes d'immunoglobulines, A, D, E, G et M, définies par le sous type de leur chaîne lourde  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  ou  $\mu$ . La structure de l'immunoglobuline de classe G (IgG), d'un poids moléculaire de 150 kilos daltons (kDa), est la plus communément décrite et sert de référence structurale (**Figure 1**). L'IgG est typiquement constituée de deux chaînes lourdes identiques (H) d'environ 50 (kDa) et de deux chaînes légères identiques (L) pouvant être de deux types : kappa ou lambda, d'environ 25 kDa. Chacune de ces chaînes est organisée en domaines d'une centaine d'acides aminés, deux pour les chaînes légères (VL et CL) et quatre pour les chaînes lourdes (VH, CH1, CH2, et CH3). Les domaines VL et VH sont des domaines variables qui fixent l'antigène. Chaque domaine variable possède trois boucles hypervariables appelées Complementary Determining Regions (CDR1, CDR2 et CDR3) qui se caractérisent par une extrême variabilité en acides aminés. Les 3 domaines hypervariables CDR alternent avec des domaines charpentes ou FR (Framework). Les 6 boucles hypervariables peuvent se rapprocher dans l'espace pour former une zone appelée paratope, responsable de l'affinité spécifique de l'anticorps pour un épitope (situé sur l'antigène). Les CDR constituent donc le site de spécificité antigénique (2).

Les domaines CL, CH1, CH2 et CH3 sont appelés domaines constants. Chaque domaine comporte un pont disulfure (intra-brin). La chaîne légère est liée à la chaîne lourde par un pont disulfure localisé aux extrémités C-terminales des domaines CL et CH1. Les chaînes lourdes sont liées entre elles par des ponts disulfures localisés au niveau de leur région charnière (H). Chez la plupart des mammifères le fragment CH2 est glycosylé. Les anticorps sont des glycoprotéines complexes qui appartiennent à la superfamille des immunoglobulines. Ils sont produits au sein du système immunitaire par les lymphocytes B et constituent une ligne de défense essentielle contre les divers agents pathogènes par le biais d'une reconnaissance spécifique antigène-anticorps (3).



**Figure 1: Structure d'une immunoglobuline (source : Dr Al Saati)**

*Régions variable V, constantes C des chaînes lourdes H ou légères L. ; SS- : ponts disulfures. CDR : régions de complémentarité à l'antigène.*

Les anticorps peuvent être caractérisés en différents fragments obtenus par coupure enzymatique à la papaïne. On obtient alors le fragment Fab (Fragment having the antigen binding site) et le fragment Fc (fragment cristallisable). Le fragment Fab est responsable de la liaison spécifique de forte affinité aux antigènes via le CDR. Le fragment Fc se lie à des récepteurs RFc impliqués dans les fonctions effectrices des anticorps monoclonaux ainsi qu'à des récepteurs RFc néonataux impliqués dans la demi-vie plasmatique des IgG (4).

### **b) Fonctions des IgG**

Les IgG sont produites après stimulation du système immunitaire par des éléments étrangers à l'organisme. Une des premières fonctions de l'IgG est de neutraliser cet élément étranger en se liant à l'antigène grâce à la partie Fab. Ce mécanisme participe au blocage de l'activité biologique de l'antigène et par la suite permet son élimination grâce aux effecteurs immunitaires. Les propriétés effectrices sont, elles, assurées par le fragment Fc et son récepteur RFc en activant des voies cytotoxiques dépendantes des cellules immunitaires (cellules NK, granulocytes) ou du complément (**Figure 2**). Ces phénomènes sont nommés ADCC (antibody dependent cell-mediated cytotoxicity) ou CDC (complement dependent cytotoxicity) (5).

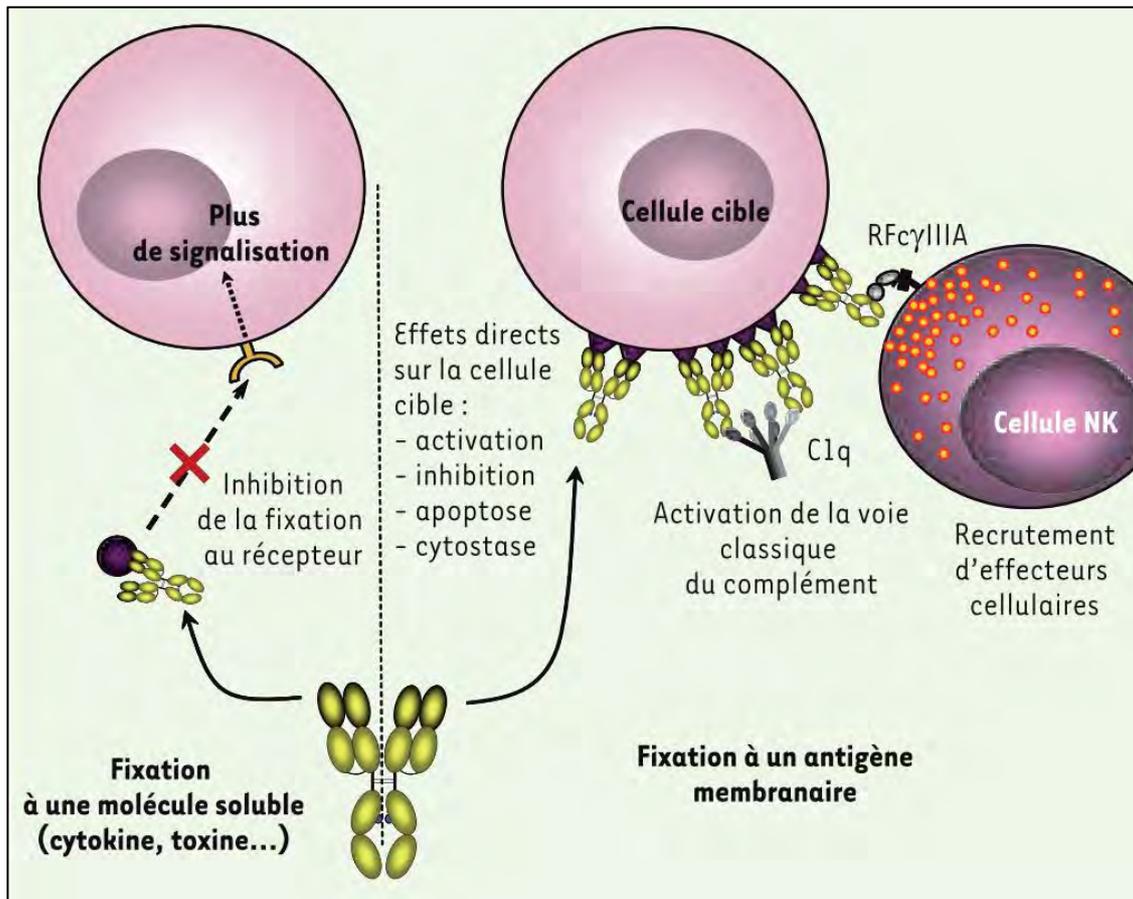


Figure 2: Fonctions effectrices d'une immunoglobuline (source : Abès R et al. 2009)(5)

## 2. RAPPELS SUR LES ANTICORPS DIAGNOSTIQUES

L'immunohistochimie est la combinaison de l'immunologie et de l'histochimie. Elle permet la localisation d'antigènes dans les cellules d'une coupe de tissu biologique. Ce principe exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à un antigène dans les tissus. Un couple anticorps-antigène peut être visualisé de plusieurs façons. Dans la plupart des cas, un anticorps est révélé par une enzyme (ex : peroxydase) qui catalyse une réaction chromogénique. Mais ils peuvent également être marqués par un fluorophore (immunofluorescence).

C'est grâce à la mise au point de la technologie des hybridomes en 1975 par Georges Köhler et César Milstein que les premiers anticorps monoclonaux ont été fabriqués (6). Cela leur vaudra un prix Nobel de médecine et de physiologie en 1984. Durant les années qui suivirent cette découverte, les anticorps monoclonaux sont devenus des outils révolutionnaires largement exploités en laboratoire, jusqu'à

devenir omniprésents dans le domaine de la recherche et du diagnostic médical. Ils ont de multiples intérêts :

Intérêt diagnostique : classification précise de nombreuses tumeurs par la mise en évidence d'antigènes de différenciation cellulaire ou la mise en évidence de certains agents infectieux (CK7, CK20, TTF1, MelanA, PNL2, CD45, GATA3, Chromogranin, etc.)

Intérêt pronostique : détection de protéines impliquées dans la prolifération cellulaire (Ki67), de protéines du système MMR (*MissMatch Repair*) dans les cancers colo-rectaux (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2), algorithme de Hans dans les lymphomes B diffus à grandes cellules (CD10, BCL6, MUM1)(7) , etc.

Intérêt thérapeutique : Mise en évidence de cibles thérapeutiques comme par exemple dans le cancer du sein: récepteurs nucléaires aux l'œstrogènes et à la progestérone, amplification HER2. On parle alors de marqueurs « théranostiques ».

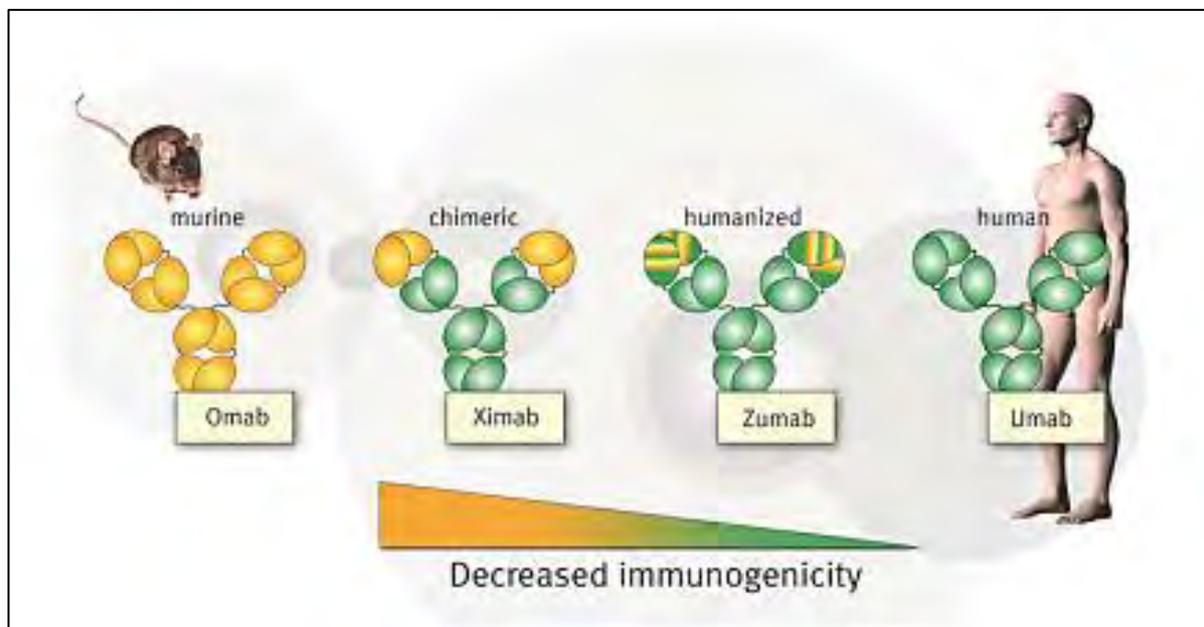
### **3. RAPPELS SUR LES ANTICORPS THERAPEUTIQUES**

#### **a) Historique**

Pierre Paul Emile Roux à l'Institut Pasteur démontre en 1894 les vertus de la sérothérapie chez l'homme dans le traitement de la diphtérie (8). Paul Ehrlich émet également dès 1900 l'idée d'utiliser la spécificité des anticorps pour neutraliser un agent pathogène (9). Cette idée sera concrétisée en 1975 grâce aux travaux de Köhler et Milstein avec la mise au point de la production d'anticorps monoclonaux murins par la technique dite des hybridomes (6). En 1982, Ronald Levy montre, à l'Université de Stanford en Californie, qu'il est possible de générer un anticorps monoclonal thérapeutique sur mesure pour chaque patient atteint d'un lymphome folliculaire en ciblant l'idiotype (B-cell receptor) exprimé par les cellules tumorales (10,11). C'est le début des thérapies ciblées et de la médecine personnalisée en oncologie. Ces anticorps thérapeutiques de première génération ont eu un développement limité en raison de leur immunogénicité élevée et de leur demi-vie trop courte (12). Des progrès considérables ont été apportés en biologie moléculaire pour concevoir d'autres générations d'anticorps moins immunogènes. C'est ainsi que des anticorps chimériques (domaines variables murins, domaines constants

humains), humanisés (CDR murins greffés sur les charpentes humaines) et humains (banques combinatoires de phages ou utilisation de souris transgéniques) ont été développés à partir du milieu des années 1980 (**Figure 3**).

En ciblant un antigène, le CD20, communément exprimé par tous les lymphomes folliculaires, le rituximab (anticorps anti-CD20) deviendra le premier anticorps monoclonal commercialisé. Depuis ce succès, d'autres anticorps monoclonaux ont été générés et commercialisés en oncologie, ciblant soit un antigène exprimé à la surface de la cellule tumorale soit un facteur de croissance impliqué dans la vascularisation tumorale (**Tableau 1**).



**Figure 3: Différentes générations d'anticorps thérapeutiques.**

*Humanisation progressive des anticorps monoclonaux. Les suffixes indiquent le type d'anticorps : -omab (murin), -ximab (humanisé), -zumab (humanisé), -umab (humain). (source : Joost Bakker, Genmab).*

**Tableau 1: Anticorps monoclonaux thérapeutiques commercialisés en France au 30 septembre 2011 (Source : Correspondances en onco-théranostique, vol. 1, mars 2013)**

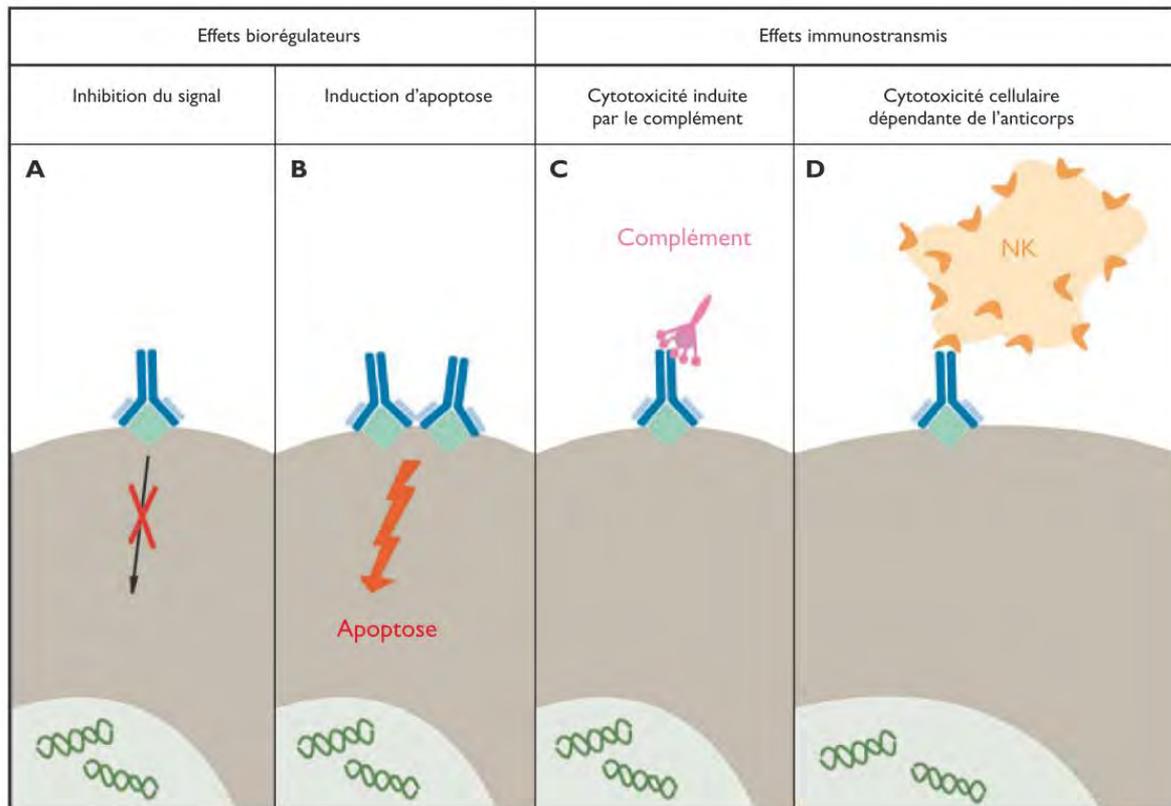
Nom	Molécule	Laboratoire	Date AMM	Cible	Pathologies
Arzerra*	Ofatumumab	GlaxoSmithKline	19/04/2010	CD20	Leucémie lymphoïde chronique
Avastin*	Bévacizumab	Roche	12/01/2005	VEGF	Cancer colorectal métastatique Cancer du sein métastatique Cancer bronchique non à petites cellules Cancer du rein avancé et/ou métastatique Cancers ovariens
Erbix*	Cétuximab	Mérick Serono	29/06/2004	EGFR	Cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR et présentant le gène KRAS non muté
Herceptin*	Trastuzumab	Roche	04/09/2000	HER2	Cancer du sein métastatique, avec surexpression tumorale de HER2
Mabcampath*	Alemtuzumab	Genzyme	10/07/2001	CD52	Leucémie lymphoïde chronique
Mabthera*	Rituximab	Roche	03/06/1998	CD20	Lymphomes non hodgkiniens Leucémie lymphoïde chronique
Mylotarg*	Gemtuzumab ozogamicine	Pfizer	ATU	CD33	Leucémie myéloïde chronique
Removab*	Catumaxomab	Fresenius Biotech	20/04/2009	EpCAM et CD3 (anticorps bispécifique)	Ascite maligne chez les patients atteints de carcinomes EpCAM-positifs
Vectibx*	Panitumumab	Amgen	03/12/2007	EGFR	Cancer colorectal métastatique exprimant l'EGFR et présentant le gène KRAS non muté
Yervoy*	Ipilimumab	BMS	13/07/2011	CTLA4	Mélanome avancé, non résecable ou métastatique
Zevalin*	Ibritumomab tiuxétan	Schering AG	21/01/2004	CD20	Lymphome non hodgkinien

### ***b) Les anticorps monoclonaux en thérapeutique***

Il s'agit d'une classe de bio-médicaments en pleine croissance utilisée aujourd'hui comme stratégie d'immunothérapie passive dans de nombreux cancers, en ciblant des antigènes exprimés par la tumeur (**Tableau 1**). Ces nouvelles cibles offrent de larges perspectives innovantes en termes de thérapeutiques combinatoires et de marqueurs prédictifs de réponse aux traitements.

Le mode d'action de ces différents anticorps est complexe (**Figure 4**). Ils peuvent avoir une cytotoxicité propre en induisant directement l'apoptose de la cellule tumorale après liaison avec leur cible, comme c'est le cas pour le rituximab dans les lymphomes. Ils peuvent aussi être antagonistes, en bloquant l'accès d'un facteur de croissance à son récepteur (par exemple, l'HER2 et le trastuzumab). De plus, il a été démontré plus récemment que ces anticorps pouvaient également être utilisés dans des stratégies d'immunothérapies actives en oncologie comme agents immunomodulateurs, en ciblant des molécules de co-stimulation ou de co-régulation exprimées à la surface des cellules immunitaires. Grâce à des domaines d'activation situés sur leur partie distale Fc, les anticorps peuvent également induire une destruction de la cellule tumorale cible indirectement par activation du complément (voie CDC *complement –Derived Cytotoxicity*) ou par activation des cellules de

l'immunité innée telles que les lymphocytes Natural Killer (NK), les onocytes/macrophages ou les neutrophiles (voie d'activation ADCC pour *Antibody Derived Cell cytotoxicity*).



**Figure 4: Mécanisme d'action des anticorps monoclonaux, par effet biorégulateur (A et B) ou immunotransmis (C et D). (source : Revue Médicale Suisse, mai 2013)**

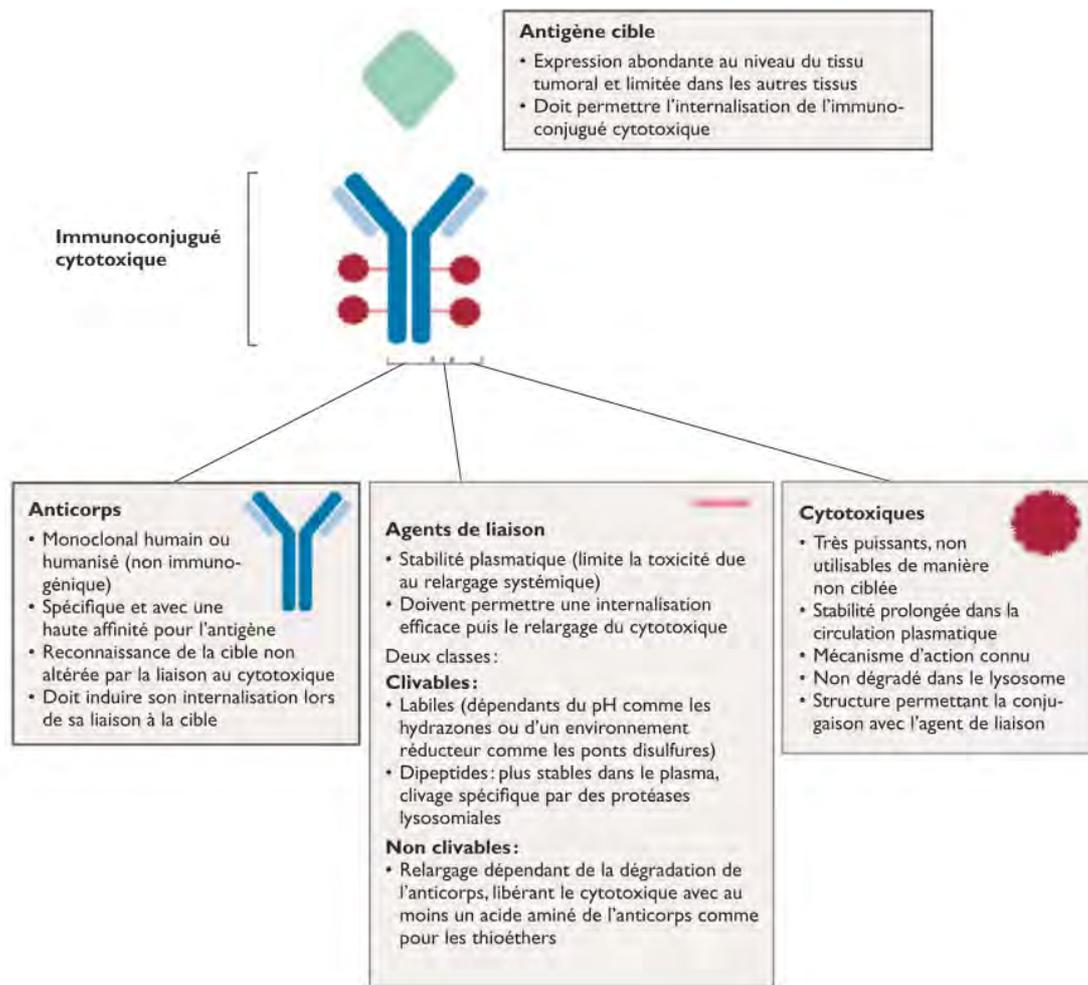
*Des effets biorégulateurs se font par blocage des récepteurs cibles (A) ou transduction directe de signaux intracellulaires (par exemple: signaux d'apoptose) (B). Des réactions immunostransmises s'effectuent par activation de la cascade du complément (C) ou le recrutement de cellules immunitaires (cellules NK, lymphocytes T  $\gamma/\delta$  ou macrophages impliqués dans la cytotoxicité cellulaire, dépendante de l'anticorps) (D). Ces différents mécanismes induisent la mort de la cellule tumorale.*

Les anticorps monoclonaux non modifiés utilisés en oncologie montrent une certaine efficacité mais sont administrés en complément le plus souvent d'une chimiothérapie (13). En effet, ils présentent une cytotoxicité et un taux de pénétration dans la tumeur relativement faible comparativement aux molécules chimiques cytotoxiques. Ces dernières, bien que très actives, sont non spécifiques et atteignent autant les cellules saines que tumorales, induisant de nombreux effets indésirables. Ces molécules ont donc une fenêtre thérapeutique assez étroite (caractérisée par un faible delta entre la dose minimale pour avoir un effet thérapeutique et la dose où apparaissent les effets toxiques). En ajoutant à cela l'émergence des résistances aux médicaments anticancéreux par certaines populations de cellules cancéreuses, on comprend le besoin de développer des thérapies plus sélectives et efficaces, avec une toxicité minimale (14). C'est ainsi que le développement des immunoconjugués a pris toute son importance ces dernières années.

### **c) Anticorps conjugués**

L'anticorps est utilisé comme un vecteur qui apporte le cytotoxique dans la cellule. Ses propriétés, telles que sa pharmacocinétique et sa distribution, doivent rester les mêmes. Il doit être suffisamment internalisé pour que l'agent toxique soit à une concentration intracellulaire suffisante. Pour cela, il doit reconnaître des antigènes qui sont de préférence surexprimés dans la cellule cancéreuse et sous exprimés dans les tissus sains (1).

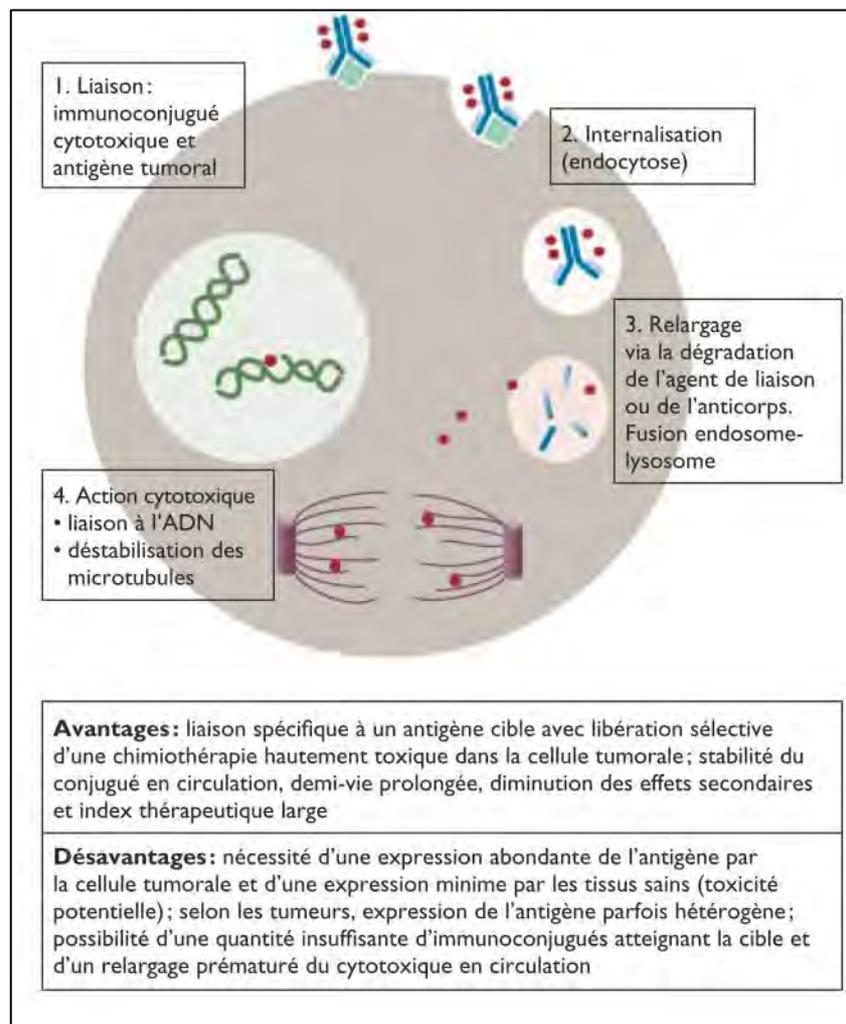
Un immunoconjugué consiste en un anticorps monoclonal couplé à un agent hautement toxique par le biais d'un agent de liaison appelé linker (**Figure 5**). Cette ingénierie permet donc de combiner la spécificité du ciblage par les anticorps avec de nouvelles fonctions effectrices puissantes par les agents qui leur sont conjugués. C'est ainsi que plusieurs classes d'agents ont été couplées aux anticorps notamment des radio-isotopes, des agents toxiques (drogues anticancéreuses ou toxines), des cytokines, des enzymes, mais également à des particules incluant des liposomes ou des nanoparticules métalliques.



**Figure 5: Structure des immunoconjugés cytotoxiques. (Source : Revue Médicale Suisse, mai 2013).**

*L'efficacité des immunoconjugés cytotoxiques repose sur l'optimisation de ses différents constituants et de leur combinaison.*

Le mécanisme d'action des ADC (*Antibody Drug Conjugates*) est décrit comme suit : après fixation sur son antigène cible, l'anticorps sera internalisé dans la cellule par endocytose médiée par des récepteurs. Les vésicules fusionneront avec des lysosomes où la molécule cytotoxique sera libérée de l'anticorps via différents mécanismes complexes. L'agent cytotoxique actif ira agir directement sur la cellule en induisant sa mort et parfois sur les cellules voisines par transport ou diffusion dans l'environnement (**Figure 6**).



**Figure 6: Mécanisme d'action de l'immunoconjugué. (Source : Revue Médicale Suisse, mai 2013)**

*Après fixation sur sa cible (1), l'IC est internalisé par endocytose (2). La dégradation de l'agent de liaison ou de l'anticorps dépend de la nature de l'agent de liaison (3). Une fois libéré dans la cellule, le cytotoxique exerce son activité sur le fuseau mitotique ou au niveau de l'ADN double brin (4).*

La conception d'un ADC fait donc appel à une ingénierie spécifique qui peut se résumer ainsi (15) :

- Disposer d'un agent capable de cibler la tumeur, rôle joué par l'anticorps (avec un maximum d'efficacité anticancéreuse et peu immunogène).
- Combiner un agent actif à visée anti-tumorale et donc utiliser des molécules hautement cytotoxiques.
- Etablir ce lien par un agent de liaison qui permettra de libérer le cytotoxique après internalisation de l'anticorps.

C'est pourquoi la recherche en cancérologie est en demande croissante de biomarqueurs tissulaires sensibles et spécifiques.

## B. MATERIEL ET METHODES

### 1. PRODUCTION D'UN ANTICORPS MONOCLONAL

#### a) Généralités

Grâce à la technologie des hybridomes développée par Georges Köhler et César Milstein, des lymphocytes B (le plus souvent issus de splénocytes) d'un animal immunisé sont fusionnés in vitro à des cellules de myélome murin à l'aide d'un agent de fusion membranaire (16). L'agent de fusion membranaire le plus utilisé est le polyéthylène glycol. Les cellules de myélome utilisées sont déficientes en hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transférase (HGPRT-). Cette enzyme participe à l'étape alterne de la néo-synthèse des nucléotides. En raison de cette défaillance, les cellules myélomateuses utilisent une voie de néo-synthèse alternative, blocable par certaines drogues dont la plus communément utilisée est l'aminoptérine. La fusion d'une cellule myélomateuse avec un splénocyte lui permettra d'acquérir une voie HGPRT fonctionnelle. Ainsi un milieu contenant l'aminoptérine sélectionnera les cellules myélomateuses qui auront effectivement acquis par fusion (complémentation) la voie HGPRT et qui sont donc capables d'activer la voie alterne de production des nucléotides (16). On appelle les cellules hybrides nées de la fusion d'une cellule myélomateuse et d'un splénocyte normal les hybridomes.

On peut immuniser l'animal à l'aide de cellules entières ou des protéines recombinantes, voire de peptides de synthèse. Pour ces derniers, l'immunisation des animaux nécessite l'utilisation d'un adjuvant tel que l'adjuvant dit de Freund qui permet une meilleure stimulation immunitaire.

Dans notre laboratoire, nous utilisons également une technique de production d'anticorps basée sur la xénogreffe de tumeurs humaines à des souris athymiques (nude) (17). Le principe consiste à injecter par voie sous-cutanée des cellules tumorales à un animal immuno-incompétent car athymique. Après croissance de la xénogreffe, on reconstitue l'immunité de l'animal par injection de thymocytes d'un animal du même fond génétique. En général on utilise des souris de type BALBc normal.

Les techniques de fusion qui s'ensuivent sont identiques quelque soit la méthode d'immunisation utilisée (**Figure 7**). Les hybridomes sont mis dans des puits et les surnageants sont criblés à la recherche d'anticorps dirigés contre la protéine

ou l'immunogène qui a servi à l'immunisation de l'animal. En cas de xéngreffe, on peut effectuer un criblage par la technique de cell-binding ELISA ou tout simplement par immunocyto/histochimie sur cellules ou coupes de tumeurs. Des coupes d'une amygdale humaine normale peuvent être utilisées en parallèle pour déterminer la spécificité des anticorps testés (17,18). Une fois les hybridomes d'intérêt sélectionnés, un clonage est effectué par dilution limite et leur stockage est organisé. Celui-ci est basé sur cryopréservation dans un cocktail contenant 20% de sérum foetal de veau et 10 % de diméthyl sulfoxyde sous forme d'aliquote contenant entre 1 et 10 millions de cellules stockées dans l'azote liquide.

La production d'anticorps en grande quantité est obtenue grâce à une mise en culture des hybridomes dans des incubateurs (cytocalteurs). Le prélèvement de surnageant permet, après purification, d'obtenir l'anticorps d'intérêt en quantité titrable.

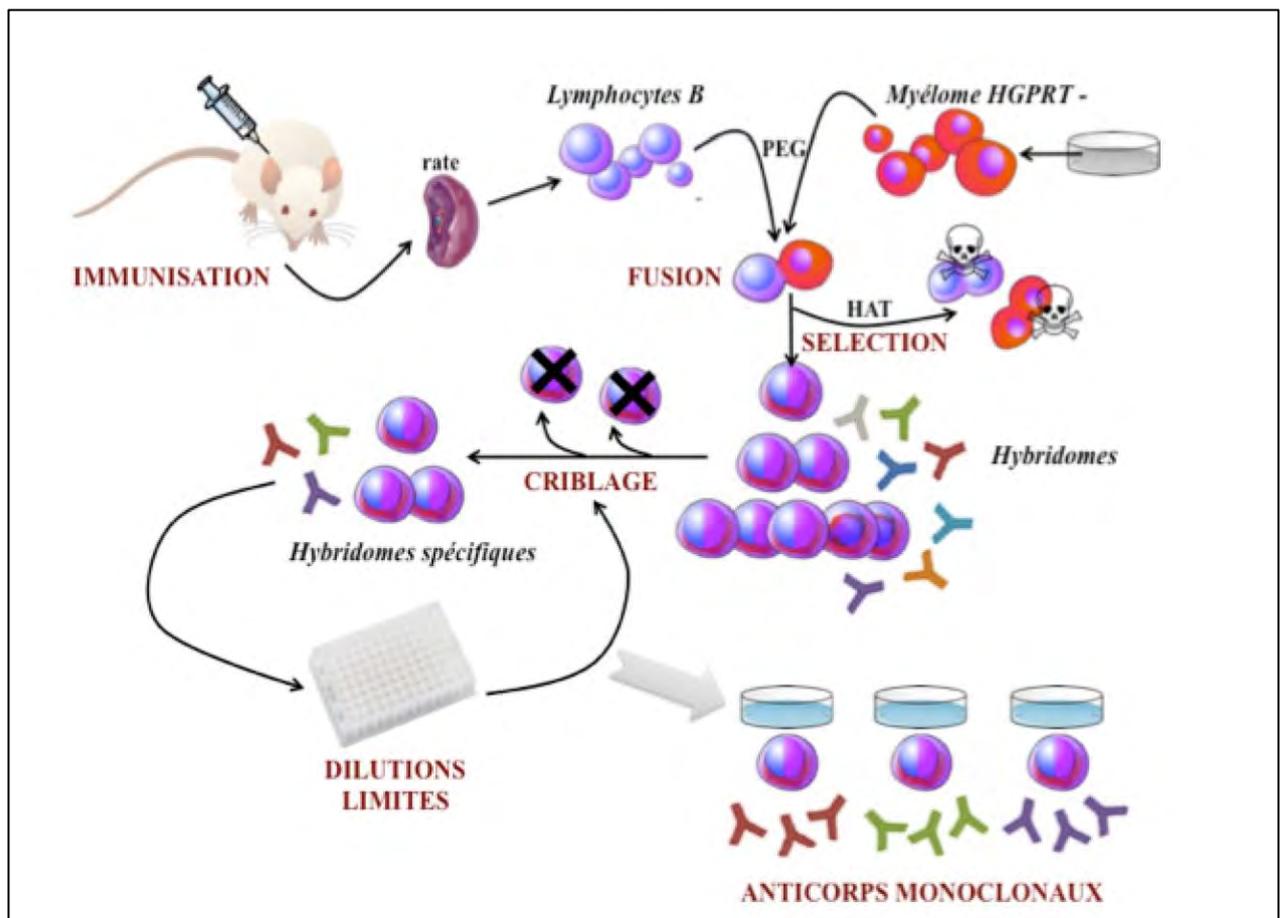


Figure 7: Production des anticorps monoclonaux (d'après Köhler et Milstein) (6)

## **b) Production de l'anticorps TWNB**

### (1) Immunisation des animaux

Des souris Balb/c âgées de 8 à 12 semaines ont reçu des injections de cellules tumorales de mélanome en culture, issues de la lignée TW12, sans adjuvant de Freund.

Il a été réalisé 4 injections à 15 jours d'intervalle. La rate de la souris a été prélevée 4 jours après la dernière injection.

### (2) Production de l'anticorps monoclonal

Une lignée myélomateuse murine déficiente en HGPRT (hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase) a été utilisée comme partenaire de fusion. Les fusions ont été réalisées au sein de l'équipe du Pr Pierre Brousset (UMR 1037, Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse) selon la technique standard (6).

### (3) Criblage des surnageants

Les surnageants ont été criblés par immunohistochimie sur tissus congelés. Ce criblage a été réalisé sur des coupes d'amygdale et de mélanome. En effet, l'amygdale est un tissu couramment employé pour le criblage en raison de la grande variété de type cellulaire qui s'y trouve représentée.

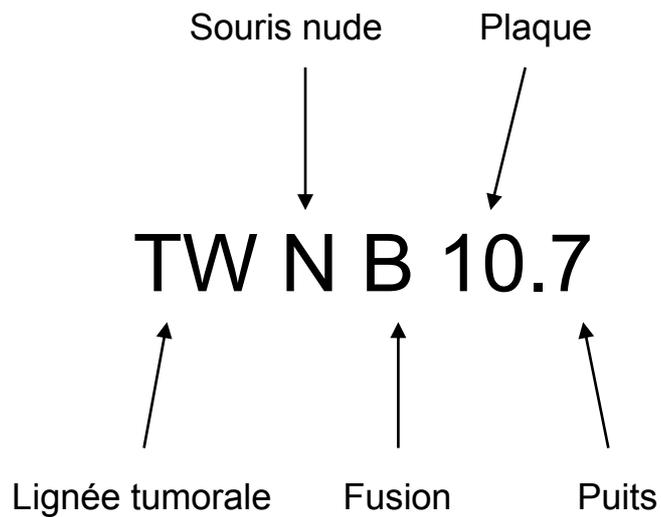
Les surnageants d'intérêt ont été également testés sur tissus fixés au formol et inclus en paraffine.

### (4) Conservation des hybridomes d'intérêt

Les hybridomes sécrétant des anticorps de spécificité intéressante ont été transférés dans des flacons de culture. Par la suite, les surnageants ont été à nouveau testés et les hybrides clonés par dilution limite (< 0.1 cellule par puits), en utilisant des thymocytes de souris swiss normales (500000/puits) comme couche nourricière. Les clones d'intérêt ont été congelés et conservés dans l'azote liquide à -196°C.

Ce travail porte sur le clone issu de la plaque 10 et du puits 7 de clonage. Ce clone correspond à la fusion B sur la souris N (nude).

La désignation du clone sélectionné est donc **TWNB 10.7**.



**Figure 8: Dénomination de l'anticorps monoclonal**

## 2. TECHNIQUE IMMUNOHISTOCHIMIQUE UTILISEE

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés de manière semi automatisée, sur les automates Dako® autostainer et /ou Ventana® Xpress. Les résultats obtenus avec ces deux types d'automate sont identiques.

Le déparaffinage, la réhydratation et le démasquage des coupes d'immunohistochimie ont été réalisés par le module de prétraitement PT Link Dako®. Le cycle de chauffage du PT Link consiste en une montée en température de la température ambiante jusqu'à 65°C puis jusqu'à 97°C (compter 15 min de 65°C à 97°C). La température de 97°C est maintenue pendant 20 minutes (un décompte apparaît à l'écran). Le PT Link refroidit ensuite jusqu'à 65°C (baisse d'environ 1°C par minute). Le système Autostainer Plus Link de Dako® est un système automatisé de traitement des lames. Il reproduit les méthodes de coloration manuelle utilisées habituellement en immunohistochimie.

L'anticorps primaire TWNB 10.7 a été dilué au 1/10. Le temps d'incubation est fixé à 30 min.

La fixation des anticorps primaires est visualisée à l'aide de EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen (DAKO) (**Figure 9**). Une amplification du signal des anticorps primaires de souris ou de lapin est obtenue par des polymères conjugués à une enzyme (peroxydase) et sur lesquels se trouvent fixés les anticorps secondaires reconnaissant les anticorps primaires de lapin et de souris. L'activité peroxydasique

est révélée en présence d'eau oxygénée et de DAB (3,3'-diaminobenzidine). La contre-coloration utilisée est l'Hématoxyline de Mayer.

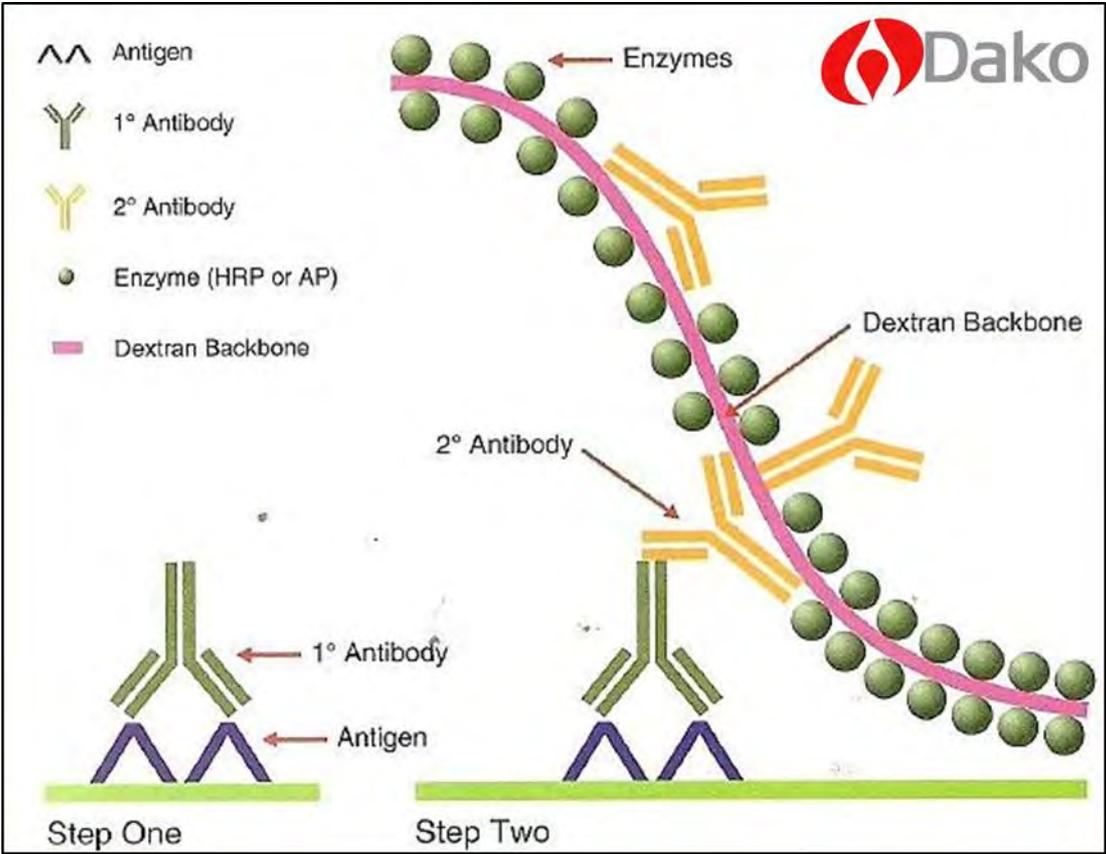


Figure 9: Principe du système de révélation EnVision DAKO®.

### 3. ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

#### a) *Etude de la localisation du signal*

Nous avons réalisé des marquages TWNB sur des cellules de la lignée TW12 afin de préciser la localisation intra ou extra membranaire de l'antigène reconnu par TWNB. Nous avons utilisé pour cela des cellules de la lignée TW12 vivantes cultivées directement sur lame de verre. Les cellules TW12 étant adhérentes, nous avons obtenu des lames recouvertes de cellules vivantes faciles à utiliser pour nos expérimentations.

Nous avons réalisé deux conditions de marquage :

- Sur cellules intactes : l'anticorps dilué dans du RPMI (CD20) ou le surnageant (TWNB et PNL2) est incubé 15 minutes sur les lames à température ambiante puis abondamment rincé au RPMI. Les lames sont alors fixées 10 minutes en formol tamponné. La fixation de l'anticorps est révélée en technique d'immunomarquage standard sur automate DAKO en remplaçant l'anticorps primaire par du tampon.

- Sur cellules perméabilisées : La technique est similaire à celle décrite ci-dessus si ce n'est une étape de perméabilisation des cellules par acétone froid réalisée avant l'étape d'incubation avec l'anticorps (acétone à 4°C 5 minutes puis rinçages en RPMI 3x5').

Nous avons utilisé trois anticorps lors de cette expérience :

1- PNL2 qui reconnaît un antigène intracellulaire présent dans les cellules TW12. Il nous sert de témoin négatif sur cellules intactes et de témoin positif en condition de perméabilisation membranaire

2- CD20 qui reconnaît un antigène extra membranaire absent des cellules TW12. Il nous sert de témoin négatif.

3- TWNB objet de ce test

## ***b) Sélection des tissus***

La réactivité tissulaire de l'anticorps TWNB a été ensuite testée sur coupes en paraffine concernant une large variété de tissus murins et humains :

- Tissus normaux d'origine murine
- Tissus normaux d'origine humaine
- Tissus tumoraux divers d'origine humaine

Les tissus humains sains et tumoraux divers proviennent majoritairement de prélèvements réalisés sur pièces opératoires, dans le cadre des collections déclarées par l'Institut Claudius Regaud. Dans un souci d'exhaustivité, les tissus plus rarement rencontrés en routine ont été recueillis à partir des archives du laboratoire (Anatomie et Cytologie Pathologiques, IUCT-Oncopole Toulouse). Il s'agit de tissus fixés au formol 4% et inclus en paraffine.

Les tissus humains normaux collectés ont été testés sur lame entière initialement, puis regroupés sur 8 blocs multi-tissulaires réalisés pour ce travail. Les tissus y sont regroupés par système tissulaire, en spots de 3 mm de diamètre. Cette étape supplémentaire a été réalisée dans une logique organisationnelle. L'objectif étant l'organisation et la structuration de la caractérisation d'anticorps au sein du laboratoire (cf Discussion).

Les tissus murins ont été prélevés sur des souris sacrifiées selon les recommandations éthiques en vigueur. Il ne s'agit pas de souris immunisées avec la lignée TW12. Il a également été réalisé deux blocs multi-tissulaires afin de faciliter l'organisation et la structuration de la caractérisation d'anticorps au sein du laboratoire.

Afin d'appréhender la réactivité globale de l'anticorps au sein des pathologies tumorales humaines, et notamment d'estimer l'hétérogénéité intra-tumorale du marquage, une large variété de tumeurs humaines a été testée dans un premier temps sur des lames entières.

Dans un second temps, l'étude immunohistochimique a été réalisée sur des blocs de TMA (Tissue Micro Array) préexistants au sein du laboratoire. Ces collections concernaient les pathologies tumorales mammaires, hématologiques,

ostéogéniques, sarcomateuses, broncho-pulmonaires et colorectales. L'utilisation de ces blocs TMA a été rendue possible par l'accord du ou des pathologistes responsables de ces collections (respectivement : Dr Lacroix-Triki, Pr Lamant, Pr Brousset, Dr Laurent, Dr Capilla, Pr Gomez-Brouchet, Dr Leguellec et Pr Valmary).

### c) *Méthode d'analyse du signal immunohistochimique*

La localisation cellulaire du signal a été évaluée (nucléaire et/ou membranaire et/ou cytoplasmique). Le score d'immunomarquage IRS (ImmunoReactive Score) a été employé. Il combine le pourcentage de cellules tumorales marquées et l'intensité du marquage (19,20). L'intensité du marquage a été évaluée en 0=négatif, 1=marquage faible, 2=marquage modéré ou 3=marquage fort (**Figure 10**). Le pourcentage de cellules tumorales marquées est classé en 5 catégories : 0=0%, 1=1 à 10%, 2=11 à 50%, 3=51 à 80%, 4=81 à 100%. Le score IRS (0-12) est obtenu en multipliant le score intensité (0-3) avec le score pourcentage (0-4).

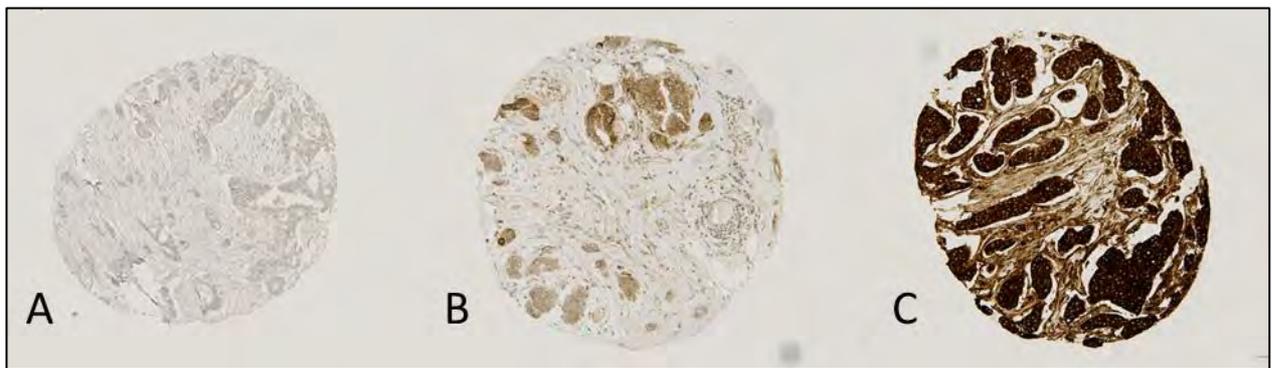
Un marquage intense de 100% des cellules correspond ainsi à un score 12 (**figure 11**). Un marquage faible de quelques cellules correspond à un score 1.

#### IRS (immunoreactive score) (Friedrichs et al 1993, Chui et al 1996)

Fraction cellules marquées		Intensité du marquage	
<b>0</b>	<1%	<b>0</b>	0
<b>1</b>	1% à 10%	<b>1</b>	+
<b>2</b>	11% à 50%	<b>2</b>	++
<b>3</b>	51% à 80%	<b>3</b>	+++
<b>4</b>	>80%		

**Score= score % x score intensité= de 0 à 12.**

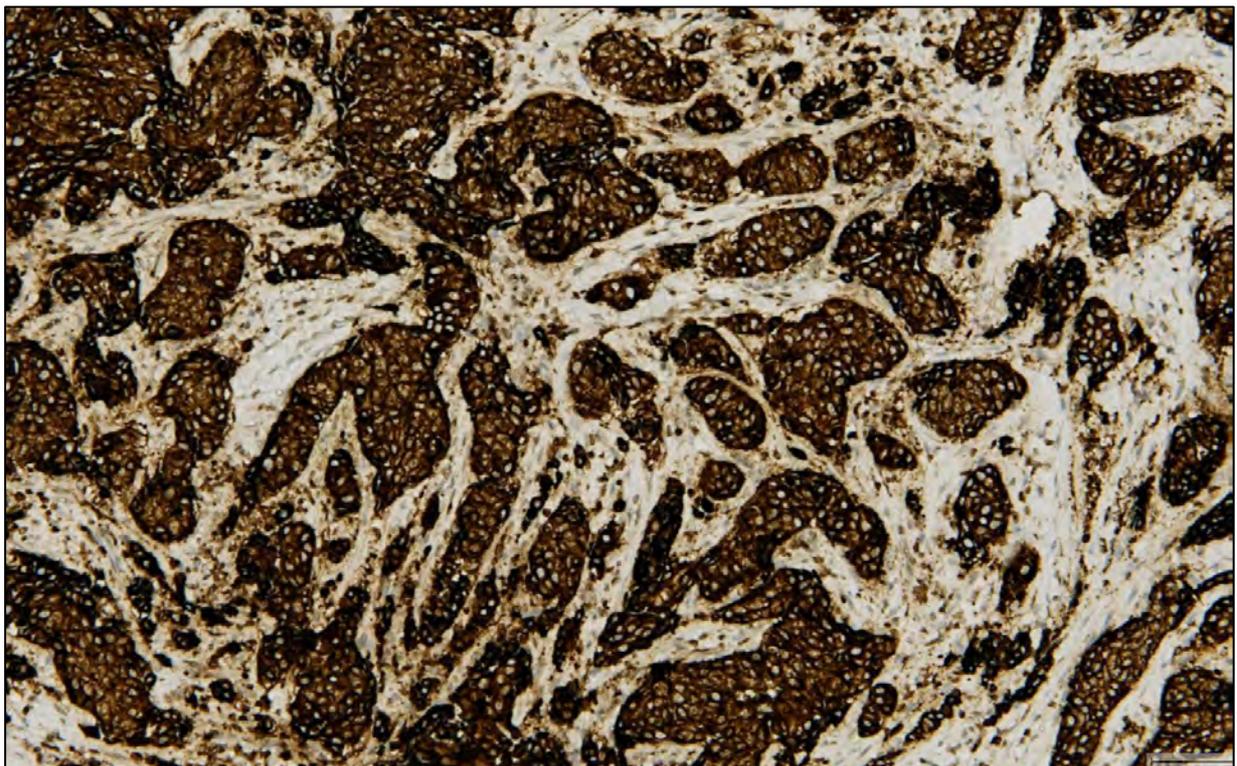
IRS	conclusion
0-3	négatif
4-6	1+
7-9	2+
10-12	3+



**Figure 10: Différentes intensités du marquage immunohistochimique TWNB.**

*Marquage immunohistochimique réalisé sur des carcinomes canaux (NST) mammaires issus de la cohorte LAAS.*

*A : intensité 1+ ; B : intensité 2+ ; C : intensité 3+.*



**Figure 11 : Marquage TWNB d'un carcinome mammaire NST de grade III.**

*Marquage intense de 100% des cellules tumorales, membranaire et cytoplasmique.*

#### **4. CARACTERISATION PROTEOMIQUE**

Les analyses de protéomique ont été réalisées par le Dr Etienne Coyaud (Department of Medical Biophysics, University of Toronto).

Les analyses ont été réalisées par Western blot, immuno-précipitation et spectrométrie de masse en conditions dénaturantes et non dénaturantes. Il a été comparé les interactions de TWNB dans la lignée TW12 aux interactions de TWNB dans la lignée PASC (lignée non réactive), le tout en parallèle et dans des conditions analogues.

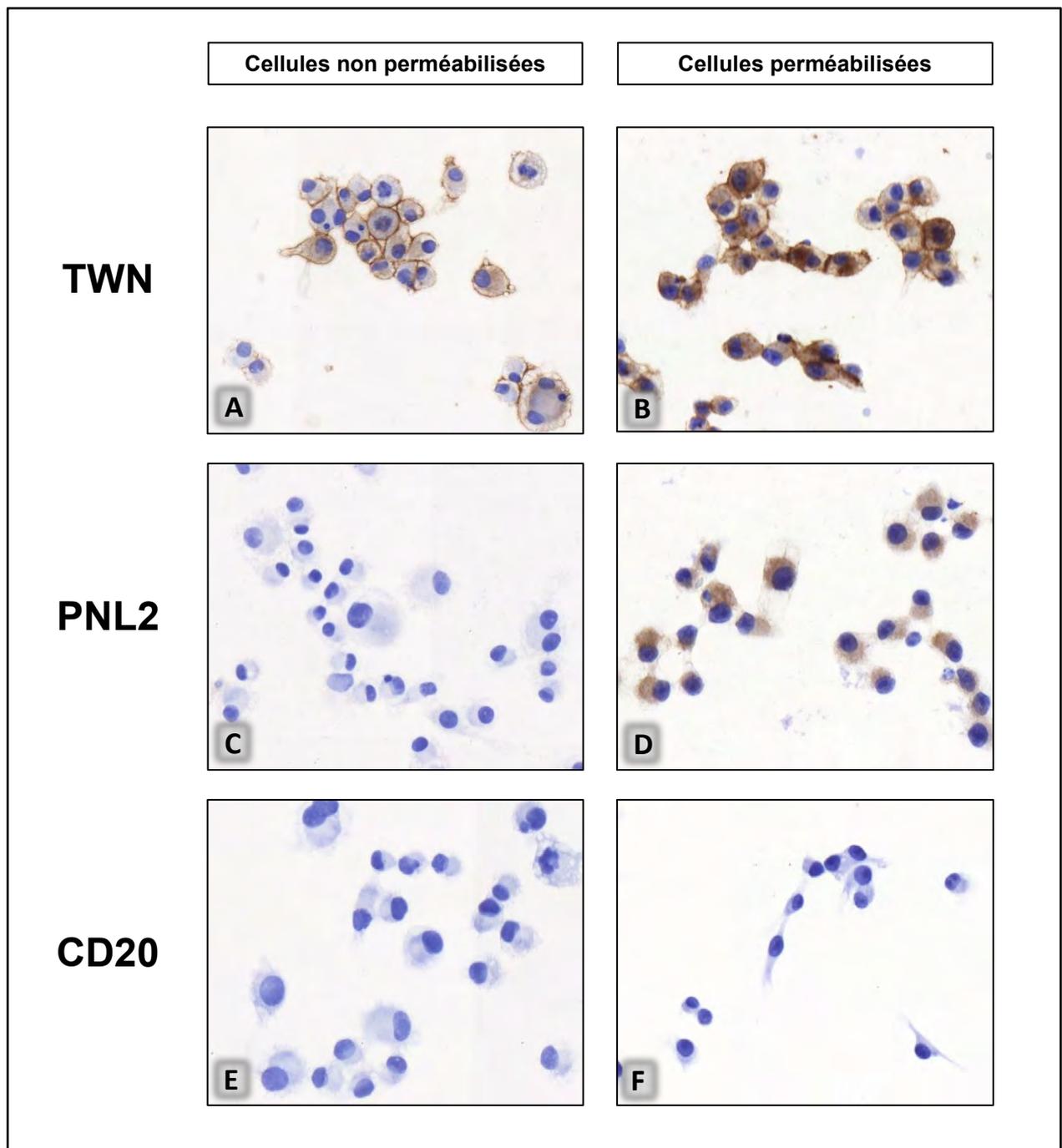
## C. RESULTATS

### 1. CARACTERISATION IMMUNOHISTOCHIMIQUE

#### a) *Localisation cellulaire du marquage TWNB*

L'immunomarquage de TWNB a été observé au niveau membranaire des cellules TW12 sur cellules intactes. Après perméabilisation membranaire, le signal persiste en situation membranaire et devient également cytoplasmique. Les contrôles expérimentaux PNL2 (antigène mélanocytaire cytoplasmique) et CD20 (antigène lymphocytaire B) sont satisfaisants. L'antigène reconnu par TWNB est donc localisé sur le versant extra-cellulaire de la membrane cytoplasmique (**Figure 12**).

La localisation du signal observé sur coupe de tissus fixés et inclus en paraffine (cellules perméabilisées) sera ensuite précisée dans chacun des sous chapitres suivants.



**Figure 12 : Localisation du marquage TWNB sur les cellules mélanocytaires malignes TW12**

*A :* L'anticorps TWNB se fixe au niveau de la membrane cytoplasmique des cellules non perméabilisées. Ce marquage persiste en condition perméabilisée.

*C et D :* L'anticorps PNL2 reconnaît un antigène cytoplasmique. L'antigène n'est accessible qu'après perméabilisation membranaire. Il est utilisé dans cette expérience comme contrôle positif.

*E et F :* Le CD20 est un antigène lymphocytaire B. Il est utilisé ici comme contrôle négatif.

## **b) Réactivité tissulaire**

### **(1) Tissus normaux murins**

Les immunomarquages obtenus avec TWNB sur les tissus normaux d'origine murine montrent, en dehors d'un marquage d'éléments inflammatoires peu spécifique, une négativité de l'ensemble des structures histologiques analysées.

Ces observations sont précisées ci-après :

#### *(a) Système digestif*

Aucun marquage significatif n'a été observé au niveau des tissus coliques, grêles, gastriques ou pancréatiques (pancréas exocrine et endocrine).

#### *(b) Foie*

Aucun marquage significatif n'a été observé au niveau des structures histologiques hépatiques.

#### *(c) Rein*

Aucun marquage significatif n'a été observé avec notamment une absence de marquage de la vascularisation capillaire rénale.

#### *(d) Cœur*

Aucun marquage significatif n'a été observé.

#### *(e) Poumon*

Aucun marquage significatif n'a été observé.

#### *(f) Cerveau et organes des sens*

Aucun marquage significatif n'a été observé au niveau des tissus nerveux centraux ou des structures histologiques oculaires.

#### *(g) Peau*

Aucun marquage significatif n'a été observé au niveau épidermique ou des annexes cutanées pilo-sébacées.

#### *(h) Muscle*

Aucun marquage significatif n'a été observé.

## (2) Tissus normaux humains

Les différentes observations sont résumées dans le **Tableau 2** et détaillées ci-après :

### (a) *Système nerveux et organes des sens*

Aucun marquage significatif des tissus du système nerveux n'a été observé. Au niveau de l'œil, seul la cornée présente un marquage membranaire des couches superficielles de la cornée. La rétine est négative.

### (b) *Système cardio vasculaire*

Aucun marquage significatif n'a été observé.

### (c) *Appareil respiratoire*

On observe un marquage luminal des glandes bronchiques. On note également la présence d'un marquage cytoplasmique des pneumocytes type 2 et un discret marquage luminal au niveau des surfaces alvéolaires. Il reste difficile de préciser s'il s'agit d'un marquage de pneumocytes de type 1 ou du surfactant (**Figure 13**).

### (d) *Système digestif*

On observe un marquage luminal des muqueuses gastrique, duodénale, grêle, colique, rectale et biliaire extra-hépatique. Au niveau hépatique, on note un marquage des canalicules biliaires absent des voies biliaires intra-hépatiques.

Au niveau des différentes glandes salivaires, il existe un net marquage ductulaire non associé à un marquage des voies excrétrices de plus gros calibre.

Absence de marquage significatif du pancréas exocrine (**Figure 14**).

### (e) *Système endocrine*

La glande surrénale présente un marquage linéaire exclusivement limité à la micro circulation capillaire (**Figure 15**).

Les glandes thyroïde, parathyroïde et les îlots de Langerhans (pancréas endocrine) ne présentent pas de marquage significatif.

### (f) *Tissu hématopoïétique*

Au niveau des ganglions lymphatiques réactionnels, on observe un marquage en réseau sinusal (**Figure 16**). Les macrophages et les polynucléaires présentent un marquage cytoplasmique granuleux, ils sont observés au niveau amygdalien, ganglionnaire réactionnel, intravasculaire et au niveau interstitiel des tissus inflammatoires.

La moelle osseuse présente un marquage cytoplasmique de nombreux éléments mononucléés dont la nature est difficile à caractériser sans double marquage. Cependant, ils semblent appartenir à la lignée granuleuse immature ou monocytaire. La lignée mégacaryocytaire n'est pas marquée (**Figure 16**).

La rate et le thymus ne présentent pas de marquage significatif.

(g) *Appareil urinaire*

Le rein présente un marquage significatif exclusivement limité à la microcirculation capillaire glomérulaire et péri-tubulaire. L'urothélium urétéral et vésical n'est pas marqué (**Figure 15**).

(h) *Appareil génital masculin*

Absence de marquage significatif des appareils génitaux masculins en dehors d'un marquage luminal non spécifique des glandes prostatiques.

(i) *Appareil génital féminin*

Présence d'un marquage luminal des glandes mammaires et endométriales. Absence de marquage ovarien (**Figure 13**).

(j) *Produits de conception*

Présence d'un marquage membranaire luminal au niveau des éléments cytotrophoblastiques des villosités immatures et de la caduque.

(k) *Tissu mésenchymateux*

Absence de marquage significatif.

(l) *Téguments*

Au niveau de la peau, seules les glandes sébacées présentent un marquage membranaire (**Figure 15**).

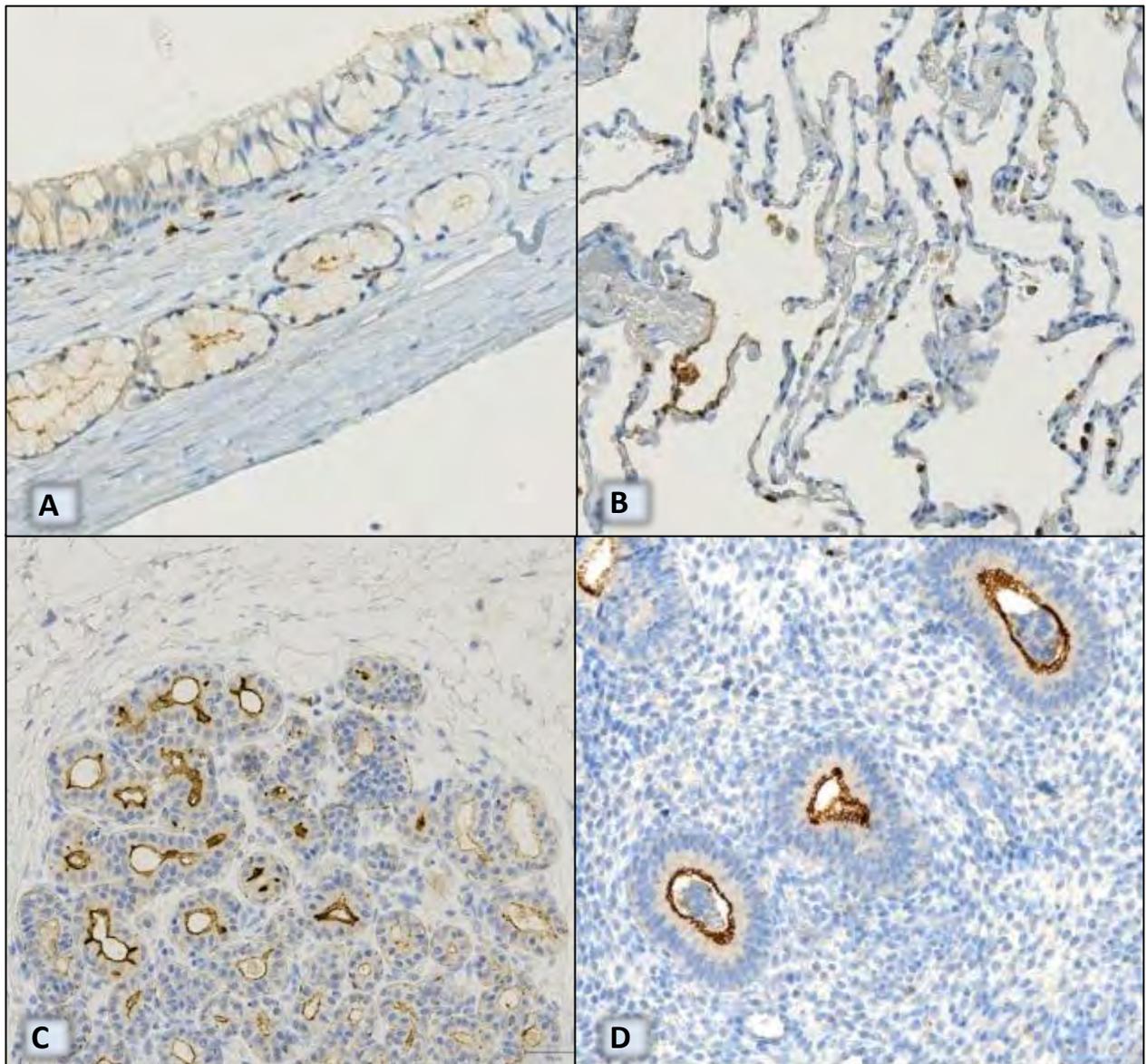
(m) *Appareil locomoteur*

Absence de marquage significatif au niveau osseux, cartilagineux et synovial.

**Tableau 2: Réactivité de TWNB dans le tissu normal humain (Immunohistochimie sur coupe en paraffine)**

Tissu normal		TWNB*	Description du marquage
Amygdale Platine	+	(M)	couches superficielles de l'épithélium malpighien
Larynx	+	(M)	couches superficielles de l'épithélium malpighien
Glande salivaire	+	(L)	ductules glandulaires
Œsophage	+	(M)	couches superficielles de l'épithélium malpighien
Estomac antre	+	(L)	
Estomac fundus	+	(L)	
Duodénum	+	(L)	
Colon	+	(L)	
Rectum	+	(L)	
Anus	+	(M, L)	couches superficielles de l'épithélium malpighien
Surrénale	+	(L)	microcirculation
Vésicule biliaire	+	(L)	
Foie	+	(L)	canalicules biliaires
Sein	+	(L)	canalaire et UDLT
Endomètre	+	(L)	
Prostate	+	(L)	
Annexe Sudoripare - sébacée - Pilaire	+	(M)	glandes sébacées
Cordon Ombilical	+	(M)	amnios
Membranes	+	(L)	Caduque
Villosités Choriales	+	(C)	cytotrophoblaste immature et capillaires
Bronche	+	(L)	
Poumon	+	(C)	pneumocytes et/ou surfactant
Moelle Osseuse	+	(C)	éléments mononucléés
Rein	+	(L)	microcirculation péri-tubulaire et glomérulaire
Ganglion Lymphatique (GG°)	+	(L)	réseau sinusal
Appendice	+	(L)	
Cornée	+	(M)	couches superficielles de l'épithélium
Rate	-		
Fosses nasales	-		
Sinus de la face	-		
Myocarde	-		
Péricarde	-		
Péritoine	-		
Exocol	-		
Endocol	-		
Trompe	-		
Myomètre	-		
Ovaire	-		
Cartilage	-		
Muscle Strié	-		
Os	-		
Muscle Lisse	-		
Hémisphère cérébral	-		
Cervelet	-		
Méninge	-		
Nerf périphérique	-		
Plèvre	-		
thymus	-		
Peau	-		
Tissu Adipeux	-		
Vessie - ouraque	-		
Artère	-		
Veine	-		
Lymphatique	-		
pancréas endocrine	-		
Pancréas exocrine	-		
Parathyroïde	-		
Thyroïde	-		
Œil rétine	-		
Testicule	-		
Vésicule Séminal	-		

\*Le marquage des polynucléaires n'est pas pris en compte  
M : membranaire ; L : luminal ; C : cytoplasmique.



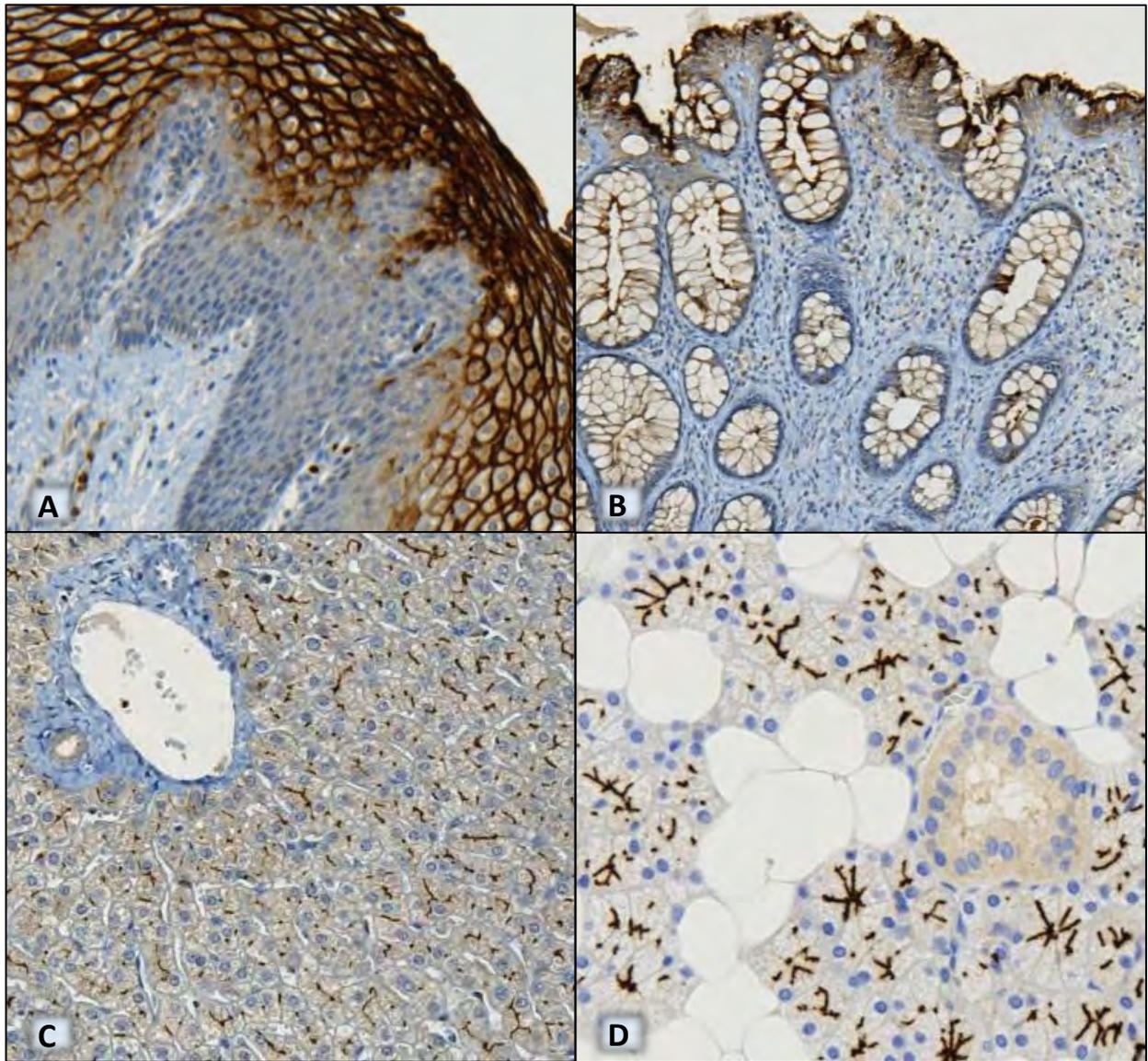
**Figure 13**

**A** : Muqueuse bronchique : marquage luminal des glandes bronchiques

**B** : Poumon : marquage de pneumocytes de type 2 et focalement marquage luminal de la surface alvéolaire

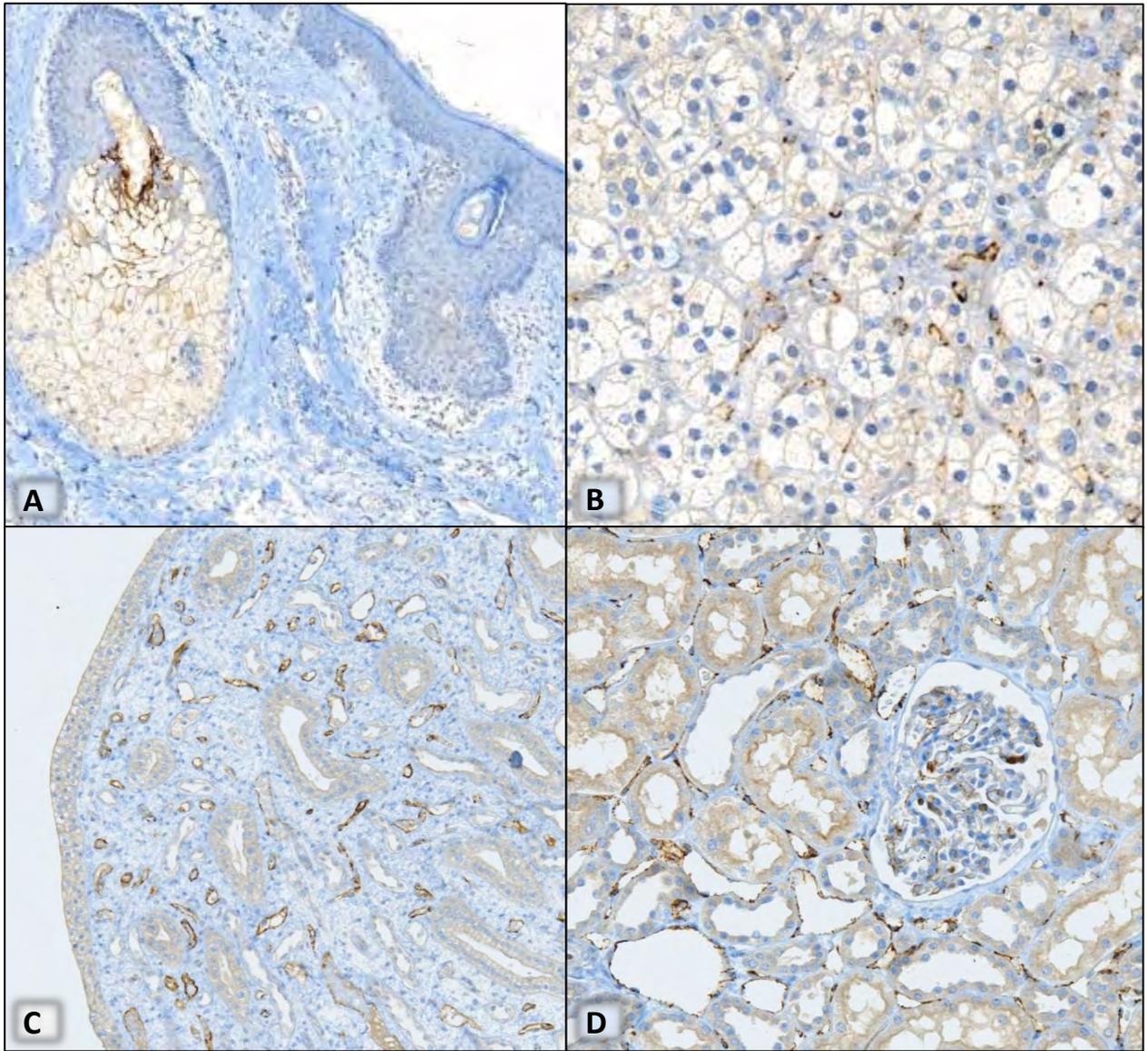
**C** : Glande mammaire : marquage luminal des unités ductulo-lobulaires terminales

**D** : Canal galactophorique mammaire : marquage luminal et des sécrétions.



**Figure 14**

- A** : Œsophage : marquage membranaire des couches superficielles de l'épithélium malpighien.
- B** : Rectum : marquage du pole luminal et des sécrétions
- C** : Foie : Marquage luminal des canalicules biliaires
- D** : Glande salivaire : marquage luminal des ductules

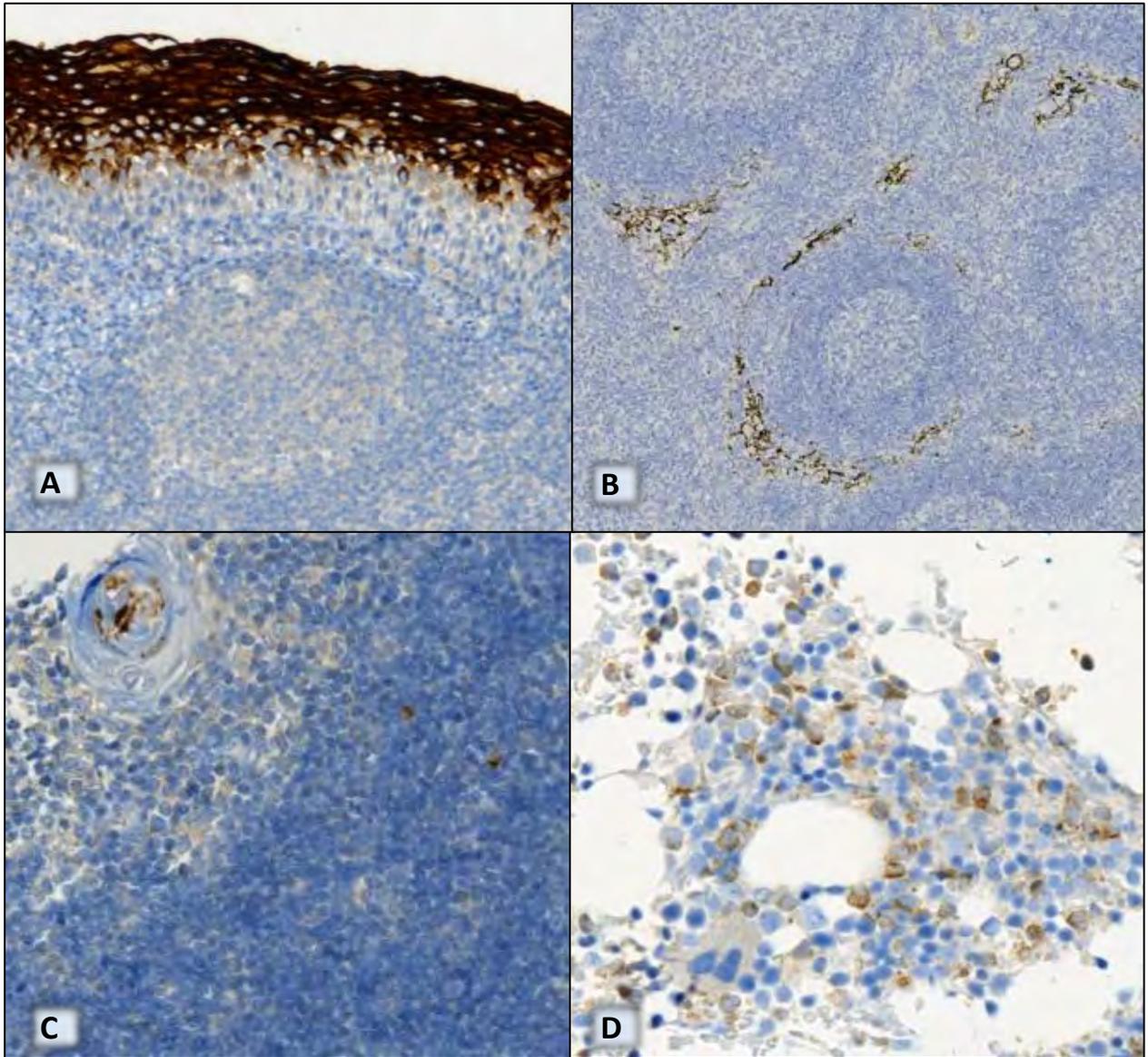


**Figure 15**

**A** : Peau : marquage membranaire des glandes sébacées

**B** : Surrénales : marquage des capillaires sanguins

**C,D** : Rein : Marquage des capillaires sanguins péri-tubulaire et glomérulaires



**Figure 16**

**A** : Amygdale : marquage des couches superficielle de l'épithélium malpighien

**B** : Ganglion lymphatique : marquage en réseau des sinus lymphatique

**C** : Thymus : Marquage peu spécifique des corpuscules de Hassal

**D** : Moelle osseuse : marquage membranaire d'éléments hématopoïétiques semblant appartenir à la lignée granuleuse ou monocyttaire.

### (3) Tissus tumoraux humains

Les résultats obtenus sont résumés dans les **tableaux 3 à 8**.

Les 530 cas testés se distribuaient en 43 tumeurs bénignes et 487 tumeurs malignes. L'ensemble comprend 237 tumeurs épithéliales, 41 tumeurs mélanocytaires, 106 tumeurs conjonctives, 6 tumeurs germinales, 131 lymphomes et 9 tumeurs diverses.

La réactivité de l'anticorps monoclonal TWNB est observée, dans la limite des cas étudiés, au niveau de tumeurs épithéliales malignes et d'une certaine proportion de mélanomes. Ces observations sont détaillées ci-après.

Un marquage strictement luminal ou des sécrétions de glandes normales n'a pas été considérés comme positif. De plus, le marquage des polynucléaires n'est pas pris en compte. La présence d'un marquage nucléaire a été observée sur quelques rares cellules apoptotiques et n'est donc pas pris en compte.

#### (a) *Tumeurs mélaniques*

Deux nævi et 39 mélanomes ont été étudiés. Nous avons observé une positivité significative pour 16 mélanomes soit 40% des cas. Le marquage était membranaire ou cytoplasmique. L'IRS médian a été calculé à 3. Les deux nævi étaient négatifs (**Figure 17**)

#### (b) *Tumeurs épithéliales*

211 carcinomes et 26 tumeurs épithéliales bénignes ont été analysés (**Tableau 3**).

On observe un marquage intense membranaire et cytoplasmique dans un nombre significatif de carcinomes broncho-pulmonaires, mammaires et colorectaux.

Au niveau pulmonaire, 48% des adénocarcinomes testés étaient positifs (34+/41), 48% des carcinomes épidermoïdes (17+/29) et 26% des carcinomes neuroendocrines (**Figure 18**).

Les cancers du sein testés étaient positifs dans 53% des cas (NST : 17+/35 ; carcinomes lobulaires : 4+/4) (**Cf Partie II**).

Les adénocarcinomes colorectaux ont été observés positifs dans 64% des cas testés (16+/25) (**Figure 19**).

On note également une positivité intense au sein des carcinomes œsophagiens, grêliques, pancréatiques, urothéliaux et d'une lésion de néoplasie intra-épithéliale du col utérin (**Figure 20 et Figure 21**).

On note une conservation du marquage de la microcirculation capillaire, décrite sur le rein normal et la surrénale, dans les carcinomes rénaux et un phéochromocytome (**Figure 22**).

(c) *Tumeurs conjonctives et osseuses*

105 tumeurs des tissus mous et 1 tumeur osseuse (ostéosarcome) ont été étudiées. Il n'a pas été mis en évidence de marquage significatif dans les tumeurs testées (**Tableau 7**).

(d) *Tumeurs hématopoïétiques*

Les 131 lymphomes étudiés se distribuaient en 6 Maladies de Hodgkin, 34 lymphomes non hodgkiniens B, 90 lymphomes non hodgkiniens T et un plasmocytome. Il n'a pas été mis en évidence de positivité significative. On note une positivité cytoplasmique de quelques éléments de petite taille mononucléés dans le lymphome angioimmunoblastique étudié. La réalisation de double-marquages afin de préciser la nature de ces éléments n'a pas été réalisée dans cette étude (**Tableau 6**).

(e) *Tumeurs germinales*

Il n'a pas été mis en évidence de marquage significatif dans les tumeurs testées (**Tableau 4**).

(f) *Tumeurs du système nerveux central*

Trois cas de méningiomes ont été testés. Il n'a pas été mis en évidence de marquage significatif dans les tumeurs testées (**Tableau 8**).

**Tableau 3: réactivité de TWNB. Tumeurs épithéliales humaines.**

Type tumoraux	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
<b>Poumon</b>			
adénocarcinome	41	12 ( 0;12)	M, C
carcinome épidermoïde	29	3 ( 0;12)	M
Mixte (adénosquameux)	2	8 ( 4;12)	
carcinome neuro endocrine	19	0 ( 0;12)	M, C
carcinoïde typique	5	0 ( 0;1 )	C
carcinoïde atypique	2	3 ( 0;2 )	C
<b>Sein</b>			
NST	35	0 ( 0;12)	M, C
CLI	4	2 ( 2;6 )	M, C
tubuleux	1	6 -	M
papillaire	3	0 ( 0;0 )	
micropap	2	5 ( 1;9 )	M, C
carcinome apocrine	2	0 ( 0;0 )	
carcinome mucineux	1	12 -	C
CCIS	3	6 ( 6;12)	M
hyperplasie lobulaire atypique	1	0 -	
Maladie de Paget	2	4 ( 0;8 )	C (granuleux)
<b>Peau</b>			
carcinome basocellulaire	1	0 -	
carcinome épidermoïde	0		
kératose actinique	1	0 -	
porome eccrine	1	0 -	L
adénome sébacé	1	4 -	M
carcinome sébacé	2	1,5 ( 0;3 )	M, C
porocarcinome	2	0 ( 0;0 )	
cylindrome	1	0 -	L
<b>Tube digestif</b>			
ADK colo-rectal	25	9 ( 0;12)	M, C, L
ADK gastrique	1	2 -	M (granuleux)
ADK oesophagien	1	9 -	M, C
ADK grêle	1	8 -	L
Adénome dysplasique	2	0 ( 0;0 )	L
ADK pancréatique	2	6 ( 0;12)	M, L
<b>Foie</b>			
carcinome hépatocellulaire	4	0 ( 0;0 )	perte du réseau canaliculaire
cholangiocarcinome	1	9 -	M, L
<b>Endomètre</b>			
ADK endométrioïde	1	0 -	L
Hyperplasie atypique	1	0 -	
<b>Col utérin</b>			
CIN2	1	9 -	M, C
<b>Ovaire</b>			
ADK séreux	2	0 ( 0;0 )	
ADK mucineux	1	0 ( 0;0 )	L
T borderline séreuse	1	0 ( 0;0 )	L
T borderline mucineuse	1	0 -	L
<b>Prostate</b>			
ADK	2	0 ( 0;0 )	
<b>Rein</b>			
oncocytome	2	0 ( 0;0 )	vascularisation capillaire
carcinome à cellule rénale	11	0 ( 0;0 )	vascularisation capillaire
<b>Surrénale</b>			
phéochromocytome	1	0 ( 0;0 )	vascularisation capillaire
<b>vessie</b>			
carcinome urothélial	4	3 ( 0;9 )	M, C
<b>Thyroïde</b>			
carcinome papillaire	4	0 ( 0;0 )	
carcinome vésiculaire	1	0 ( 0;0 )	
adénome oncocytaire	3	0 ( 0;0 )	
<b>Sphère ORL</b>			
carcinome épidermoïde	2	1,5 ( 0;3 )	M
carcinome salivaire	1	0 ( 0;0 )	

IRS : immunoreactive score ; M : membranaire ; C : cytoplasmique ; L : luminal ; NST : non specific type ; CLI : carcinome lobulaire infiltrant ; CCIS : carcinome canalaire in situ ; ADK : adénocarcinome ; CIN : cervical in situ neoplasia ; T : tumeur.

**Tableau 4: Réactivité de TWNB. Tumeurs germinales.**

	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
Séminome	2	0 (0;0 )	
Tumeur de Leydig	2	1.5 (0;3 )	C
Carcinome embryonnaire	1	0 (0;0 )	
Tumeur des tubes annelés	1	0 (0;0 )	

**Tableau 5: Réactivité de TWNB. Tumeurs mélanocytaires.**

	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
Mélanomes	34	3 (0;12)	M, C
métastase ganglionnaire	4	3,5 (0;12)	M, C
métastase cérébrale	1	0 (0;0 )	M, C
Naevus	2	0 (0;0 )	

**Tableau 6: Réactivité de TWNB. Lymphomes.**

	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
<b>Lymphome non hodgkinien B</b>			
DLBCL	28	0 (0;0 )	
folliculaire	6	0 (0;0 )	
<b>Lymphome non hodgkinien T</b>			
angioimmunoblastique	1	2 -	C
ALCL	47	0 (0;0 )	
Autres	42	0 (0;0 )	
<b>Maladie de Hodgkin</b>	6	0 (0;0 )	
<b>Plasmocytome</b>	1	0 (0;0 )	

*DLBCL : diffuse large B cell lymphoma ; ALCL : anaplastic large cell lymphoma.*

**Tableau 7: Réactivité de TWNB. Tumeurs des tissus mous et tumeurs osseuses.**

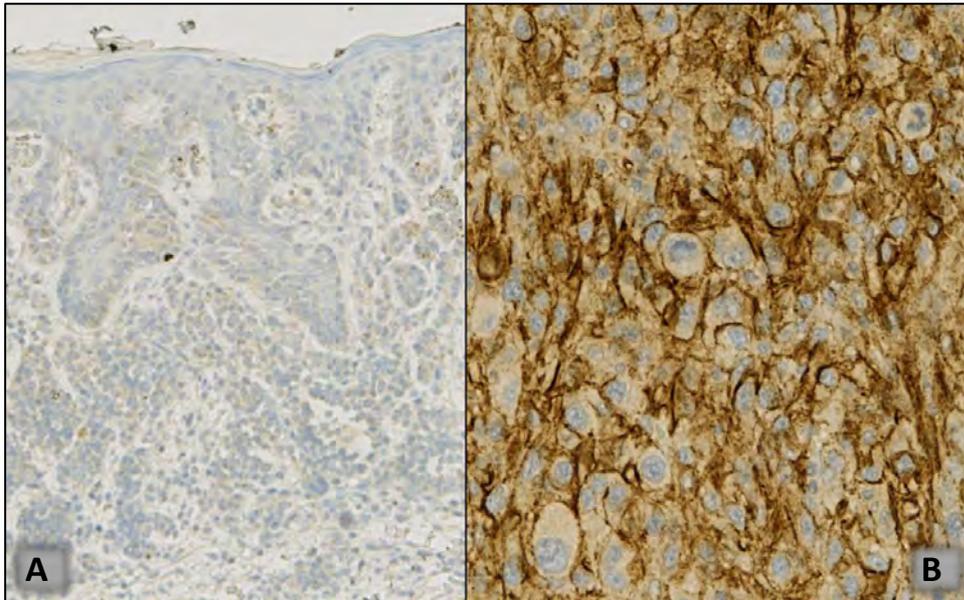
	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
<b>Tissus mous</b>			
liposarcome	51	0 (0;0 )	
léiomyosarcome	3	0 (0;0 )	
angiosarcome	3	0 (0;0 )	
DFS	4	0 (0;0 )	
MPNST	1	0 (0;0 )	
fibrosarcome	1	0 (0;0 )	
myxofibrosarcome	1	0 (0;0 )	
sarcome indifférencié à cellules fusiformes	11	0 (0;0 )	
sarcome indifférencié à cellules péomorphes	18	0 (0;0 )	
sarcome indifférencié à cellules rondes	1	0 (0;0 )	
sarcome fibromyxoïde de bas grade	1	0 (0;0 )	
GIST	2	0 (0;0 )	
neurofibrome	1	0 (0;0 )	
neurothécome cellulaire	1	0 (0;0 )	
tumeur myofibroblastique inflammatoire	1	0 (0;0 )	
lipome	5	0 (0;0 )	
<b>Tissu osseux</b>			
ostéosarcome	1	0 (0;0 )	

*DFS: dermatofibrosarcome ; MPNST : malignant peripheral nerve sheath tumor ; GIST : gastro intestinal stromal tumor.*

**Tableau 8: Réactivité de TWNB. Tumeurs diverses.**

	Nombre de cas interprétable (n)	IRS médian (variance)	Localisation du signal
<b>Mésothéliome</b>	1	0 ( 0;0 )	
<b>Thymome</b>			
thymome AB	1	0 -	
thymome B2 B3	1	2 -	C
<b>Tumeur trophoblastique</b>			
môle complète	2	0 ( 0;0 )	
<b>Tumeur neuro-ectodermique</b>			
PNET	1	0 -	
<b>Méningiome</b>	3	0 ( 0;0 )	

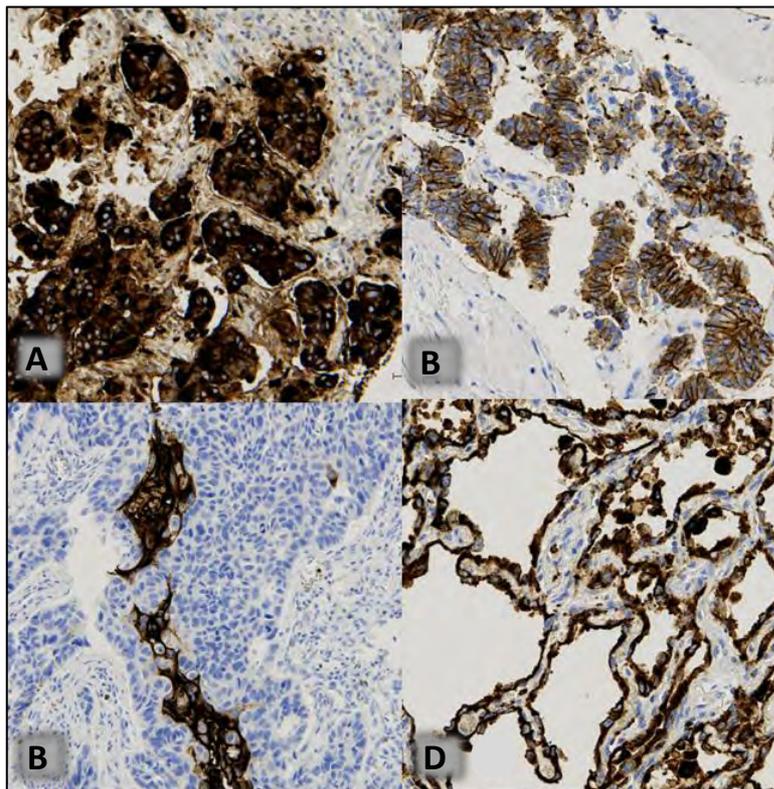
*PNET : Peripheral Neuro Ectodermic Tumor*



**Figure 17 : Marquage TWNB et pathologie mélanocytaire**

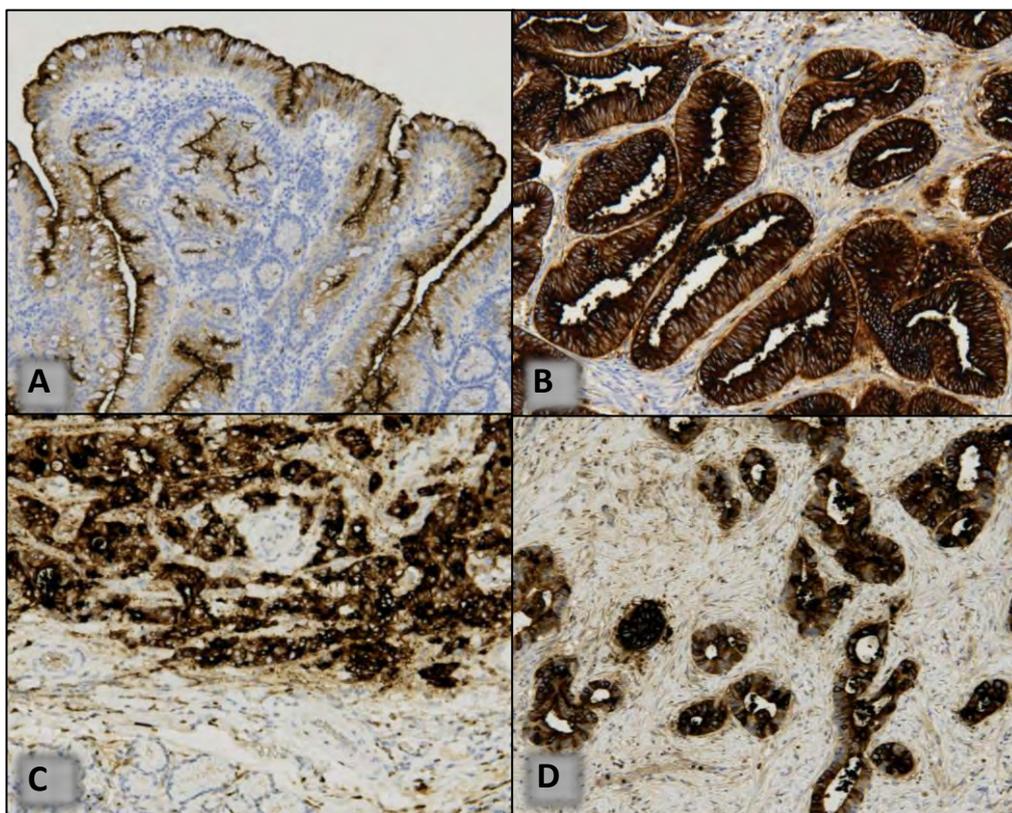
**A** : Naevus composé (pigments mélanique et absence de marquage TWNB). (Gross. x10)

**B** : Mélanome métastatique. Marquage TWNB membranaire complet intense. (Gross. x20)



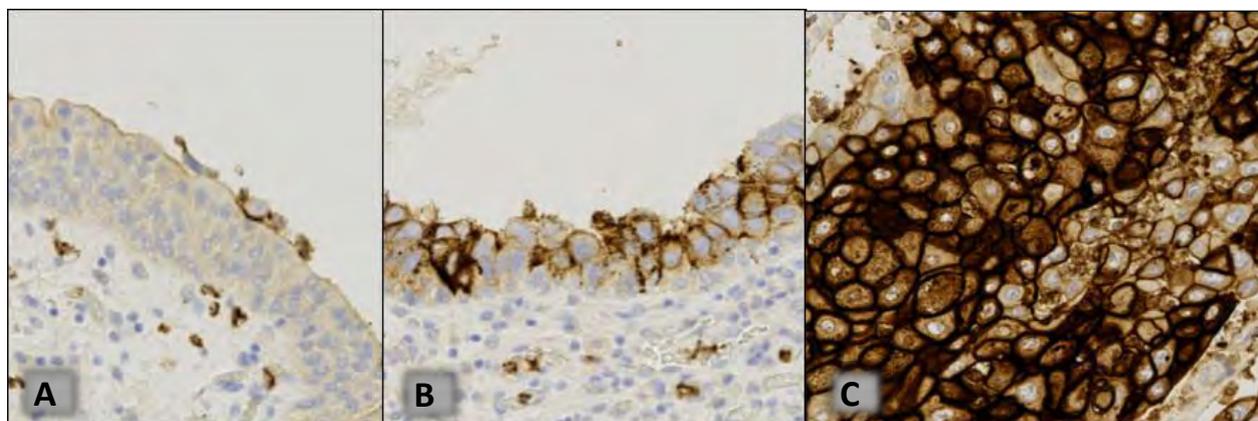
**Figure 18: Marquage TWNB et pathologie tumorale pulmonaire**

**A** : Adénocarcinome pulmonaire, marquage membranaire et cytoplasmique 3+ (x10), **B** : Adénocarcinome papillaire, marquage membranaire 3+ (x10), **C** : Carcinome épidermoïde moyennement différencié, marquage membranaire des zones mieux différenciées (x10), **D** : Carcinome In Situ, marquage cytoplasmique 3+ (x20).



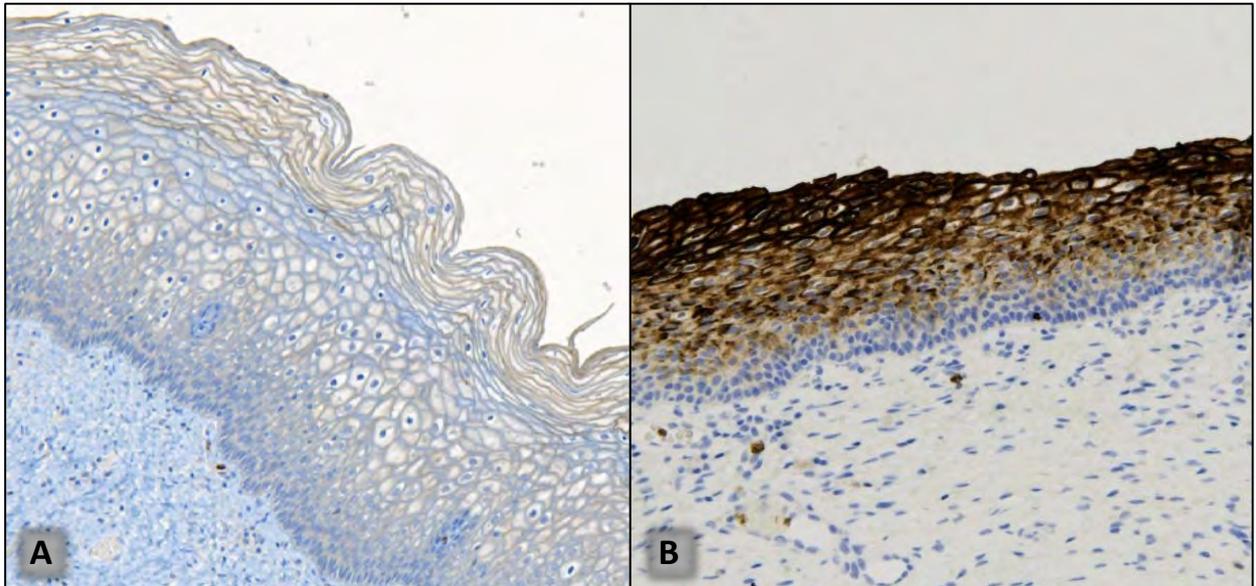
**Figure 19 : Marquage TWNB et pathologie tumorale digestive**

**A** : Adénome en dysplasie de bas grade, marquage luminal (x10), **B** : Adénocarcinome colique, marquage membranaire et cytoplasmique 3+ (x10), **C** : Adénocarcinome duodénal, marquage cytoplasmique intense (x10), **D** : Adénocarcinome œsophagien, marquage membranaire et cytoplasmique hétérogène (x10).



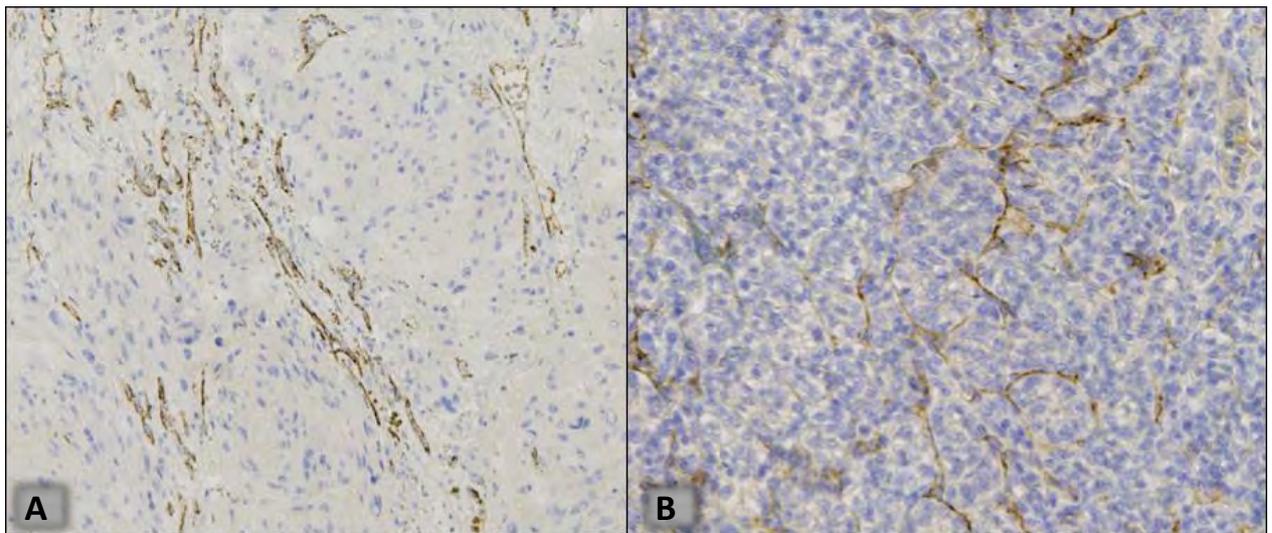
**Figure 20 : Marquage TWNB et pathologie tumorale urothéliale**

**A** : Urothélium normal, **B** : Carcinome In Situ, **C** : Carcinome urothélial de haut grade (x20).



**Figure 21: Marquage TWNB et pathologie cervicale**

**A** : Exocol normal (x10), **B** : Lésion de CIN2, marquage membranaire en cadre épargnant les couches basales (x10).



**Figure 22 : Marquage TWNB et pathologie rénale et surrénale**

**A** : Adénocarcinome à cellules claires (x10), **B** : Phéochromocytome (x10).

## **2. PROTEOMIQUE**

La caractérisation protéinique de l'antigène reconnu par TWNB n'a pu être réalisée à ce jour. En effet, nous n'avons pas réussi à utiliser TWNB en Western Blot et en immunoprécipitation tant en condition d'extraction classique dénaturante que non dénaturante. De nouvelles analyses sont en cours et permettront de tester l'hypothèse d'un épitope saccharidique (cf Discussion).

**Partie II : TWNB et cancer du sein, étude  
immunohistochimique comparative.**

# A. INTRODUCTION

## 1. CONTEXTE

Les résultats de la **partie I** sur la réactivité de l'anticorps TWNB sur des tissus tumoraux humains divers (Cf Résultats de Partie I) ont permis de mettre en évidence une importante positivité membranaire et/ou cytoplasmique sur plusieurs carcinomes mammaires et broncho-pulmonaires, colorectaux et urothéliaux, ainsi que sur des mélanomes.

Notre travail s'est focalisé dans cette seconde partie de cette étude sur la caractérisation du marquage immunohistochimique de TWNB dans les carcinomes mammaires. Ce choix s'explique par la disponibilité immédiate au sein du laboratoire de blocs de TMA associés à des données cliniques, histologiques et immunophénotypiques complètes portant sur deux larges cohortes de carcinomes mammaires : la cohorte « LAAS » et la cohorte dite des « 277 » (21,22).

Une étude statistique a ensuite été menée afin d'évaluer une potentielle corrélation entre la réactivité de l'anticorps monoclonal TWNB et ces données histopathologiques et de survie.

## 2. GENERALITES SUR LE CANCER DU SEIN

### a) *Données épidémiologiques*

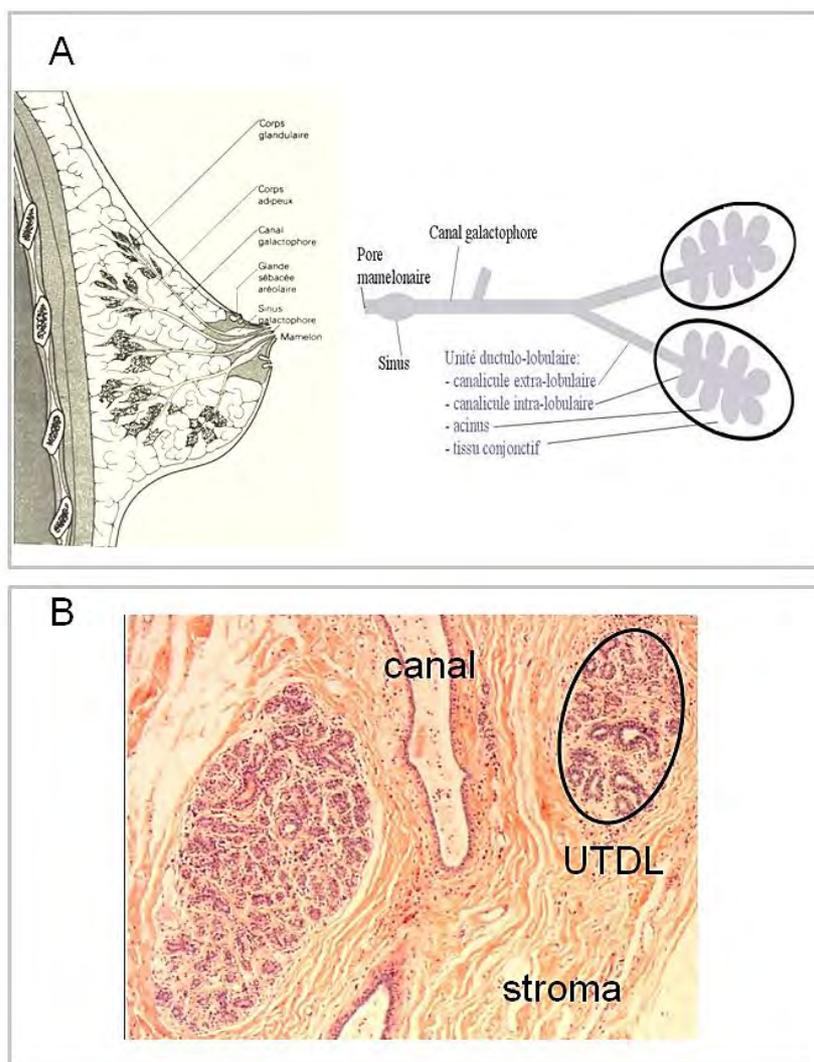
Avec 53 000 nouveaux cas en 2011, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et représente la première cause de mortalité (données INCa 2011, source Francim/Hospices civils de Lyon/INCa/Inserm/InVS 2011). Depuis plus de 25 ans, l'incidence du cancer du sein augmente de façon constante et importante : entre 1980 et 2005 l'incidence du cancer du sein a ainsi augmenté de 74% en France. Plusieurs facteurs, tels que l'évolution des facteurs de risque environnementaux et comportementaux, ont été impliqués dans cette constante augmentation. On peut ainsi citer à titre d'exemple l'exposition aux hormones stéroïdes féminines (que celle-ci soit naturelle, ou liée au traitement substitutif de la ménopause), une parité nulle

ou faible, l'absence d'allaitement, ou encore l'accroissement de l'âge au premier enfant.

A l'inverse, du fait de l'amélioration de la prise en charge thérapeutique et de la généralisation du dépistage, le taux de mortalité décroît doucement depuis les années 1998-2000 avec  $-1.3\%$  en moyenne chaque année (23). La région Midi-Pyrénées suit globalement ces tendances nationales : 2263 nouveaux cas de cancer du sein en 2010, contre 2119 en 2005 et 1445 nouveaux cas en 1995 (Indicateurs de l'Observatoire Régional de la Santé de Midi-Pyrénées, mise à jour 2010, <http://www.orsmip.org>). Le taux d'incidence du cancer du sein dans la région est actuellement de 122 pour 100 000 femmes, à peine inférieur à celui de la moyenne nationale (136.9). Dans notre région, plus de 500 femmes meurent chaque année d'un cancer du sein, soit 17.7% de l'ensemble des décès féminins par cancer. Le taux de mortalité en Midi-Pyrénées, de 29.4 pour 100 000 femmes, est inférieur à la moyenne nationale (32 pour 100 000 femmes). Comme pour l'ensemble de la France, cette mortalité a légèrement baissé en Midi-Pyrénées ( $-6.7\%$ ) en 10 ans.

### ***b) Histologie normale du sein***

Au niveau du mamelon s'abouchent les pores d'une quinzaine de canaux galactophores de gros calibre (**Figure 23**). Ces canaux galactophores se ramifient dans la profondeur du sein, jusqu'à aboutir à l'unité terminale ductulo-lobulaire (UTDL). Chaque structure épithéliale normale du sein (que ce soit au niveau des structures canales principales ou au niveau de l'UTDL) est bordée par une double assise cellulaire : une assise cellulaire épithéliale glandulaire interne, et une assise externe de type myoépithélial, aux propriétés contractiles. La partie externe de l'assise épithéliale repose sur une membrane basale, qui la sépare du stroma environnant (tissu conjonctif et adipocytes). En dehors de la période de grossesse et de lactation, il est utile de rappeler que l'essentiel du parenchyme mammaire (« tissu mammaire normal ») est représenté par le stroma, sous la forme de tissus adipeux et conjonctif.



**Figure 23: Structure normale du sein**

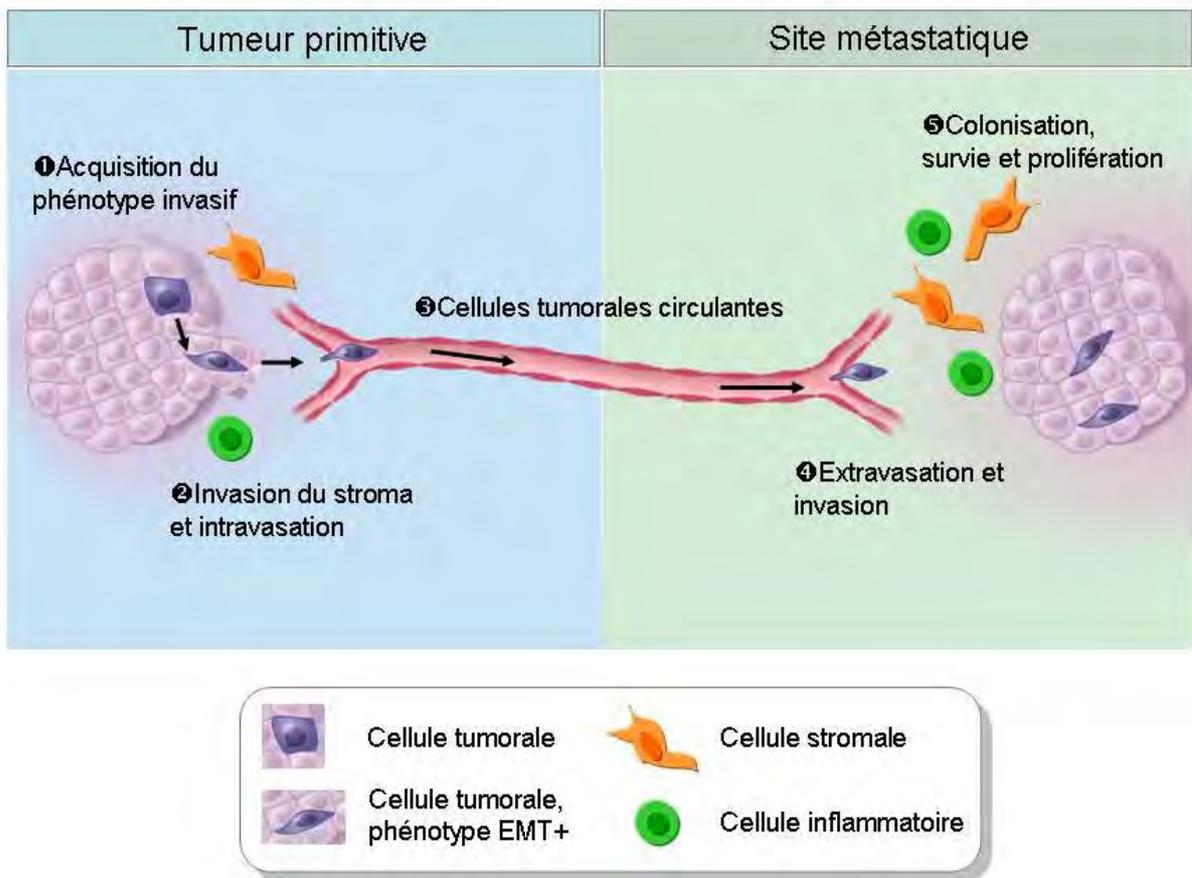
A - Schématisation du sein et de l'arbre galactophorique. B - Coupe histologique de parenchyme mammaire normal (hématoxyline-éosine Gx10). UTDL: unité terminale ductulo-lobulaire.

### c) **Histoire naturelle du cancer du sein**

Les cancers du sein correspondent à une prolifération épithéliale maligne ou adénocarcinome, développée à partir de l'épithélium glandulaire mammaire, le plus souvent au niveau de l'UTDL. Lorsque la prolifération carcinomateuse se développe à l'intérieur des structures canalaire sans franchir la membrane basale (donc sans envahir le stroma), il s'agit d'un carcinome intra-canaire ou carcinome *in situ*. Si la prolifération carcinomateuse franchit la membrane basale, envahissant le stroma, on parle alors de carcinome infiltrant.

Ces carcinomes infiltrants peuvent ensuite disséminer au-delà du parenchyme mammaire, dans un processus métastatique constitué de plusieurs étapes (**Figure 24**) bien décrites dans la littérature (24–27). Lors du premier temps d'intravasation, les cellules tumorales infiltrées dans le stroma vont franchir la paroi de structures vasculaires intra-mammaires, essentiellement de type lymphatique (pathologie lymphophile). Via la circulation lymphatique locale, les cellules tumorales gagnent les ganglions lymphatiques axillaires homolatéraux, premiers relais et premiers indicateurs majeurs d'un processus de dissémination, avant de rejoindre la circulation lymphatique générale puis sanguine. Au niveau d'un organe secondaire (foie, poumon, os, système nerveux central sont les organes les plus touchés dans le cancer du sein), les cellules tumorales quittent la circulation sanguine en franchissant la paroi vasculaire (extravasation), et colonisent l'organe secondaire pour former des métastases (colonisation) (24–27).

C'est l'apparition de ces métastases qui provoque à terme le décès des patientes, la pathologie n'étant à ce stade plus « curable » malgré les avancées thérapeutiques actuelles. Dans le cancer du sein, environ un tiers des patientes présentant une maladie initialement localisée vont développer des métastases à distance malgré le traitement adjuvant (28), et 5% des patientes sont métastatiques d'emblée au moment du diagnostic initial. De façon générale, et selon les données issues de registres américains (n=13172, SEER, pour *Surveillance, Epidemiology and END Results*) et européens (n=4478, EUROCORE pour *European Concerted Action on Survival and Care of Cancer Patients*), la survie globale à 5 ans des patientes présentant un cancer du sein atteint 89% aux Etats-Unis et 79% en Europe (74 à 82% en France) (29). En France, le nombre de décès liés au cancer du sein atteignait 11 441 patientes en 2006 (18.9% des décès par cancer chez la femme)(23), et 11 358 patientes en 2011 (données INCa 2011, source Francim/Hospices civils de Lyon/INCa/Inserm/InVS 2011).



**Figure 24: Schématisation des étapes du processus métastatique (d'après Chaffer and Weinberg, Science 2011)**

La formation de métastases comprend 2 phases majeures: dissémination des cellules cancéreuses de la tumeur primaire vers un organe distant et colonisation de cet organe. La première étape est l'acquisition du phénotype invasif par la tumeur primitive (1). Les cellules cancéreuses infiltrent le stroma puis franchissent la paroi vasculaire pour entrer dans la circulation (sanguine ou lymphatique) (2). Les cellules tumorales circulent dans l'organisme (3). Les cellules tumorales circulantes quittent ensuite la circulation sanguine et infiltrent le microenvironnement de l'organe distant (4), où elles survivent, échappent au système immunitaire et forment des métastases (5). EMT: transition épithélio-mésenchymateuse.

#### **d) Le cancer du sein : aspects thérapeutiques**

Schématiquement, le traitement du cancer du sein comporte 2 axes principaux :

1. Un traitement loco-régional dont le premier et principal temps est l'acte chirurgical, qu'il soit radical (mastectomie) ou conservateur (tumorectomie). Le traitement radiothérapique clôture le traitement loco-régional, en suivant des indications précises. La radiothérapie est notamment obligatoire en cas de geste chirurgical conservateur de la glande mammaire. Outre l'éradication des cellules tumorales installées dans le sein, le traitement loco-régional a pour objectif de réduire le risque de rechute locale ou loco-régionale qui aggrave le pronostic vital des patientes.
2. Un traitement systémique (chimiothérapie et/ou hormonothérapie), dit « adjuvant » lorsqu'il est administré après chirurgie ou néo-adjuvant lorsqu'il est administré avant la chirurgie. Le choix d'un traitement néo-adjuvant (le plus souvent par chimiothérapie) est dicté par certaines situations cliniques, telles que les cancers du sein inflammatoire, localement avancés ou dans l'optique d'une chirurgie conservatrice sur une tumeur volumineuse (30). Le traitement adjuvant est prescrit en fonction d'indications dictées par les caractéristiques cliniques et biologiques de la tumeur (marqueurs pronostiques et prédictifs, détaillés plus bas), et dont l'objectif principal est d'empêcher la rechute à distance (prévention de la maladie métastatique). Ainsi, la décision du type de traitement se base sur des marqueurs pronostiques et prédictifs, dont la combinaison doit de façon optimale éviter l'écueil du sur- et sous-traitement. La décision thérapeutique s'appuie sur les recommandations et référentiels (régionaux, nationaux ou internationaux) émanants de groupes de travail ou de conférences de consensus tels que St Gallen (31) ou St Paul-de-Vence. Néanmoins, les critères de décision actuels demeurent encore insuffisants, et la plupart des recherches en cours dans le cancer du sein (notamment en biologie moléculaire) visent à affiner la sélection du traitement pour chaque patiente, *i.e.* à aller vers une prise en charge individuelle de chaque patiente (32).

### e) **Marqueurs pronostiques et théranostiques**

Le rôle des facteurs pronostiques est de fournir au clinicien des indications sur le risque local (risque de rechute loco-régionale) et vital (rechute métastatique et décès) encouru par les patientes, lui permettant ainsi d'adapter au mieux le traitement. Dans le cancer du sein comme dans la plupart des autres cancers, les marqueurs pronostiques se divisent en caractéristiques cliniques, caractéristiques morphologiques tumorales, et caractéristiques biologiques et moléculaires. La plupart de ces marqueurs vise à approcher au mieux les caractéristiques tumorales intrinsèques, telles que la vitesse de croissance tumorale, l'« invasivité » tumorale et la capacité à donner des métastases.

Le rôle des facteurs prédictifs est de prédire la capacité de réponse à un traitement donné, qu'il soit médical (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapie ciblée, immunothérapie) ou radio-thérapeutique, adjuvant, néo-adjuvant (avant chirurgie) ou palliatif (en situation métastatique).

Si ces 2 classes de facteurs sont classiquement distinguées l'une de l'autre, il est clairement établi que certains marqueurs peuvent appartenir aux deux catégories, étant à la fois pronostiques et prédictifs.

Il existe actuellement une multitude de marqueurs pronostiques putatifs dans le cancer du sein, souvent redondants entre eux, et à des stades plus ou moins avancés de validation clinique. La conférence de consensus du Collège des Pathologistes Américains (33) a publié une classification des marqueurs pronostiques dans le cancer du sein en 3 catégories :

1. **catégorie 1** : facteurs pronostiques importants utilisés pour les décisions thérapeutiques,
  - a. stade TNM (Tumor Node Metastasis) (**Tableau 9**),
  - b. statut ganglionnaire axillaire,
  - c. taille histologique de la tumeur,
  - d. grade histopronostique (**Tableau 10**),
  - e. type histologique (**Tableau 11**),
  - f. compte des mitoses (compte effectué sur 10 champs au fort grossissement et rapporté à la surface du champ, qui est variable pour chaque microscope. Le résultat est ainsi rapporté en nombres de mitoses par mm<sup>2</sup>),
  - g. statut des récepteurs hormonaux.

2. **catégorie 2** : facteurs pronostiques étudiés sur le plan clinique et biologique, mais nécessitant une validation dans des cohortes cliniques statistiquement pertinentes,
  - a. embolies vasculaires carcinomateuses péri-tumorales,
  - b. statut de l'oncogène HER2,
  - c. marqueurs de prolifération: Mib1/Ki67 (marqueur des cellules en cycle), phase S déterminée par cytométrie en flux,
  - d. statut p53.
  
3. **catégorie 3** : tous les autres facteurs pronostiques, non suffisamment étudiés mais potentiellement utiles,
  - a. ploïdie de l'ADN,
  - b. angiogenèse tumorale,
  - c. facteurs immunohistochimiques divers tels que Bcl2, EGFR, la topoisomérase 2 $\alpha$  entre autres.

Depuis sa publication en 2000 (33), cette classification n'a pas été actualisée, mais de nombreux autres marqueurs ont fait leur apparition dans le cancer du sein, notamment grâce aux avancées de la biologie moléculaire à grande échelle. Néanmoins, parmi ces nouveaux marqueurs, très peu sont actuellement utilisés en pratique clinique courante.

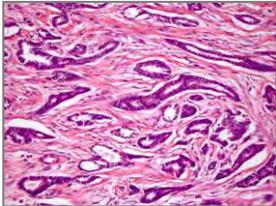
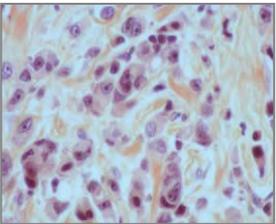
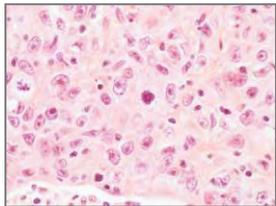
De façon consensuelle, les 3 facteurs pronostiques les plus importants à l'heure actuelle restent l'envahissement ganglionnaire, la taille tumorale et le grade histologique. Par ailleurs, pour la population sans envahissement ganglionnaire, la conférence de consensus internationale de St-Gallen définit un sous-groupe de patientes à très faible risque (i.e. avec un risque de rechute  $\leq 10\%$  à 10 ans) lorsque tous les critères suivants sont remplis : tumeur de moins de 2cm, grade histologique 1, absence d'embolie vasculaire carcinomateuse péri-tumorale, statut HER2 négatif, âge  $\geq 35$  ans (34).

**Tableau 9: Classification (p)TNM des tumeurs du sein (UICC 2009, 7eme édition)**

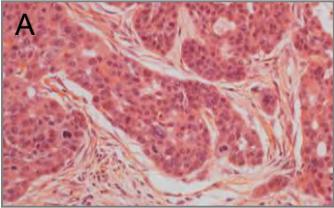
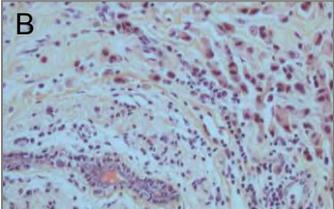
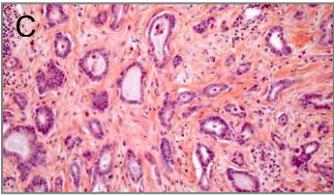
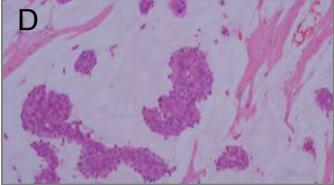
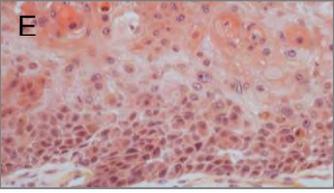
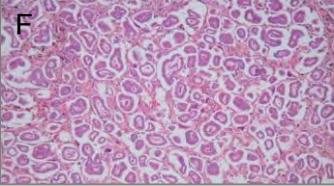
pT	
pTx	Détermination de taille de la tumeur primitive impossible
pT0	Pas de signe de tumeur primitive
pTis	Carcinome in situ
	pTis (CCIS)                      Carcinome canalaire in situ
	pTis (CLIS)                      Carcinome lobulaire in situ
	pTis (Paget)                      Maladie de Paget du mamelon sans tumeur décelable
pT1	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension
	pT1mic                              Micro-invasion ≤ 0.1cm
	pT1a                                 0.1cm < Tumeur ≤ 0.5cm
	pT1b                                 0.5cm < Tumeur ≤ 1cm
	pT1c                                 1cm < Tumeur ≤ 2cm
pT2	2cm < Tumeur ≤ 5cm
pT3	Tumeur > 5cm
T4	Tumeur de toute taille avec extension à la paroi thoracique et/ou à la peau
	T4a                                  Extension à la paroi thoracique
	T4b                                  Extension à la peau
	T4c                                  Extension à la paroi thoracique et à la peau
	T4d                                  Cancer du sein inflammatoire (entité clinique spécifique)
pN	
pNx	Atteinte ganglionnaire impossible à préciser
pN0	Absence d'envahissement ganglionnaire
	pN0 (i+)                              Présence de cellules tumorales isolées de taille ≤ 0.2mm
	pN0 (mol+)                            Absence de signe histologique d'envahissement mais test moléculaire (RT-PCR) positif
pN1mi	Micro-métastases de taille > 0.2mm et ≤ 2mm
pN1	Envahissement ganglionnaire modéré
	pN1a                                 1 à 3 ganglions axillaires envahis
	pN1b                                 Ganglions sentinelles mammaires internes envahis (diagnostic histologique)
	pN1c                                 Critères associés pN1a et pN1b
pN2	Envahissement ganglionnaire important
	pN2a                                 4 à 9 ganglions axillaires métastatiques
	pN2b                                 Métastases ganglionnaires mammaires internes cliniques sans envahissement axillaire
pN3	Envahissement ganglionnaire massif
	pN3a                                 ≥ 10 ganglions axillaires envahis ou métastase ganglionnaire sous claviculaire
	pN3b                                 Métastases mammaires internes et axillaires
	pN3c                                 Métastase ganglionnaire sus-claviculaire
M	
M0	Absence de métastase à distance
M1	Métastase(s) à distance

p: caractéristique déterminée exclusivement par le pathologiste T: tumeur N: Node (ganglion lymphatique) M: métastase.

**Tableau 10: Grade histopronostique de Scarff Bloom Richardson modifié par Elston et Ellis (grade de Nottingham) (35).**

Différenciation architecturale	<i>Proportion de formation de structures tubulo-glandulaires dans la tumeur</i>	
	Score 1	Bien différencié (> 75% de la tumeur)
	Score 2	Moyennement différencié (10 à 75%)
	Score 3	Peu différencié (< 10% de la tumeur)
Pléomorphisme nucléaire	<i>Atypies nucléaires</i>	
	Score 1	Noyaux réguliers entre eux et de taille < à 2 fois la taille de noyaux de cellules normales
	Score 2	Critères intermédiaires
	Score 3	Noyaux irréguliers avec anisocaryose ou de taille > à 3 fois celle de noyaux normaux, avec nucléoles proéminents
Mitoses	<i>Comptage des mitoses sur 10 champs au fort grossissement, rapporté au diamètre du champ (abaque de Elston et Ellis, ici pour 0.57mm de diamètre)</i>	
	Score 1	0 à 9 mitoses
	Score 2	10 à 18 mitoses
	Score 3	> 18 mitoses
Grade histopronostique	Score total obtenu en additionnant les 3 items	
I	3 à 5	Pronostic favorable
II	6 - 7	Pronostic intermédiaire
III	8 - 9	Pronostic défavorable

**Tableau 11: Classification des types histologiques de cancer du sein (OMS 2012, (Lakhani, Ellis et al. 2012))**

Type histologique	Commentaires	
Carcinome NST (canalaire infiltrant) (A)	le plus fréquent	
Carcinome lobulaire infiltrant (B)		
Carcinome tubuleux (C)	<i>bon pronostique</i>	
Carcinome médullaires/avec faits médullaires		
Carcinomes produisant de la mucine (D)	<i>bon pronostique</i>	
Carcinome cribiforme infiltrant	<i>bon pronostique</i>	
Carcinomes endocrines du sein		
Carcinome métaplasique (E)		
Carcinome à différenciation apocrine		
Carcinome à cellules riches en lipides		
Carcinome sécrétant (juvénile)	<i>bon pronostique</i>	
Carcinome adénoïde kystique	<i>bon pronostique</i>	
Carcinome à cellules acineuses		
Carcinome à cellules claires (riches en glycogène)		
Carcinome mammaire avec cellules géantes ostéoclastiques		
Carcinome mammaire avec faits choriocarcinomateux		
Carcinome oncocytique		
Carcinome sébacé		
Carcinome micropapillaire infiltrant		
Carcinome mucoépidermoïde		
Tumeurs mélanocytaires		

NST : non specific type.

## **B. MATERIEL ET METHODES**

### **1. COHORTE « LAAS »**

Cette cohorte de cancer du sein est constituée d'une série de 150 carcinomes mammaires infiltrants consécutifs, recueillis au laboratoire de pathologie de l'Institut Claudius Regaud (ICR Toulouse, France) entre 2009 et 2011(21). Tous les patients inclus dans cette cohorte avaient signé un consentement éclairé. Les données de suivi clinique disponibles n'ont pas été actualisées. Elles apparaissent donc peu informatives du fait de la trop courte période de suivi. L'actualisation de ces données sera réalisée prochainement.

### **2. COHORTE DES « 277 »**

Cette cohorte clinique correspond à une série de 277 cas de cancers du sein, issus de patientes traitées de façon consécutive à l'Institut Claudius Regaud entre 1996 et 1998 (22). Les cas ont été sélectionnés sur la base de disponibilité de blocs fixés (Bouin ou AFA) et inclus en paraffine, avec suffisamment de matériel pour construire un tissu microarray (TMA). Les caractéristiques cliniques et histopathologiques sont détaillées dans le **Tableau 13**. Il est important de souligner que 120/277 (43%) des patientes de la cohorte (patientes N+) ont reçu une chimiothérapie adjuvante sur la base d'un seul et même protocole (6 FEC100). Une hormonothérapie adjuvante (tamoxifène) a été délivrée pour 107/277 (38.6%) des patientes. Toutes les patientes ayant été traitées par chirurgie conservatrice ont bénéficié d'une radiothérapie adjuvante.

### **3. TECHNIQUE ET ANALYSE IMMUNOHISTOCHIMIQUES**

Les données de phénotype (RE, RP et HER2), proviennent de l'étude IHC effectuée antérieurement sur TMA, selon les protocoles actualisés (données initiales manquantes pour HER2 ou dosage biochimique des récepteurs hormonaux selon les standards de l'époque). Ces marquages IHC avaient été réalisés sur coupes de TMA de 4 µm d'épaisseur sur un automate Techmate Horizon (Dako, Glostrup, Danemark) (36).

Le détail des protocoles immunohistochimiques utilisés pour l'immunophénotypage de ces cohortes est précisé dans le **Tableau 12**.

**Tableau 12: Détails des protocoles immunohistochimiques utilisés sur la cohorte des « 277 » cancers du sein (36).**

Marqueur	Clone	Fournisseur	Dilution	Pré-traitement	Système de scoring	Seuil de positivité
<b>RE</b>	6F11	Novocastra, Newcastle, UK	1:50	40 min bain-marie, Tris/EDTA pH9 (Target Retrieval Solution pH9, Dako)	% noyaux marqués	≥ 10%
<b>RP</b>	PgR636	Dako, Glostrup, Denmark	1:50	40 min bain-marie, Tris/EDTA pH9	% noyaux marqués	≥ 10%
<b>HER2</b>	Polyclonal A0485	Dako	1:500	40 min bain-marie, citrate pH6 (Target Retrieval Solution pH6, Dako)	Score 0, 1+, 2+, 3+ selon le système HercepTest® (recommandations ASCO/CAP 2007)	Score 0/1+: Négatif Score 2+: Equivoque Score 3+: Positif
<b>CK5/6</b>	D5/16B4	Dako	1: 25	40 min bain-marie, citrate pH6	% cellules marquées cytoplasmique	>0%
<b>EGFR</b>	2-18C9	Dako	Pré-dilué	Protéinase K	% cellules marquées membranaire	>0%

Les marquages immunohistochimiques **TWNB** ont été réalisés de manière semi automatisée, sur les automates Dako® autostainer et /ou Ventana® Xpress. Les résultats obtenus avec ces deux types d'automate sont identiques.

Les détails des protocoles immunohistochimiques sont identiques à ceux mentionnés dans la Partie I.

Le score IRS (ImmunoReactive Score) a également été employé pour l'analyse du marquage selon des règles identiques à celles énoncées en Partie I.

## 4. METHODOLOGIE STATISTIQUE

Pour l'analyse statistique, les variables qualitatives sont présentées pour la population globale ou par groupe : nombre de données manquantes, nombre et pourcentage, ainsi que la médiane, valeurs maximales et minimales pour chaque modalité de la variable.

Les données quantitatives sont présentées pour la population globale ou par groupe de la façon suivante : nombre de données manquantes, moyenne, variance, écart-type, minimum, maximum, médiane, quartiles. La comparaison entre les groupes a été faite par le test du  $\chi^2$  ou le test exact de Fisher pour les variables qualitatives et par le test le test de Mann Whitney (2 groupes) ou le test de Kruskal Wallis (>2 Groupes) pour les variables quantitatives.

Par ailleurs, la date d'origine pour définir les délais de survie, sauf précision contraire, correspond à la date de chirurgie. Le suivi médian a été calculé depuis la date d'inclusion jusqu'à la date de dernière nouvelle en prenant comme événement l'état vivant et le décès comme censure. La survie globale (OS) est définie par le décès toutes causes confondues. Elle correspond au délai entre la date d'origine et le décès, ou la date de dernières nouvelles (données censurées). La survie sans Métastase (MFS) est définie par le diagnostic d'une métastase. Elle correspond au délai entre la date d'origine et le diagnostic d'une métastase, ou, la date de dernières nouvelles (Données censurées). En analyse univariée, les taux de survie ont été estimés par groupe par la méthode de Kaplan-Meier. La comparaison entre les groupes a été réalisée par le test du logrank. Le hazard ratio a été estimé avec son intervalle de confiance à 95%. Le modèle à risque proportionnel de Cox a été utilisé pour les analyses multivariées. Toutes les variables incluses dans l'analyse univariée ont été prises en considération dans l'analyse multivariée, les facteurs cliniques habituels ont eux aussi été pris en compte. Une procédure pas à pas ascendante (« Forward ») a été utilisée avec un test du rapport de vraisemblance  $p < 0.05$  pour l'incorporation des covariables dans le modèle.

## C. RESULTATS

### 1. DESCRIPTION DES COHORTES CLINIQUES

La cohorte des « 277 » est composée de 277 patientes. La cohorte LAAS contient 150 patientes. Les caractéristiques cliniques et histopathologiques de ces deux cohortes sont comparables entre elles et à celles observées en pratique courante. La majorité des patientes sont en période de péri-ménopause. Il s'agit principalement de carcinomes canauxaires infiltrants de grade intermédiaire, récepteurs aux œstrogènes positifs et de stade TNM T1c N0 (classification TNM 7eme édition, IUCC 2009). Ces caractéristiques sont détaillées dans le **Tableau 13**.

**Tableau 13: Caractéristiques cliniques et histopathologiques des cohortes de cancer du sein.**

Caractéristiques	Cohorte 277 n=277	Cohorte LAAS n=150
<b>Age</b>		
Médiane (variance)	54 ans (29 - 87)	59 ans (29 – 86)
<b>Taille tumorale</b>		
T<20mm	130 (50.6%)	84 (56.0% )
T≥20mm	127 (49.4%)	60 ( 40.0%)
NR	20	6
Médiane (variance)	18 mm (4 – 120)	20 mm (7 - 65)
<b>Type histologique</b>		
canalaire	214 (79.0%)	112 (74.6%)
lobulaire	47 (17.3%)	20 (13.3%)
autre	10 ( 3.7%)	7 ( 4.6%)
NR	6	11
<b>Grade histologique</b>		
I	34 (12.7%)	18 ( 12.0%)
II	108 (40.1%)	57 ( 38.0%)
III	127 (47.2%)	75 (50.0%)
NR	8	0
<b>Statut ganglionnaire</b>		
N-	157 (56.7%)	69 ( 47.3%)
N+	120 (43.3%)	77 (52.7%)
NR	0	4
<b>RE</b>		
+	180 (68.0%)	126 ( 84.0%)
-	85 (32.0%)	24 ( 16.0%)
NR	12	0
<b>RP</b>		
+	162 (60.7%)	107 ( 71.3%)
-	105 (39.3%)	43 ( 28.7%)
NR	10	0
<b>HER2 (IHC)</b>		
+ (surexpression)	33 (12.7%)	15 ( 10,0%)
-	226 (87.3%)	132 ( 88.0%)
NR	18	0
<b>Sous-type moléculaire*</b>		
luminal	186 (70.7%)	110 ( 73.3%)
HER2	33 (12.6%)	12 ( 8.0%)
basal-like	30 (11.4%)	23 ( 15,3%)
triple-négatif non basal	14 ( 5.3%)	5 ( 3,3%)
NR	14	0
<b>Rechute</b>		
non	176 (64.5%)	146 ( 97,3%)
oui	97 (35.5%)	4 ( 2,7%)
NR	4	0
<b>Type de rechute</b>		
loco-régionale	29 (30.0%)	146 ( 97,3%)
Métastase à distance	68 (70.0%)	4 ( 2,7%)
<b>Patientes décédées</b>		
non	213 (78.3%)	150 ( 100% )
oui	59 (21.7%)	0 ( 0% )
NR	5	0
<b>Durée de suivi</b>		
médiane	104 mois	19,1 mois
IC 95%	95 - 109	16,5 - 19,9

\* sous-type moléculaire selon la classification IHC décrite par Nielsen et al. (37) ; IC: intervalle de confiance; RE: récepteur des œstrogènes; IHC, Immunohistochimie; NR, Non Renseigné (donnée manquante); RP: récepteur de la progestérone.

## 2. PROFIL D'EXPRESSION DE TWNB DANS LES COHORTES

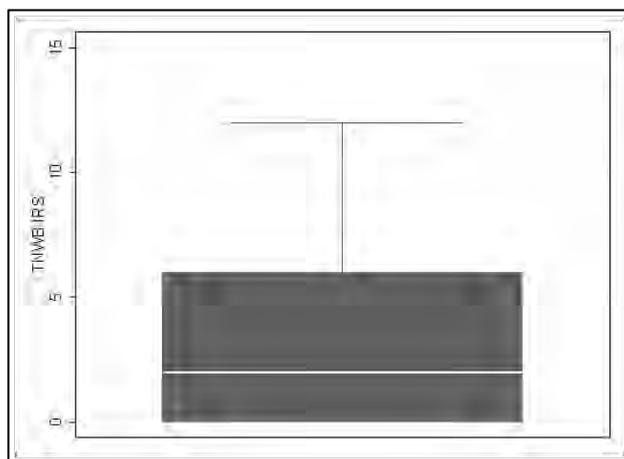
Les immunomarquages ont été interprétables pour 143 cas de la cohorte LAAS et 247 cas de la cohorte « 277 ». La réduction des effectifs s'explique par des pertes habituelles de certains spots sur les lames de TMA lors des étapes techniques. Ce sont donc 390 cancers du sein qui ont été analysés.

Le type de marquage observé est essentiellement membranaire et/ou cytoplasmique. L'intensité du marquage est très variable allant d'une négativité complète à un intense marquage cytoplasmique et membranaire circonférentiel (**Figure 26**). Le pourcentage de cellules marquées apparaît très variable avec une certaine hétérogénéité intra tumorale. Il a donc été décidé de comparer les marquages en utilisant le score IRS comme décrit précédemment (20).

Dans un second temps, nous avons classé les tumeurs en deux groupes : les tumeurs positives et les tumeurs négatives. Le seuil de positivité est classiquement fixé par la médiane des valeurs. Nous avons utilisé la cohorte « LAAS » pour calculer ce seuil. En effet, cette cohorte est constituée de tissus dont la fixation est homogène, au formol tamponné. La présence dans la cohorte « 277 » de fixateurs alternatifs, parfois non formolés, risquait de biaiser le calcul de ce seuil. Le choix s'est donc porté sur la cohorte la plus homogène pour fixer un seuil de positivité.

### *a) Profil d'expression de la cohorte LAAS*

Dans la cohorte « LAAS » (n= 143), les valeurs d'IRS se répartissent de 0 à 12, avec une médiane à 2. Nous avons donc choisi comme seuil de positivité un IRS  $\geq 2$ . Pour ce seuil, 49 % (70/143) des cas sont positifs dans cette cohorte. La répartition des valeurs peut être représentée sous la forme d'un Box Plot (**Figure 25**).



**Figure 25 : Box Plot des scores IRS dans la série « LAAS »**

***b) Profil d'expression de la cohorte « 277 »***

Les scores IRS pour la série des « 277 » (n= 247) se répartissent de 0 à 12 mais avec une médiane à 0. La répartition des valeurs ne peut être représentée sous la forme d'un Box Plot car la médiane est à 0. La valeur très basse de cette médiane est probablement liée aux artéfacts de fixation. Pour un seuil théorique supérieur à la médiane (>0 dans cette cohorte), 22,7 % (56/247) des cas seraient positifs. Pour le seuil de positivité établi à partir de la cohorte « LAAS », 16,6% (41/247) des cas sont positifs.

### 3. CORRELATION ENTRE TWNB ET LES CARACTERISTIQUES CLINICO – HISTOLOGIQUES ET IMMUNOPHENOTYPIQUES.

Les études statistiques de corrélations ont été effectuées avec deux seuils de positivité différents. Un seuil bas (IRS à 2) et un seuil haut (IRS à 12). Le seuil bas correspond à la médiane des IRS observés dans la cohorte « LAAS » comme décrit précédemment. Le seuil haut (IRS à 12) a été choisi car les carcinomes mammaires très positifs (Intensité 3+ et 80 à 100% des cellules marquées) pourraient correspondre à une entité particulière. De plus un seuil haut permet de minimiser certains biais de fausse-positivité (bruit de fond, marquages non spécifiques).

Les résultats observés sont globalement comparables dans les deux cohortes.

Considérant un seuil IRS à 2, la positivité pour TWNB est significativement corrélée à un envahissement ganglionnaire et une négativité des récepteurs hormonaux au sein de la cohorte LAAS (**Tableau 14**). Pour ce même seuil, la cohorte « 277 » permet de corrélérer significativement la taille tumorale supérieure à 2 cm, un haut grade (III), un statut HER2+ et un sous type moléculaire HER2 enrichi (**Tableau 15**).

Considérant un seuil IRS fixé à 12, la positivité de notre anticorps monoclonal apparaît significativement associée à la présence d'embolies vasculaires (cohorte LAAS). La taille tumorale supérieure à 2, le statut HER2+ et le sous typage moléculaire HER2 enrichi restent par ailleurs significativement associés au marquage TWNB dans les deux cohortes (**Tableau 14 et Tableau 15**) (**Figure 27**).

Il n'a pas été établi mis en évidence de lien significatif sur la survie globale ou la survie sans progression (Cohorte des « 277 ») (**Tableau 16**).

L'étude des survies dans la cohorte LAAS n'a pas été effectuée car les données de suivi clinique n'ont pu être mises à jour. Elles apparaissent peu informatives du fait de la trop courte période de suivi disponible actuellement. L'actualisation de ces données sera réalisée prochainement.

**Tableau 14: Corrélation TWNB / données clinico-histologiques et immunophénotypiques. Cohorte « LAAS » (n=143)**

	Total	Seuil IRS à 2			Seuil IRS à 12		
		IRS ≤ 2 (n=73)	IRS > 2 (n=70)	p	IRS ≤ 12 (n=128)	IRS > 12 (n=15)	p
<b>Age au Diagnostic</b>							
≤60 ans	78 (54.5%)	37 (50.7%)	41 (58.6%)	p = 0.3437	71 (55.5%)	7 (46.7%)	p = 0.5172
>60 ans	65 (45.5%)	36 (49.3%)	29 (41.4%)		57 (44.5%)	8 (53.3%)	
NR	0	0	0		0	0	
<b>Statut ganglionnaire</b>							
N-	112 (79.4%)	62 (86.1%)	50 (72.5%)	p = 0.0450	102 (81.0%)	10 (66.7%)	p = 0.1933
N+	29 (20.6%)	10 (13.9%)	19 (27.5%)		24 (19.0%)	5 (33.3%)	
NR	2	1	1		2	0	
<b>Statut métastatique</b>							
0	137 (97.2%)	70 (97.2%)	67 (97.1%)	p = 1.0000	123 (97.6%)	14 (93.3%)	p = 0.3656
1	4 (2.8%)	2 (2.8%)	2 (2.9%)		3 (2.4%)	1 (6.7%)	
NR	2	1	1		2	0	
<b>Type Histologique</b>							
Lobulaire	17 (11.9%)	9 (12.3%)	8 (11.4%)	p = 0.9712	16 (12.5%)	1 (6.7%)	p = 0.8762
Canalaire	118 (82.5%)	60 (82.2%)	58 (82.9%)		104 (81.3%)	14 (93.3%)	
Mixte	1 (0.7%)	1 (1.4%)	0 (0.0%)		1 (0.8%)	0 (0.0%)	
Autre	7 (4.9%)	3 (4.1%)	4 (5.7%)		7 (5.5%)	0 (0.0%)	
NR	0	0	0		0	0	
<b>Présence de Carcinome In Situ</b>							
Non	59 (41.8%)	32 (44.4%)	27 (39.1%)	p = 0.5225	53 (42.1%)	6 (40.0%)	p = 0.8783
Oui	82 (58.2%)	40 (55.6%)	42 (60.9%)		73 (57.9%)	9 (60.0%)	
NR	2	1	1		2	0	
<b>Grade Elston &amp; Ellis</b>							
I	18 (12.6%)	9 (12.3%)	9 (12.9%)	p = 0.4931	16 (12.5%)	2 (13.3%)	p = 0.7457
II	58 (40.6%)	33 (45.2%)	25 (35.7%)		53 (41.4%)	5 (33.3%)	
III	67 (46.9%)	31 (42.5%)	36 (51.4%)		59 (46.1%)	8 (53.3%)	
NR	0	0	0	0	0		
<b>Différenciation</b>							
1	4 (2.8%)	3 (4.1%)	1 (1.4%)	p = 0.6947	4 (3.1%)	0 (0.0%)	p = 1.0000
2	31 (21.8%)	15 (20.5%)	16 (23.2%)		28 (22.0%)	3 (20.0%)	
3	107 (75.4%)	55 (75.3%)	52 (75.4%)		95 (74.8%)	12 (80.0%)	
NR	1	0	1		1	0	
<b>Noyaux</b>							
1	6 (4.2%)	4 (5.5%)	2 (2.9%)	p = 0.5132	6 (4.7%)	0 (0.0%)	p = 0.8936
2	76 (53.5%)	41 (56.2%)	35 (50.7%)		67 (52.8%)	9 (60.0%)	
3	60 (42.3%)	28 (38.4%)	32 (46.4%)		54 (42.5%)	6 (40.0%)	
NR	1	0	1		1	0	
<b>Mitoses</b>							
1	50 (35.2%)	27 (37.0%)	23 (33.3%)	p = 0.8190	46 (36.2%)	4 (26.7%)	p = 0.4985
2	32 (22.5%)	15 (20.5%)	17 (24.6%)		27 (21.3%)	5 (33.3%)	
3	60 (42.3%)	31 (42.5%)	29 (42.0%)		54 (42.5%)	6 (40.0%)	
NR	1	0	1		1	0	

NR : Non Renseigné (donnée manquante); IRS : ImmunoRéactive Score.

Tableau 14: Cohorte des « LAAS » (suite)

	Total	Seuil IRS à 2			Seuil IRS à 12		
		IRS ≤ 2 (n=73)	IRS>2 (n=70)	p	IRS ≤ 12 (n=128)	IRS > 12 (n=15)	p
<b>Emboles</b>							
Non	79 (57.7%)	45 (64.3%)	34 (50.7%)	p = 0.1089	75 ( <b>61.5%</b> )	4 (26.7%)	<b>p = 0.0100</b>
Oui	58 (42.3%)	25 (35.7%)	33 (49.3%)		47 (38.5%)	11 ( <b>73.3%</b> )	
NR	6	3	3		6	0	
<b>Dimension histologique</b>							
Médiane (mm) (intervalle)	20.0 (7.0; 65.0)	20.0 (7.0; 60.0)	20.0 (9.0; 65.0)	p = 0.1281	20.0 (7.0 ; 65.0)	22.5 (13.0 ; 50.0)	p = 0.0673
≤2cm	82 (59.9%)	45 (65.2%)	37 (54.4%)	p = 0.3536	75 (61.0%)	7 (50.0%)	p = 0.3685
[2 cm; 5 cm]	46 (33.6%)	21 (30.4%)	25 (36.8%)		39 (31.7%)	7 (50.0%)	
>5 cm	9 ( 6.6%)	3 ( 4.3%)	6 ( 8.8%)		9 ( 7.3%)	0 ( 0.0%)	
NR	6	4	2		5	1	
<b>Ganglions envahis</b>							
Médiane (intervalle)	1.0 (0.0; 26.0)	1.0 (0.0; 18.0)	1.0 (0.0; 26.0)	p = 0.3855	1.0 (0.0 ; 26.0)	1.0 (0.0 ; 21.0)	p = 0.4450
0	65 (46.8%)	34 (48.6%)	31 (44.9%)	<b>p = 0.0273</b>	60 (48.4%)	5 (33.3%)	p = 0.5242
1-3	44 (31.7%)	27 (38.6%)	17 (24.6%)		38 (30.6%)	6 (40.0%)	
>3	30 (21.6%)	9 (12.9%)	21 ( <b>30.4%</b> )		26 (21.0%)	4 (26.7%)	
NR	4	3	1		4	0	
<b>Récepteurs des Œstrogènes (RE)</b>							
Médiane (%) (intervalle)	90.0 (0.0; 100.0)	90.0 (0.0; 100.0)	90.0 (0.0; 100.0)	p = 0.7421	90.0 (0.0 ; 100.0)	90.0 (0.0 ; 100.0)	p = 0.2799
NR	0	0	0				
0	22 (15.4%)	8 (11.0%)	14 (20.0%)	p = 0.1824	21 (16.4%)	1 ( 6.7%)	p = 0.0577
1+	4 ( 2.8%)	2 ( 2.7%)	2 ( 2.9%)		4 ( 3.1%)	0 ( 0.0%)	
2+	21 (14.7%)	8 (11.0%)	13 (18.6%)		15 (11.7%)	6 (40.0%)	
3+	96 (67.1%)	55 (75.3%)	41 (58.6%)				
Négatif	24 (16.8%)	8 (11.0%)	16 (22.9%)	p = 0.0570	23 (18.0%)	1 ( 6.7%)	p = 0.4667
Positif	119 (83.2%)	65 (89.0%)	54 (77.1%)		105 (82.0%)	14 (93.3%)	
<b>Récepteurs de la Progestérone (RP)</b>							
Médiane (%) (intervalle)	50.0 (0.0; 100.0)	80.0 (0.0; 100.0)	45.0 (0.0; 100.0)	p = 0.0982	50.0 (0.0 ; 100.0)	50.0 (0.0 ; 100.0)	p = 0.7443
0	32 (22.7%)	12 (16.4%)	20 (29.4%)	p = 0.3111	28 (22.2%)	4 (26.7%)	p = 0.8280
1+	6 ( 4.3%)	3 ( 4.1%)	3 ( 4.4%)		5 ( 4.0%)	1 ( 6.7%)	
2+	10 ( 7.1%)	6 ( 8.2%)	4 ( 5.9%)		9 ( 7.1%)	1 ( 6.7%)	
3+	93 (66.0%)	52 (71.2%)	41 (60.3%)		84 (66.7%)	9 (60.0%)	
NR	2	0	2		2	0	
Négatif	42 (29.4%)	15 (20.5%)	27 ( <b>38.6%</b> )	<b>p = 0.0180</b>	37 (28.9%)	5 (33.3%)	p = 0.7673
Positif	101 (70.6%)	58 ( <b>79.5%</b> )	43 (61.4%)		91 (71.1%)	10 (66.7%)	

**Tableau 14: Cohorte « LAAS » (suite)**

	Total	Seuil IRS à 2			Seuil IRS à 12		
		IRS ≤ 2 (n=73)	IRS > 2 (n=70)	p	IRS ≤ 12 (n=128)	IRS > 12 (n=15)	p
<b>Récepteurs Hormonaux</b>							
Négatif	22 (15.4%)	7 ( 9.6%)	15 ( <b>21.4%</b> )	<b>p = 0.0498</b>	21 (16.4%)	1 ( 6.7%)	p = 0.4676
Positif	121 (84.6%)	66 ( <b>90.4%</b> )	55 (78.6%)		107 (83.6%)	14 (93.3%)	
RE- & RP-	22 (15.4%)	7 ( 9.6%)	15 (21.4%)	p = 0.0857	21 (16.4%)	1 ( 6.7%)	p = 0.4537
RE+ & RP-	20 (14.0%)	8 (11.0%)	12 (17.1%)		16 (12.5%)	4 (26.7%)	
RE- & RP+	2 ( 1.4%)	1 ( 1.4%)	1 ( 1.4%)		2 ( 1.6%)	0 ( 0.0%)	
RE+ & RP+	99 (69.2%)	57 (78.1%)	42 (60.0%)		89 (69.5%)	10 (66.7%)	
<b>RH/HER2</b>							
TNBC	18 (12.6%)	5 ( 6.8%)	13 (18.6%)	p = 0.0529	18 (14.1%)	0 ( 0.0%)	<b>p = 0.0125</b>
RH+/HER2-	110 (76.9%)	62 (84.9%)	48 (68.6%)		100 (78.1%)	10 (66.7%)	
HER2+	15 (10.5%)	6 ( 8.2%)	9 (12.9%)		10 ( 7.8%)	5 ( <b>33.3%</b> )	
<b>Triple Négatif</b>							
Non	125 (87.4%)	68 ( <b>93.2%</b> )	57 (81.4%)	<b>p = 0.0346</b>	110 (85.9%)	15 (100.0%)	p = 0.2170
Oui	18 (12.6%)	5 ( 6.8%)	13 ( <b>18.6%</b> )		18 (14.1%)	0 ( 0.0%)	
<b>CK5/6 (%)</b>							
Médiane (%)	0.0	0.0	0.0	p = 0.8350	0.0	0.0	p = 0.3939
(intervalle)	(0.0; 100.0)	(0.0; 90.0)	(0.0; 100.0)		(0.0 ; 100.0)	(0.0 ; 0.0)	
NR	2	1	1		2	0	
<b>EGFR (%)</b>							
Médiane (%)	0.0	0.0	0.0	p = 0.4859	0.0	0.0	p = 0.6160
(intervalle)	(0.0; 100.0)	(0.0; 100.0)	(0.0; 90.0)		(0.0 ; 100.0)	(0.0 ; 30.0)	
NR	2	2	0		2	0	
<b>RA (%)</b>							
Médiane (%)	10.0	20.0	5.0	p = 0.2836	10.0	30.0	p = 0.8498
(intervalle)	(0.0; 100.0)	(0.0; 100.0)	(0.0; 90.0)		(0.0 ; 100.0)	(0.0 ; 60.0)	
NR	11	5	6		7	4	

NR : Non Renseigné (donnée manquante); IRS : ImmunoRéactive Score ; RE : Récepteurs des Œstrogènes ; RP : Récepteurs de la Progestérone ; TNBC : Triple Negative Breast Carcinome ; CK : Cytokératines ; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor ; RA : Récepteurs des Androgènes.

**Tableau 15: Corrélation TWNB / données clinico-histologiques et immunophénotypiques. Cohorte des « 277 » (n=247)**

	Total	Seuil IRS à 2			Seuil IRS à 12		
		IRS ≤ 2 (n=206)	IRS > 2 (n=41)	p	IRS ≤ 12 (n=234)	IRS > 12 (n=12)	p
<b>Age au Diagnostic</b>							
Médiane (%)	54.0	52.0	<b>57.0</b>	<b>p = 0.0235</b>	53.0	62.0	p = 0.0810
(Range)	(29.0 : 87.0)	(29.0 : 87.0)	(36.0 : 76.0)		(29.0 : 87.0)	(36.0 : 74.0)	
NR	0	0	0				
≤35 ans	8 ( 3.2%)	8 ( 3.9%)	0 ( 0.0%)	p = 0.1290	8 ( 3.4%)	0 ( 0.0%)	p = 0.6003
36-50 ans	92 (37.2%)	81 (39.3%)	11 (26.8%)		89 (38.0%)	3 (23.1%)	
>50 ans	147 (59.5%)	117 (56.8%)	30 (73.2%)		137 (58.5%)	10 (76.9%)	
NR	0	0	0				
<b>Statut Ganglionnaire</b>							
N-	142 (57.5%)	125 ( <b>60.7%</b> )	17 (41.5%)	<b>p = 0.0230</b>	137 (58.5%)	5 (38.5%)	p = 0.153
N+	105 (42.5%)	81 (39.3%)	24 ( <b>58.5%</b> )		97 (41.5%)	8 (61.5%)	
NR	0	0	0				
<b>Taille de la Tumeur (cm)</b>							
Médiane (%)	2.0	1.8	<b>2.2</b>	<b>p = 0.0262</b>	1.8	2.3	p = 0.0717
(Range)	(0.4 : 12.0)	(0.4 : 8.0)	(0.9 : 12.0)		(0.4 : 8.0)	(1.2 : 1.2)	
NR	19	15	4		18	1	
<2 cm	114 (50.0%)	104 ( <b>54.5%</b> )	10 (27.0%)	<b>p = 0.0058</b>	111 (51.4%)	2 (16.7%)	<b>p = 0.0242</b>
2-5 cm	108 (47.4%)	82 (42.9%)	26 ( <b>70.3%</b> )		100 (46.3%)	9 ( <b>75.0%</b> )	
>5 cm	6 ( 2.6%)	5 ( 2.6%)	1 ( 2.7%)		5 ( 2.3%)	1 ( <b>8.3%</b> )	
NR	19	15	4		18	1	
<2 cm	114 (50.0%)	104 ( <b>54.5%</b> )	10 (27.0%)	<b>p = 0.0023</b>	111 (51.4%)	2 (16.7%)	<b>p = 0.0192</b>
≥2 cm	114 (50.0%)	87 (45.5%)	27 ( <b>73.0%</b> )		105 (48.6%)	10 ( <b>83.3%</b> )	
NR	19	15	4		18	1	
<b>Grade SBR</b>							
I	30 (12.6%)	30 (15.0%)	0 ( 0.0%)	<b>p = 0.0069</b>	30 (13.3%)	0 ( 0.0%)	p = 0.4137
II	97 (40.6%)	82 (41.0%)	15 (38.5%)		90 (39.8%)	7 (53.8%)	
III	112 (46.9%)	88 (44.0%)	24 ( <b>61.5%</b> )		106 (46.9%)	6 (46.2%)	
NR	8	6	2		8	0	
<b>Mitoses</b>							
1	41 (17.6%)	39 (19.8%)	2 ( 5.6%)	p = 0.1063	39 (17.7%)	2 (15.4%)	p = 0.7426
2	67 (28.8%)	54 (27.4%)	13 (36.1%)		62 (28.2%)	5 (38.5%)	
3	125 (53.6%)	104 (52.8%)	21 (58.3%)		119 (54.1%)	6 (46.2%)	
NR	14	9	5		14	0	
<b>Type Histologique</b>							
Canalaire	192 (79.7%)	164 (81.6%)	28 (70.0%)	<b>p = 0.0322</b>	183 (80.3%)	9 (69.2%)	<b>p = 0.0189</b>
Lobulaire	39 (16.2%)	29 (14.4%)	10 (25.0%)		37 (16.2%)	2 (15.4%)	
Mixte	7 ( 2.9%)	7 ( 3.5%)	0 ( 0.0%)		7 ( 3.1%)	0 ( 0.0%)	
Autre	3 ( 1.2%)	1 ( 0.5%)	2 ( 5.0%)		1 ( 0.4%)	2 (15.4%)	
NR	6	5	1		6	0	

Tableau 15: Cohorte des « 277 » (suite)

	Total	Seuil IRS à 2			Seuil IRS à 12		
		IRS ≤ 2 (n=206)	IRS > 2 (n=41)	p	IRS ≤ 12 (n=234)	IRS > 12 (n=12)	p
<b>Récepteurs des Œstrogènes (RE)</b>							
Médiane (%)	60.0	60.0	50.0	p = 0.6053	60.0	50.0	p = 0.8716
(Range)	(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 100.0 )		(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 100.0 )	
NR	6	4	2		4	2	
0	71 (29.5%)	56 (27.7%)	15 (38.5%)	p = 0.5222	67 (29.1%)	4 (36.4%)	p = 0.7313
1+	44 (18.3%)	39 (19.3%)	5 (12.8%)		43 (18.7%)	1 ( 9.1%)	
2+	44 (18.3%)	38 (18.8%)	6 (15.4%)		43 (18.7%)	1 ( 9.1%)	
3+	82 (34.0%)	69 (34.2%)	13 (33.3%)		77 (33.5%)	5 (45.5%)	
NR	6	4	2		4	2	
Négatif	77 (32.0%)	60 (29.7%)	17 (43.6%)	p = 0.0886	72 (31.3%)	5 (45.5%)	p = 0.3353
Positif	164 (68.0%)	142 (70.3%)	22 (56.4%)		158 (68.7%)	6 (54.5%)	
NR	6	4	2		4	2	
<b>Récepteurs de la Progestérone (RP)</b>							
Médiane (%)	40.0	<b>50.0</b>	<b>3.0</b>	<b>p = 0.0074</b>	40.0	10.0	p = 0.1633
(Range)	(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 100.0 )		(0.0 : 100.0 )	(0.0 : 90.0 )	
NR	4	3	1		3	1	
0	83 (34.2%)	64 (31.5%)	19 (47.5%)	p = 0.1222	77 (33.3%)	6 (50.0%)	p = 0.7041
1+	18 ( 7.4%)	15 ( 7.4%)	3 ( 7.5%)		18 ( 7.8%)	0 ( 0.0%)	
2+	24 ( 9.9%)	19 ( 9.4%)	5 (12.5%)		23 (10.0%)	1 ( 8.3%)	
3+	118 (48.6%)	105 (51.7%)	13 (32.5%)		113 (48.9%)	5 (41.7%)	
NR	4	3	1		3	1	
Négatif	94 (38.7%)	73 (36.0%)	21 ( <b>52.5%</b> )	<b>p = 0.0496</b>	88 (38.1%)	6 (50.0%)	p = 0.5448
Positif	149 (61.3%)	130 ( <b>64.0%</b> )	19 (47.5%)		143 (61.9%)	6 (50.0%)	
NR	4	3	1		3	1	
<b>Récepteurs Hormonaux</b>							
Négatif	59 (24.5%)	45 (22.3%)	14 ( <b>35.9%</b> )	<b>p = 0.0701</b> <b>(chi-2)</b>	54 (23.5%)	5 (45.5%)	p = 0.1436
Positif	182 (75.5%)	157 ( <b>77.7%</b> )	25 (64.1%)		176 (76.5%)	6 (54.5%)	
NR	6	4	2		4	2	
RE-/RP-	59 (24.5%)	45 (22.3%)	14 (35.9%)	p = 0.1623	54 (23.5%)	5 (45.5%)	p = 0.4788
RE-/RP+	18 ( 7.5%)	15 ( 7.4%)	3 ( 7.7%)		18 ( 7.8%)	0 ( 0.0%)	
RE+/RP-	35 (14.5%)	28 (13.9%)	7 (17.9%)		34 (14.8%)	1 ( 9.1%)	
RE+/RP+	129 (53.5%)	114 (56.4%)	15 (38.5%)		124 (53.9%)	5 (45.5%)	
NR	6	4	2		4	2	

Tableau 15: Cohorte des « 277 » (suite)

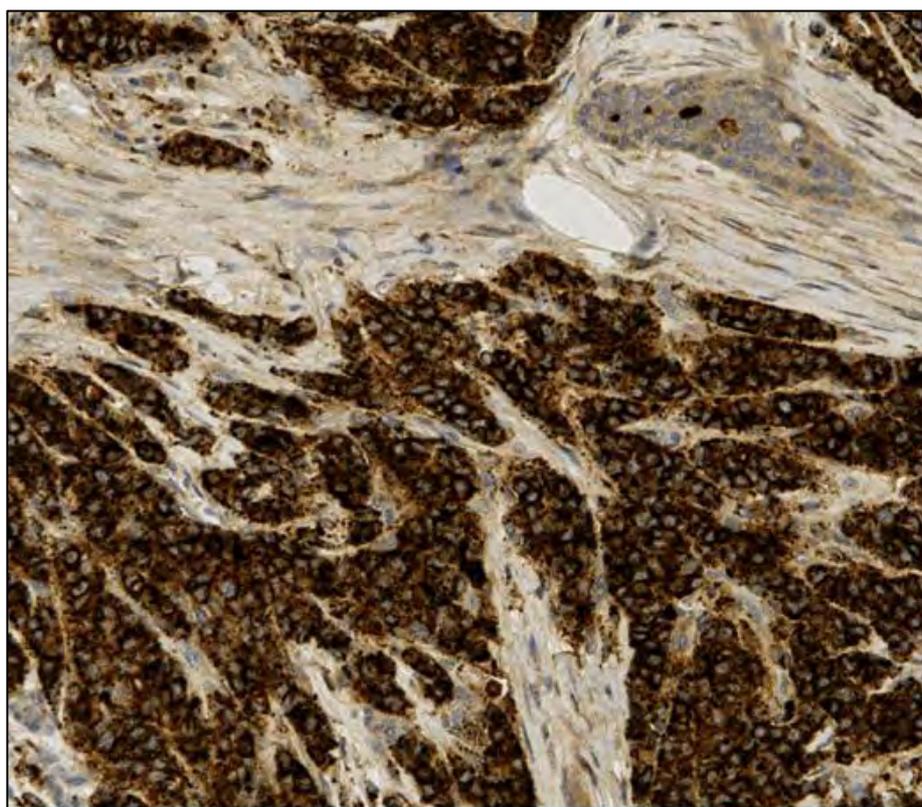
	Total	Seuil IRS à 2			p	Seuil IRS à 12			p
		IRS ≤ 2 (n=206)	IRS > 2 (n=41)			IRS ≤12 (n=234)	IRS > 12 (n=12)		
<b>Statut HER2</b>									
Négatif	214 (87.3%)	186 (91.2%)	28 (68.3%)	<b>p &lt; 0.0001</b>	206 ( <b>88.8%</b> )	8 (61.5%)	<b>p = 0.0145</b>		
Positif	31 (12.7%)	18 ( 8.8%)	13 ( <b>31.7%</b> )		26 (11.2%)	5 ( <b>38.5%</b> )			
NR	2	2	0		2	0			
<b>Sous-type moléculaire</b>									
LUMINAL	173 (71.2%)	150 (73.9%)	23 (57.5%)	<b>p = 0.0004</b>	167 (72.3%)	6 (50.0%)	<b>p = 0.0203</b>		
HER2	31 (12.8%)	18 ( 8.9%)	13 ( <b>32.5%</b> )		26 (11.3%)	5 ( <b>41.7%</b> )			
BASAL	27 (11.1%)	26 (12.8%)	1 ( 2.5%)		27 (11.7%)	0 ( 0.0%)			
TN non basal	12 ( 4.9%)	9 ( 4.4%)	3 ( 7.5%)		11 ( 4.8%)	1 (8.3%)			
NR	4	3	1		3	1			
<b>Triple Négatif</b>									
Non	201 (83.8%)	166 (82.6%)	35 (89.7%)	p = 0.2676 (chi-2)	191 (83.4%)	10 (90.9%)	p = 1.0000		
Oui	39 (16.3%)	35 (17.4%)	4 (10.3%)		38 (16.6%)	1 ( 9.1%)			
NR	7	5	2		5	2			
<b>RH/HER2</b>									
TN	39 (16.2%)	35 (17.3%)	4 (10.3%)	<b>p = 0.0002</b>	38 (16.5%)	1 (9.1%)	p = 0.0113		
RH+/HER2-	171 (71.0%)	149 (73.8%)	22 (56.4%)		166 (72.2%)	5 (45.5%)			
HER2+	31 (12.9%)	18 (8.9%)	13 ( <b>33.3%</b> )		26 (11.3%)	5 (45.5%)			
NR	6	4	2		4	2			

IRS : ImmunoReactive Score ; NR : Non Renseigné ; TN : Triple Négative ; RH : Récepteurs hormonaux.

**Tableau 16: Corrélation TWNB / Survie sans métastase, survie globale (cohorte « 277 »).**

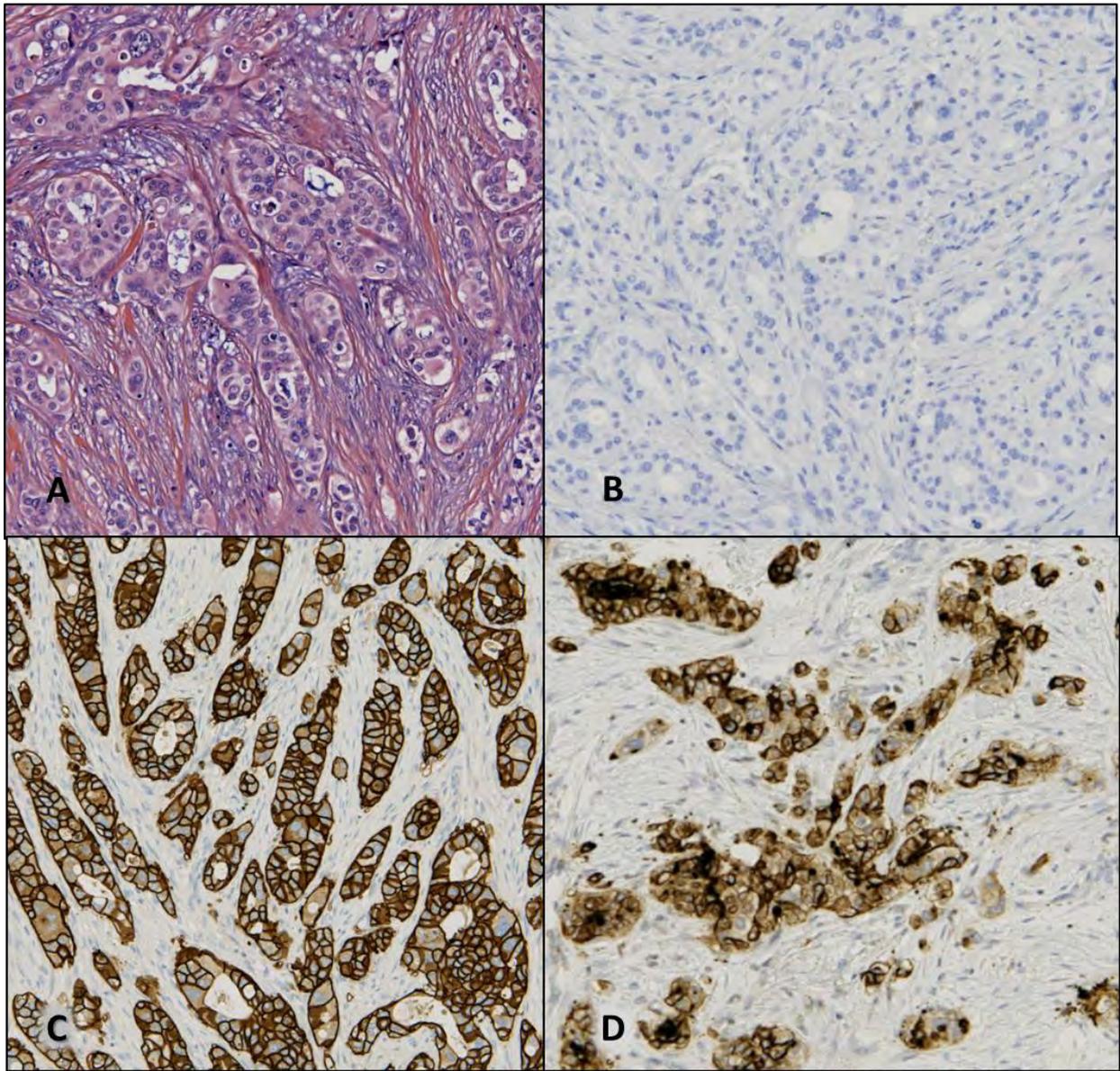
	Seuil IRS	Evt / n	S (60)	95% CI	Significativité
<b>Survie sans métastase</b>	≤ 2	43 / 208	87.92%	[82.52;91.74]	p = 0.5750
	> 2	9 / 41	85.11%	[69.81;93.02]	
	≤ 12	50 / 236	87.59%	[82.52;91.26]	p = 0.8481
	> 12	2 / 13	84.62%	[51.22;95.91]	
<b>Survie globale</b>	≤ 2	43 / 208	87.92%	[82.52;91.74]	p = 0.5750
	> 2	9 / 41	85.11%	[69.81;93.02]	
	≤ 12	50 / 236	87.59%	[82.52;91.26]	p = 0.8481
	> 12	2 / 13	84.62%	[51.22;95.91]	

*IRS : Immuno Reactive Score ; evt/n : nombre d'évènements / nombre total ; S (60) survie à 60 mois ; CI : Intervalle de Confiance.*



**Figure 26: Carcinome NST de la cohorte LAAS (x20)**

Marquage TWNB membranaire et cytoplasmique granuleux d'intensité 3+.



**Figure 27 : Carcinome mammaire NST de grade III. Morphologie et immunophénotype.**

**A :** Morphologie, hémalum et éosine. Gross. X10

**B :** Récepteurs Progéstérone négatif.

**C :** HER2, marquage membranaire en cadre complet intense (3+)

**D :** TWNB, marquage membranaire et cytoplasmique intense (3+)

# **DISCUSSION**

La production d'anticorps monoclonaux par xénogreffes de tumeurs humaines est une technique efficace et désormais largement utilisée. Le criblage des hybridomes obtenus par technique immunohistochimique permet la détection d'anticorps parfois inattendus, sans rapport avec la tumeur utilisée pour l'immunisation initiale. Mais ces anticorps peuvent néanmoins être intéressants et ne doivent pas être déconsidérés. C'est ainsi que l'anticorps monoclonal TWNB 10.7 a été découvert. Sa réactivité s'est avérée intéressante non seulement sur les tumeurs mélanocytaires comme attendu, mais également sur une proportion non négligeable de carcinomes mammaires, pulmonaires, digestifs, pancréatiques et urothéliaux.

Cette réactivité croisée entre divers types de tumeurs humaines et le profil d'expression dans certains tissus sains fait poser plusieurs hypothèses concernant la nature de l'antigène reconnu.

## **A. CARACTERISATION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE TWNB**

Au cours de cette étude, nous avons mis en évidence une positivité immunohistochimique membranaire et de surface de TWNB sur les cellules mélanocytaires malignes de la lignée TW12, sur certains tissus normaux et sur de nombreux tissus tumoraux.

Les tissus normaux murins n'expriment pas l'épitope reconnu par TWNB. La réactivité de TWNB semble très limitée dans les tissus normaux humains.

Certains éléments inflammatoires présentent un signal cytoplasmique. Ils semblent morphologiquement correspondre à des polynucléaires. Un signal immunohistochimique non spécifique peut s'expliquer au niveau des polynucléaires neutrophiles par un fort taux de peroxydase endogène. Cependant cette hypothèse n'a pas pu être confirmée dans notre étude. Au niveau du tissu hématopoïétique, il existe également un marquage similaire d'éléments semblant appartenir à la lignée granuleuse immature ou monocyttaire. La réalisation de double marquage sera nécessaire pour préciser la nature de ces éléments. Dans les ganglions normaux et réactionnels, on observe un marquage en réseau au niveau des sinus.

Le marquage membranaire des couches superficielles des muqueuses malpighiennes par TWNB est observé dans divers localisations. Ce marquage peut être complet en cadre mais n'atteint jamais les couches basales. Ce type de

marquage n'est pas retrouvé au niveau cutané. Il est impossible de préciser ce jour s'il s'agit d'un marquage ou d'un marquage non spécifique des sérosités imbibées dans les couches superficielles. L'identification de l'antigène reconnu par TWNB permettre probablement de répondre à cette question.

Un marquage du pôle luminal est fréquemment observé au niveau des systèmes glandulaires. On le retrouve au niveau des glandes digestives, mammaires, endométriales et prostatiques. On y rapproche également le marquage des canalicules biliaires et des ductules salivaires.

Le signal observé au niveau du parenchyme pulmonaire est hétérogène et variable entre les différents prélèvements examinés. Il peut être soit absent, soit positif au niveau des surfaces alvéolaires et d'éléments mononucléés endo-alvéolaires, très évocateurs de pneumocytes de type 2. Un contexte inflammatoire semblerait favoriser cette positivité. Le signal linéaire observé en surface des alvéoles pourrait correspondre à un marquage de pneumocytes de type 1 ou simplement un marquage moins spécifique du surfactant. Ces constatations devront être confirmées et précisées par une étude plus approfondie.

Le marquage endothélial des capillaires rénaux et surréniaux est linéaire et limité à la microcirculation capillaire. Les vaisseaux adjacents de plus gros calibre sont négatifs. Aucun autre organe examiné ne comporte ce type de marquage. Il semble donc exister une spécificité de l'endothélium rénal et surrénalien, mise en évidence par TWNB.

La réactivité immunohistochimique au niveau des tumeurs humaines a été étudiée dans un premier temps sur des cas de pathologie générale. Comme attendu, l'anticorps réagit avec un nombre significatif de mélanomes. Une analyse précise de cette réactivité sur une large série de mélanomes et de nævi, sera menée prochainement.

Par ailleurs, il a été constaté une positivité membranaire et/ou cytoplasmique fréquente et intense au niveau des tumeurs épithéliales et plus particulièrement dans les carcinomes pulmonaires, mammaires, digestifs, ainsi que dans les quelques cas de carcinomes pancréatiques et urothéliaux analysés. Hormis le caractère épithélial,

il ne semble pas y avoir de lien évident entre ces tumeurs (origine embryologiques différentes) et fonctions physiologiques différentes (glandulaire ou non).

D'une manière intéressante, les tumeurs conjonctives et lymphoïdes sont constamment négatives. L'immunomarquage de TWNB pourrait être utile dans le diagnostic différentiel entre sarcomes épithélioïdes, synoviosarcomes, mélanomes et carcinomes sarcomatoïdes. Ici encore, une étude complémentaire sera menée très bientôt.

Dans la deuxième partie de notre étude, la réactivité des carcinomes mammaires pour TWNB a été particulièrement approfondie. Ce choix s'explique par la disponibilité immédiate de deux larges cohortes de patientes, soit 390 carcinomes mammaires analysables. Il a été mis à notre disposition les blocs TMA, les données histologiques et phénotypiques complètes et un suivi clinique à long terme. Les études de corrélation ont été effectuées en choisissant deux seuils de positivité : un seuil bas (IRS à 2) et un seuil haut (IRS à 12). Le seuil bas correspond à la médiane des IRS observés dans la cohorte des « LAAS ». Le seuil haut (IRS à 12) a été choisi car les carcinomes mammaires très positifs (Intensité 3+ et 80 à 100% des cellules marquées) pourrait correspondre à une entité particulière. Le seuil bas favoriserait la sensibilité alors que le seuil haut améliorerait la spécificité du marqueur en éliminant de potentiels faux-positifs.

Les résultats démontrent un lien significatif entre une positivité membranaire et/ou cytoplasmique de TWNB des cellules tumorales et plusieurs facteurs d'agressivité tumorale (taille tumorale, grade élevé, présence d'emboles, invasion ganglionnaire, statut RP- (luminal B), RH-, HER2+ ou triple négatif). La corrélation avec un statut HER2+ et la classe moléculaire HER enrichie (HER2+ et RH-) est également constaté dans les deux cohortes et pour les 2 seuils. Il n'a cependant pas été établi de lien pronostique significatif.

## B. PROTEOMIQUE

La nature de l'antigène reconnu par l'anticorps TWNB 10.7 n'a pas pu encore être précisée. Il s'agirait d'un antigène de surface comme nous le montre les expérimentations réalisées sur les cellules de la lignée TW12 (**Figure 12**).

Les difficultés rencontrées à obtenir la caractérisation protéinique peuvent s'expliquer par différentes hypothèses. Si la structure de la protéine se rapproche de celle des mucines, il s'agirait d'une glycoprotéine de trop haut poids moléculaire (jusqu'à  $10^6$  Daltons) fortement glycosylée.

L'étape de Western Blot est difficile, les protéines de trop haut poids moléculaire pénètrent mal le gel de migration. De plus leur transfert est également délicat. L'analyse d'une glycoprotéine est plus difficile que celle d'une protéine non glycosylée puisque plusieurs autres paramètres vont entrer en jeu lors de l'analyse par spectrométrie de masse comme la complexité de l'échantillon ou la complexité de la glycosylation (38,39).

Pour ces principales raisons, les stratégies couramment utilisées en analyse des glycoprotéines passent par l'enrichissement ou fractionnement des glycoprotéines pour réduire la complexité de l'échantillon ou alors par la dé-glycosylation des protéines pour réduire la complexité liée à la glycosylation afin de faciliter la caractérisation de glycoprotéines (39).

Les O-glycosylations sont des modifications post-traductionnelles ubiquitaires, fortement représentées dans les mucines. Elles sont présentes au niveau des résidus tyrosine et sérine. La méthode d'étude des sites de dé-glycosylation consiste à séparer les différents sucres des protéines par électrophorèse bidimensionnelle (2-DE) puis à réaliser une  $\beta$ -élimination alcaline des sucres, en rajoutant un nucléophile (ammoniaque,  $\text{NH}_4\text{OH}$ ). La différence de masse permet alors de détecter les glycoprotéines par spectrométrie de masse et fournit ainsi un élément stable qui reste intact durant le séquençage en MS/MS (spectrométrie de masse en tandem) (40).

## C. COMPARAISON AUX MUCINES

L'étude de la littérature nous permet d'évoquer un certain rapprochement avec le profil d'expression des mucines.

Les mucines sont des O-glycoprotéines, de structure filamenteuse et de masse moléculaire élevée. Elles sont produites par les cellules épithéliales pour assurer leur protection contre les agressions variées du milieu extérieur et pour lubrifier les lumières et les surfaces des canaux. Les mucines sécrétées forment le gel de mucus (41,42). Historiquement, ces macromolécules purifiées à partir du mucus ont été caractérisées grâce à leurs très nombreuses chaînes O-glycanniques (41). Il s'agit de séquences peptidiques riches en proline, thréonine, sérine, répétées en tandem plusieurs dizaines à plusieurs centaines de fois et capables de potentiellement lier des centaines de chaînes O-glycanniques. On observe un polymorphisme interindividuel de répétition et de mutation de ces régions. Il existe des domaines peptidiques uniques N- et C- terminaux accessibles à des ligands ou aux anticorps. L'organisation modulaire de l'axe peptidique est constituée d'une juxtaposition de domaines fonctionnels dont certains présentent de fortes similarités avec des domaines riches en cystéines déjà connus, EGF like, TGF like ou encore du pré-profacteur de Von Willebrand (vWF). L'expression cellulaire de ces mucines est typique des cellules épithéliales. La dénomination de « mucine » a pu être progressivement élargie de façon confuse à des glycoprotéines produites par d'autres types cellulaires et possédants également des propriétés d'adhérence : les mucines leucocytaires et les mucines endothéliales (41,42).

Les mucines épithéliales comportent 17 membres (MUC 1-8, MUC12, MUC13, MUC15-17, MUC19 et MUC20) et sont divisées en deux catégories, trans-membranaires et sécrétées. Les mucines endothéliales ou leucocytaires incluent CD34, CD45RA, GlyCAM-1 et PSGL-1 (CD162) (43). Les mucines endothéliales ou glycoprotéines « mucin-like » se distinguent par l'absence des domaines de répétitions ; mais ils possèdent des sites de glycosylation des résidus sérine et thréonine.

La cartographie d'expression de ces apomucines est complexe et intéresse principalement l'appareil respiratoire et le tube digestif. Les mucines membranaires ancrées dans la membrane cytoplasmique au pôle apical de très nombreux types de

cellules épithéliales non spécialisées de l'organisme constituent une barrière protectrice au-delà du glycocalyx.

Le rôle des mucines en pathologie humaine a été longuement étudié (44–48). Dans de nombreux carcinomes, la surexpression des mucines membranaires et la perte de polarité cellulaire conduisent à une expression circonférentielle de ces mucines qui déstabilise les interactions cellule-cellule (fonction d'anti-adhérence). Les anomalies de glycosylation du domaine répétitif autorisent des interactions sucres-sélectines avec les cellules endothéliales (fonction d'adhérence). Ces fonctions d'adhérence/anti-adhérence sont responsables de la dissémination métastatique. De plus, ces altérations de glycosylation génèrent de nombreux épitopes sur les chaînes d'oligosaccharides branchées, et seraient ainsi utilisables comme marqueurs diagnostique et/ou pronostique. Ces épitopes associés aux tumeurs seraient également une base prometteuse pour le développement de thérapies ciblées.

La plupart des mucines membranaires semblent être capables de lier les récepteurs erB grâce à des domaines EGF-like extracellulaires ou par interaction avec le domaine intracellulaire dans le cas de MUC1 (49) et de participer à la transduction des signaux dans la cellule épithéliale. Quelques mucines membranaires sont exprimées à la surface cellulaire de cellules hématopoïétiques (MUC1, MUC3A/B, MUC13, MUC15) et participent à la maturation de cellules de l'immunité.

Les applications au diagnostic anatomo-pathologique sont encore limitées. Elles sont cependant prometteuses, notamment en oncopathologie (42). L'expression tissulaire des apomucines dans les tissus normaux indique des variations au cours du développement et chez l'adulte. Au cours des états pathologiques et en particulier au cours de la cancérogénèse, des régulations positives et négatives entraînent des expressions différentes des gènes de mucines. Elles se traduisent par une surexpression ou par une perte d'expression, parfois par une expression aberrante, ou comme résurgence de phénotypes embryonnaire ou foetal.

Les dérégulations de gènes MUC associées aux proliférations tumorales constituent des marqueurs originaux et précoces de tumorigénèse. Certains anticorps dirigés contre des mucines servent de base au développement de thérapies ciblées. La surexpression des mucines transmembranaires dans les cancers humains en fait des cibles intéressantes pour le développement de vaccins, anticorps ou inhibiteurs (50–55).

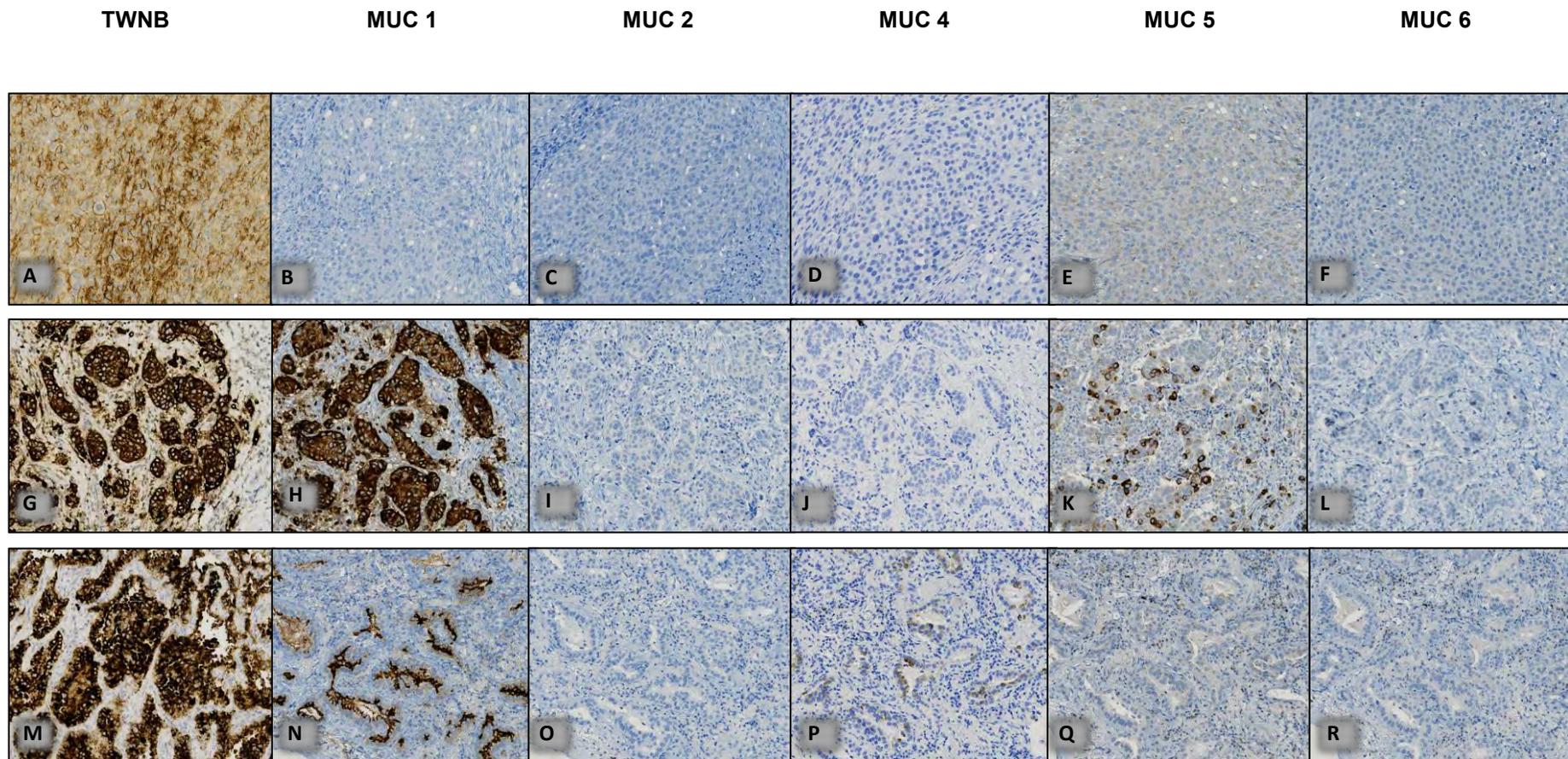
Dans les cancers du sein, il a été démontré que l'expression aberrante de certaines mucines (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC et MUC6) est associée à un mauvais pronostic, une évolutivité locale plus agressive et un risque majoré d'invasion ganglionnaire (28,56,57). Plusieurs immunothérapies ciblant MUC1 ont démontré leur efficacité dans les cancers du sein, et sont en cours d'essais cliniques prometteurs (52,58–61).

La surexpression de MUC4, en masquant le domaine de liaison antigénique du trastuzumab sur HER2 (domaine IV), pourrait être responsable de résistance à cette thérapie ciblée (62). Hors nous observons un lien significatif entre TWNB et le statut HER2+. Si l'antigène reconnu par TWNB présente un comportant similaire à MUC4, sa surexpression serait alors également un facteur de résistance aux anti-HER2. La mise en évidence de sa surexpression serait ainsi un facteur prédictif de résistance à ces thérapies ciblées. Là encore une étude statistique sur une large série de cancers du sein HER2 amplifiés sera nécessaire pour affirmer ces hypothèses.

Il serait de même intéressant de réaliser cette étude sur d'autres carcinomes présentant une amplification du gène HER2 (carcinomes gastriques, vésicaux ou pulmonaires)

Le profil d'expression de l'antigène reconnu par TWNB mis en évidence dans notre travail dans les tissus normaux et dans les tumeurs épithéliales apparaît donc proche de celui des mucines, notamment dans le cas des cancers du sein. Cependant, il ne se calque parfaitement sur aucun des profils de mucines décrits jusqu'à présent, sachant que l'expression constatée au niveau des mélanomes n'est décrite pour aucune mucines connues (43).

La nature de l'antigène reconnu par TWNB doit être précisée. L'étude de protéomique reste à ce jour sans résultat satisfaisant. La caractérisation de l'antigène reconnu par TWNB est complexe. Des analyses complémentaires seront nécessaires, s'appuyant sur le modèle des apomucines. En effet si l'antigène reconnu par TWNB se rapproche des apomucines, il s'agirait alors d'une glycoprotéine de très grande taille et fortement glycosylée, expliquant les difficultés rencontrées à sa caractérisation protéinique.



**Figure 28: Comparaison entre le marquage TWNB et celui des mucines**

**A à F :** Mélanome avec expression uniquement de TWNB,

**G à L :** Carcinome canalaire infiltrant du sein avec expression comparable de TWNB et MUC1. Positivité hétérogène de MUC5,

**M à R :** Adénocarcinome pulmonaire avec expression intense de TWNB, expression faible et hétérogène de MUC4 et expression luminal de MUC1.

## **D. PERSPECTIVES**

### **1. Aspect diagnostique**

L'intérêt diagnostique apparaît limité pour notre anticorps monoclonal. En effet il est peu spécifique avec une réactivité croisée entre des tumeurs mélanocytaires et épithéliales malignes de primitifs différents. Il pourrait cependant avoir sa place dans le diagnostic différentiel entre les sarcomes versus les mélanomes et les carcinomes sarcomatoïdes.

La sensibilité diagnostique est également limitée. La réactivité est variable et il existe une certaine hétérogénéité intra tumorale. L'analyse statistique réalisée sur les deux cohortes de carcinomes mammaires démontre un lien significatif un statut HER2 enrichi (HER2+, RH-). Il reste à définir l'intérêt diagnostique de cette observation.

### **2. Aspect pronostique**

L'étude statistique sur une large série de 427 carcinomes mammaires a permis de mettre en évidence un lien significatif entre la positivité du marquage TWNB et plusieurs critères d'agressivité tumorale et le statut HER enrichi. Il n'a cependant été pas été mis en évidence de corrélation significative avec la survie sans métastase ou la survie globale. Ceci peut s'expliquer par le biais lié à HER2. En effet, les tumeurs avec amplification de HER2 sont spontanément de très mauvais pronostic. Mais les thérapeutiques ciblées (par exemple Herceptine) effacent ce mauvais pronostic. Comme l'expression de l'antigène reconnu par TWNB est corrélée à la surexpression de HER2, la prise en charge thérapeutique spécifique de ces tumeurs peut biaiser l'aspect prédictif de TWNB. Il sera intéressant d'étudier TWNB dans une série plus importante de cancers du sein HER2+.

De plus, comme discuté précédemment, il sera également intéressant d'évaluer le rôle prédictif de la surexpression de TWNB dans la résistance aux anti-HER2, à l'instar de MUC4 (62).

### **3. Aspect thérapeutique**

L'intérêt thérapeutique de TWNB semble prometteur. La localisation membranaire extracellulaire et l'intense positivité de notre anticorps dans les nombreuses tumeurs épithéliales précédemment citées et les mélanomes s'opposent à la relative négativité des tissus sains. Cependant la positivité immunohistochimique

des capillaires rénaux et surrénaux et des alvéoles pulmonaires soulève le problème d'une possible mauvaise tolérance d'un traitement immunoconjugué. L'expérimentation animale et des études de pharmacodynamie approfondies préciseront ces points.

## **E. ORGANISATION ET STANDARDISATION DE LA CARACTERISATION D'UN ANTICORPS.**

La caractérisation d'un nouvel anticorps monoclonal nécessite des étapes incontournables comme le test de la réactivité sur tissus humains, sains et pathologiques. L'utilisation de tissus humains doit se faire dans le respect des droits du patient et de la réglementation en vigueur. Elle nécessite ainsi le recueil de l'accord écrit des patients concernés. Ce recueil de consentement s'effectue de préférence en amont de la chirurgie, idéalement par le chirurgien lors d'une consultation pré-opératoire. A défaut, il peut être obtenu à posteriori avant utilisation du tissu.

Outre la caractérisation en protéomique de l'antigène reconnu, la réactivité tissulaire d'un anticorps s'évalue par immunohistochimie sur coupes tissulaires. La caractérisation d'un nouvel anticorps doit être la plus exhaustive possible. Il est donc utile de disposer d'une large variété de tissus humains et murins, normaux, tumoraux bénins et malins, ainsi que de tissus porteurs de pathologies non tumorales (inflammatoires, infectieuses...). Les tissus doivent être représentatifs de la population globale (âges, ethnies, sexe, co-morbidités...).

Au cours de notre travail, les tissus sains humains et murins ont été regroupés sous forme de blocs multi-tissulaires. Les tissus normaux humains ont été recueillis dans le cadre des collections déclarées par l'Institut Claudius Regaud. Des prélèvements de 3 mm de diamètre ont été réalisés sur chaque organe et regroupés par système au sein de différents blocs de paraffine.

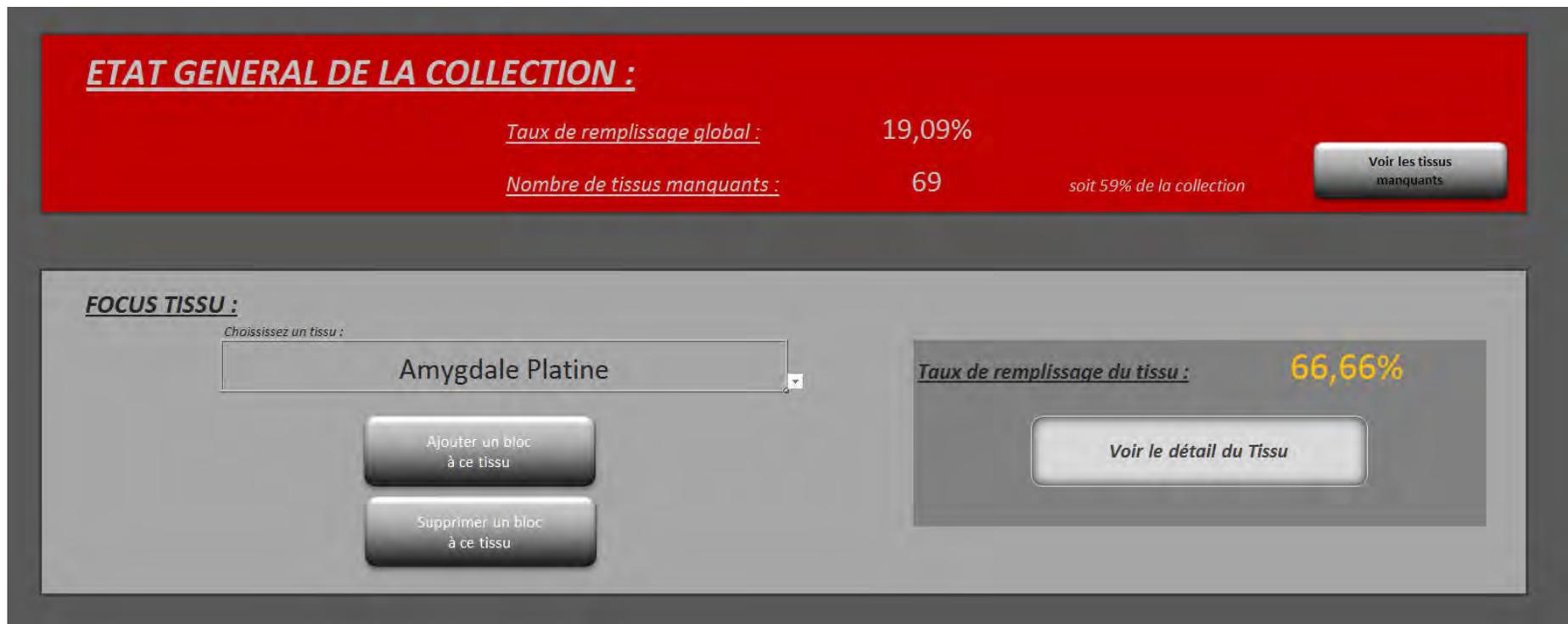
Les pathologies tumorales mammaires, ORL, cutanées, gynécologiques et des tissus mous proviennent des collections déclarées par l'Institut Claudius Regaud. Dans un souci d'exhaustivité, les pathologies autres ou plus rarement rencontrés en routine ont été recueillis à partir des archives du laboratoire (Anatomie et Cytologie Pathologiques, IUCT-Oncopole Toulouse).

La mise en œuvre à plus grande échelle de la caractérisation d'anticorps monoclonaux nécessiterait la constitution et la déclaration d'une très large collection multi-tissulaire et la confection de blocs TMA adaptés (63).

Les collections tissulaires sont précieuses et leur mise à disposition est un atout indéniable pour le développement de nouveaux anticorps monoclonaux. La constitution et maintien de telles collections passent par la réalisation régulée de nouveaux prélèvements. Il s'agit un travail fastidieux mais indispensable qu'il faudra structurer.

Le suivi de l'état d'une telle collection devra être facilité par la création d'un tableau de bord faisant état des tissus disponibles et/ou manquants. Il faudra y associer un fichier tableur de saisie des résultats pour les anticorps testés. Ce tableur standardisé permettra :

- de garder la mémoire centralisée de la réactivité des anticorps testés,
- de comparer les différents anticorps produits (ex : plusieurs clones dirigés contre la même protéine),
- d'avoir une estimation du niveau de consommation du matériel tissulaire.



**Figure 29: Exemple de tableau de bord d'aide à la gestion d'une collection multi-tissulaire (STHAL O.)**

- Visualisation de l'état de remplissage de la collection.
- Possibilité de visualiser une liste actualisée des tissus manquants.
- Simplicité d'ajout, de retrait ou de visualisation des informations (date de rentrée, n° identification,..) d'un bloc tissulaire.

# **CONCLUSION**

Notre travail a porté sur la caractérisation d'un nouvel anticorps monoclonal TWNB 10.7, développé par xénogreffe murine de la lignée TW12 de mélanome.

L'étude de la réactivité immunohistochimique a été réalisée sur une large variété de tissus normaux et pathologiques. Il existe à l'état normal un marquage limité aux sécrétions et au pôle apical membranaire des cellules épithéliales des muqueuses et des diverses glandes et structures canalaire. On note également un marquage de certains éléments leucocytaires et, de manière plus inattendue, un marquage endothélial limité à la microcirculation capillaire du rein et de la surrénale.

L'étude des tissus tumoraux révèle une positivité membranaire et/ou cytoplasmique de près de la moitié des mélanomes examinés. Mais nous avons également mis en évidence une réactivité membranaire et/ou cytoplasmique significative dans de nombreux carcinomes broncho-pulmonaires, mammaires et colorectaux. Nous avons constaté de plus une positivité sur des carcinomes pancréatiques et urothéliaux. Nous notons enfin une conservation du marquage de la microcirculation capillaire au niveau du phéochromocytome et des carcinomes rénaux étudiés. A l'avenir, la réactivité de TWNB sur ces différents types de tumeurs devra être précisée sur de plus larges séries de cas et corrélée aux données cliniques et histologiques.

Notre étude s'est ici focalisée sur l'étude immunohistochimique comparative dans les cancers du sein. Nous avons mis en évidence un lien significatif entre un marquage TWNB et plusieurs facteurs histologiques d'agressivité tumorale et un statut immuno-phénotypique HER+, RH- (type moléculaire HER2 enrichi). Cependant, nous n'avons pas été mis en évidence d'impact significatif sur la survie sans métastase ou la survie globale dans les cohortes étudiées. Ceci peut s'expliquer par le biais lié à HER2. Comme l'expression de l'antigène reconnu par TWNB est corrélée à la surexpression de HER2, la prise en charge thérapeutique spécifique de ces tumeurs par anti-HER2 peut biaiser l'aspect prédictif de TWNB. Il sera intéressant d'étudier TWNB dans une série plus importante de cancers du sein HER2+.

Aux vues des dernières constatations et de l'étude de la littérature, nous avons constaté de nombreuses similitudes avec le profil d'expression des mucines (MUC). Les mucines constituent une large famille de glycoprotéines membranaires et sécrétées (MUC1 à MUC21) et dont la surexpression dans les proliférations épithéliales malignes jouerait un rôle dans la propagation tumorale et la

dissémination métastatique. Il n'a cependant pas été décrit à ce jour de mucine surexprimée au niveau des mélanomes.

Il sera également intéressant d'évaluer le rôle prédictif de la surexpression de TWNB dans résistance aux anti-HER2, à l'instar de MUC4 (62). Des études sur de grandes séries de carcinomes surexprimant HER2 (Carcinomes mammaires, gastriques et vésicaux, par exemple) seront menées.

La caractérisation protéomique de l'antigène reconnu par cet anticorps n'a pas pu être précisée à ce jour. Nous poursuivons actuellement ce travail d'identification de la protéine cible de TWNB. Celle-ci pourrait être d'un grand intérêt pour le développement de nouvelles thérapies ciblées en cancérologie, au vue de la qualité, de la distribution et de l'étendue des immunomarquages observés. Malgré tout, la positivité immunohistochimique des capillaires rénaux et surrénaux soulève le problème d'une mauvaise tolérance d'un potentiel traitement immunoconjugué. L'expérimentation animale et des études de pharmacodynamie approfondies préciseront ces points.

La caractérisation d'anticorps monoclonaux à plus grande échelle nécessitera la constitution et la déclaration d'une très large collection multi-tissulaire et la confection de blocs TMA adaptés. La constitution et maintien d'une telle collection est un travail fastidieux mais indispensable qu'il faudra structurer. La création d'un tableau de bord d'aide à la gestion d'une collection multi-tissulaire, comme réalisé dans notre travail, constitue une première étape organisationnelle.

Vu permis d'imprimer  
Le Doyen de la Faculté  
de Médecine Purpan

J.P. VINEL



Vu le 2/5/2015  
Professeur Pierre BROUSSET  
Chef de Service  
Département d'Anatomie et Cytologie Pathologiques  
INSTITUT UNIVERSITAIRE DU CANCER  
1 avenue Irène Joliot-Curie  
31059 TOULOUSE CEDEX 9  
Tél. 05 31 15 61 41



## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

1. Goldmacher VS, Kovtun YV. Antibody-drug conjugates: using monoclonal antibodies for delivery of cytotoxic payloads to cancer cells. *Ther Deliv.* mars 2011;2(3):397-416.
2. Allard B. Production et caractérisation d'anticorps polyclonaux et monoclonaux ciblant les récepteurs des endothélines en vue d'une immunothérapie des cancers. Université Paris-Sud – Paris XI; 2012.
3. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* févr 2010;125(2 Suppl 2):S41-52.
4. Beck A, Wagner-Rousset E, Wurch T, Corvaia N. Therapeutic antibodies and related products: choosing the right structure for success. *Médecine Sci MS.* déc 2009;25(12):1024-32.
5. Abès R, Dutertre C-A, Teillaud J-L. Antibodies: better knowledge for a better use. *Médecine Sci MS.* déc 2009;25(12):1011-9.
6. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 7 août 1975;256(5517):495-7.
7. Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood.* 1 janv 2004;103(1):275-82.
8. Roux Émile, Martin Louis « Contribution à l'étude de la diphtérie » *Annales de l'Institut Pasteur* 1888;2(12):629-661.
9. Schneider CK. Monoclonal antibodies--regulatory challenges. *Curr Pharm Biotechnol.* déc 2008;9(6):431-8.
10. Miller RA, Maloney DG, Warnke R, Levy R. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med.* 4 mars 1982;306(9):517-22.
11. Maloney DG, Liles TM, Czerwinski DK, Waldichuk C, Rosenberg J, Grillo-Lopez A, et al. Phase I clinical trial using escalating single-dose infusion of chimeric anti-CD20 monoclonal antibody (IDEC-C2B8) in patients with recurrent B-cell lymphoma. *Blood.* 15 oct 1994;84(8):2457-66.
12. Mistretta VI, Cavalier E, Collette J, Chapelle JP. Production of monoclonal antibodies. *Rev Médicale Liège.* juin 2009;64(5-6):248-52.

13. Weiner LM, Surana R, Wang S. Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. *Nat Rev Immunol.* mai 2010;10(5):317-27.
14. Iyer U, Kadambi VJ. Antibody drug conjugates - Trojan horses in the war on cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods.* déc 2011;64(3):207-12.
15. Ducry L, Stump B. Antibody-drug conjugates: linking cytotoxic payloads to monoclonal antibodies. *Bioconjug Chem.* janv 2010;21(1):5-13.
16. Harlow Ed, Lane D. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold Spring Harbor Laboratory. 1988. In.
17. Saati T Al, Blancher A, Calvas P, Neulat-Duga I, Delsol G. Production of monoclonal antibodies using spleen cells from nude mice bearing human tumors. *Ann Pathol.* 1987;7(1):1-8.
18. Saati T al, Caspar S, Brousset P, Chittal S, Caverivière P, Hounieu H, et al. Production of anti-B monoclonal antibodies (DBB.42, DBA.44, DNA.7, and DND.53) reactive on paraffin-embedded tissues with a new B-lymphoma cell line grafted into athymic nude mice. *Blood.* 15 nov 1989;74(7):2476-85.
19. Friedrichs K, Gluba S, Eidtmann H, Jonat W. Overexpression of p53 and prognosis in breast cancer. *Cancer.* 15 déc 1993;72(12):3641-7.
20. Remmele W, Stegner HE. [Recommendation for uniform definition of an immunoreactive score (IRS) for immunohistochemical estrogen receptor detection (ER-ICA) in breast cancer tissue]. *Pathol.* mai 1987;8(3):138-40.
21. Kempowsky-Hamon T, Valle C, Lacroix-Triki M, Hedjazi L, Trouilh L, Lamarre S, et al. Fuzzy logic selection as a new reliable tool to identify molecular grade signatures in breast cancer--the INNODIAG study. *BMC Med Genomics.* 2015;8:3.
22. Cammas A, Lacroix-Triki M, Pierredon S, Lacovoni J, Teulade-Fichou M-P, Favre G, et al. hnRNP A1-mediated translational regulation of the G quadruplex-containing RON receptor tyrosine kinase mRNA linked to tumour progression. (article soumis).
23. Guérin S, Doyon F, Hill C. [The frequency of cancer in France in 2006, mortality trends since 1950, incidence trends since 1980 and analysis of the discrepancies between these trends]. *Bull Cancer (Paris).* janv 2009;96(1):51-7.
24. Gupta GP, Massagué J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 17 nov 2006;127(4):679-95.
25. Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med.* 25 déc 2008;359(26):2814-23.

26. Nguyen DX, Bos PD, Massagué J. Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer*. avr 2009;9(4):274-84.
27. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*. 25 mars 2011;331(6024):1559-64.
28. Rakha EA, El-Sayed ME, Lee AHS, Elston CW, Grainge MJ, Hodi Z, et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 juill 2008;26(19):3153-8.
29. Sant M, Allemani C, Berrino F, Coleman MP, Aareleid T, Chaplain G, et al. Breast carcinoma survival in Europe and the United States. *Cancer*. 15 févr 2004;100(4):715-22.
30. Le Guellec S, Perallon R, Alunni J-P, Charitansky H, Leaha C, Gonzalez AM, et al. [Neoadjuvant treatment of breast cancer: implications for the pathologist]. *Ann Pathol*. déc 2011;31(6):442-54.
31. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS, Gelber RD, Piccart-Gebhart M, Thürlimann B, et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. sept 2013;24(9):2206-23.
32. Mook S, Schmidt MK, Viale G, Pruneri G, Eekhout I, Floore A, et al. The 70-gene prognosis-signature predicts disease outcome in breast cancer patients with 1-3 positive lymph nodes in an independent validation study. *Breast Cancer Res Treat*. juill 2009;116(2):295-302.
33. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. juill 2000;124(7):966-78.
34. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. oct 2005;16(10):1569-83.
35. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. nov 1991;19(5):403-10.
36. Lacroix-Triki M. Dérégulation de l'épissage des pré-ARNm dans la progression métastatique des cancers du sein. Université de Toulouse 3 Paul Sabatier; 2015.
37. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clin Cancer Res*. 15 août 2004;10(16):5367-74.

38. Haslam SM, North SJ, Dell A. Mass spectrometric analysis of N- and O-glycosylation of tissues and cells. *Curr Opin Struct Biol.* oct 2006;16(5):584-91.
39. Pasing Y, Sickmann A, Lewandrowski U. N-glycoproteomics: mass spectrometry-based glycosylation site annotation. *Biol Chem.* avr 2012;393(4):249-58.
40. Holland JW, Deeth HC, Alewood PF. Analysis of O-glycosylation site occupancy in bovine kappa-casein glycoforms separated by two-dimensional gel electrophoresis. *Proteomics.* mars 2005;5(4):990-1002.
41. Porchet N, Buisine MP, Desseyn JL, Moniaux N, Nollet S, Degand P, et al. [MUC genes: a superfamily of genes? Towards a functional classification of human apomucins]. *J Société Biol.* 1999;193(1):85-99.
42. Kufe DW. Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat Rev Cancer.* déc 2009;9(12):874-85.
43. Chakraborty S, Bonthu N, Swanson BJ, Batra SK. Role of mucins in the skin during benign and malignant conditions. *Cancer Lett.* 28 févr 2011;301(2):127-41.
44. Moniaux N, Escande F, Porchet N, Aubert JP, Batra SK. Structural organization and classification of the human mucin genes. *Front Biosci J Virtual Libr.* 1 oct 2001;6:D1192-206.
45. Gendler SJ, Spicer AP. Epithelial mucin genes. *Annu Rev Physiol.* 1995;57:607-34.
46. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer.* janv 2004;4(1):45-60.
47. Mantelli F, Argüeso P. Functions of ocular surface mucins in health and disease. *Curr Opin Allergy Clin Immunol.* oct 2008;8(5):477-83.
48. Senapati S, Sharma P, Bafna S, Roy HK, Batra SK. The MUC gene family: their role in the diagnosis and prognosis of gastric cancer. *Histol Histopathol.* déc 2008;23(12):1541-52.
49. Gendler SJ. MUC1, the renaissance molecule. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* juill 2001;6(3):339-53.
50. Barratt-Boyes SM, Vlad A, Finn OJ. Immunization of chimpanzees with tumor antigen MUC1 mucin tandem repeat peptide elicits both helper and cytotoxic T-cell responses. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* juill 1999;5(7):1918-24.
51. Julien S, Picco G, Sewell R, Vercoutter-Edouart A-S, Tarp M, Miles D, et al. Sialyl-Tn vaccine induces antibody-mediated tumour protection in a relevant murine model. *Br J Cancer.* 2 juin 2009;100(11):1746-54.

52. Mukherjee P, Pathangey LB, Bradley JB, Tinder TL, Basu GD, Akporiaye ET, et al. MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model. *Vaccine*. 19 févr 2007;25(9):1607-18.
53. Chen X, Gao W, Gambotto A, Finn OJ. Lentiviral vectors encoding human MUC1-specific, MHC-unrestricted single-chain TCR and a fusion suicide gene: potential for universal and safe cancer immunotherapy. *Cancer Immunol Immunother CII*. juin 2009;58(6):977-87.
54. Reinartz S, Hombach A, Köhler S, Schlebusch H, Wallwiener D, Abken H, et al. Interleukin-6 fused to an anti-idiotypic antibody in a vaccine increases the specific humoral immune response against CA125+ (MUC-16) ovarian cancer. *Cancer Res*. 15 juin 2003;63(12):3234-40.
55. Xu Y, Zhang L, Hu G. Potential application of alternatively glycosylated serum MUC1 and MUC5AC in gastric cancer diagnosis. *Biol J Int Assoc Biol Stand*. janv 2009;37(1):18-25.
56. Luna-Moré S, Rius F, Weil B, Jimenez A, Bautista MD, Pérez-Mellado A. EMA: a differentiation antigen related to node metastatic capacity of breast carcinomas. *Pathol Res Pract*. 2001;197(6):419-25.
57. Workman HC, Miller JK, Ingalla EQ, Kaur RP, Yamamoto DI, Beckett LA, et al. The membrane mucin MUC4 is elevated in breast tumor lymph node metastases relative to matched primary tumors and confers aggressive properties to breast cancer cells. *Breast Cancer Res BCR*. 2009;11(5):R70.
58. von Mensdorff-Pouilly S, Verstraeten AA, Kenemans P, Snijdwint FG, Kok A, Van Kamp GJ, et al. Survival in early breast cancer patients is favorably influenced by a natural humoral immune response to polymorphic epithelial mucin. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. févr 2000;18(3):574-83.
59. Blixt O, Buetti D, Burford B, Allen D, Julien S, Hollingsworth M, et al. Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast Cancer Res BCR*. 2011;13(2):R25.
60. Abdel-Aal A-BM, Lakshminarayanan V, Thompson P, Supekar N, Bradley JM, Wolfert MA, et al. Immune and anticancer responses elicited by fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccines modified by a TLR2 or TLR9 agonist. *Chembiochem Eur J Chem Biol*. 7 juill 2014;15(10):1508-13.
61. Mohebtash M, Tsang K-Y, Madan RA, Huen N-Y, Poole DJ, Jochems C, et al. A pilot study of MUC-1/CEA/TRICOM poxviral-based vaccine in patients with metastatic breast and ovarian cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 nov 2011;17(22):7164-73.

62. Nagy P, Friedländer E, Tanner M, Kapanen AI, Carraway KL, Isola J, et al. Decreased accessibility and lack of activation of ErbB2 in JIMT-1, a herceptin-resistant, MUC4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Res.* 15 janv 2005;65(2):473-82.
63. Smith NR, Womack C. A matrix approach to guide IHC-based tissue biomarker development in oncology drug discovery. *J Pathol.* janv 2014;232(2):190-8.

## **CARACTERISATION D'UN NOUVEL ANTICORPS MONOCLONAL, TWNB**

Soutenue à Toulouse le 9 octobre 2015

---

### **RESUME :**

Notre travail a porté sur la caractérisation d'un nouvel anticorps monoclonal TWNB 10.7, développé par xéno greffe murine d'une lignée cellulaire de mélanome. L'étude de la réactivité immunohistochimique a été réalisée sur une large variété de tissus normaux et pathologiques. TWNB présente un marquage intense dans les mélanomes et divers carcinomes. L'étude immunohistochimique comparative dans les cancers du sein a été approfondie. Elle montre une corrélation entre la surexpression de TWNB et des facteurs d'agressivité tumorale et notamment l'amplification de HER2. La caractérisation protéomique n'a pas pu encore identifier la cible antigénique de TWNB, les investigations complémentaires sont en cours. Cet anticorps pourrait être un candidat d'intérêt pour le développement d'une nouvelle thérapie ciblée.

---

**TITRE EN ANGLAIS:** Characterization of a new monoclonal antibody, TWNB

---

**DISCIPLINE ADMINISTRATIVE :** Médecine spécialisée clinique

---

**MOTS-CLÉS :** anticorps monoclonal, immunohistochimie, biomarqueur, cancer du sein, HER2, thérapie ciblée

---

### **INTITULÉ ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE :**

Université Toulouse III-Paul Sabatier  
Faculté de médecine Toulouse-Purpan,  
37 Allées Jules Guesde 31000 Toulouse

---

**Directeur de thèse :** Dr Philippe ROCHAIX

