

ANNÉE 2015

2015 TOU3 1600

THÈSE

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

Présentée et soutenue publiquement

par

Romain PERALLON

le 12 Octobre 2015

ETUDE DE L'EXPRESSION IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE PD1, CD8
ET DE DIFFERENTS CLONES DE PDL1, DANS LES THYMOMES B3
ET LES CARCINOMES THYMIQUES.

Directeur de thèse : Docteur Isabelle ROUQUETTE

JURY

| | |
|---|---------------|
| Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET | Président |
| Monsieur le Professeur Julien MAZIERES | Assesseur |
| Madame le Professeur Emmanuelle URO-COSTE | Assesseur |
| Madame le Professeur Monique COURTADE | Assesseur |
| Madame le Docteur Isabelle ROUQUETTE | Suppléant |
| Madame le Docteur Eliane MERY | Membre invité |



**TABLEAU du PERSONNEL HU
des Facultés de Médecine de l'Université Paul Sabatier
au 1^{er} 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. CLAUD | 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. FORTANIER 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 CONTÉ | 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 |

| P.U. - P.H. Classe Exceptionnelle et 1 ^{ère} classe | | P.U. - P.H. 2 ^{ème} classe | |
|--|---|---|---------------------------------------|
| M. ADOUE D. | Médecine Interne, Gériatrie | Mme BEYNE-RAUZY O. | Médecine Interne |
| M. AMAR J. | Thérapeutique | M. BIRMES Ph. | Psychiatrie |
| M. ATTAL M. (C.E) | Hématologie | M. BROUCHET L. | Chirurgie thoracique et cardio-vascul |
| M. AVET-LOISEAU H | Hématologie, transfusion | M. BUREAU Ch | Hépatogastro-Entéro |
| M. BLANCHER A. | Immunologie (option Biologique) | M. CALVAS P. | Génétique |
| M. BONNEVIALLE P. | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie | M. CARRERE N. | Chirurgie Générale |
| M. BOSSAVY J.P. | Chirurgie Vasculaire | Mme CASPER Ch. | Pédiatrie |
| M. BRASSAT D. | Neurologie | M. CHAIX Y. | Pédiatrie |
| M. BROUSSET P. (C.E) | Anatomie pathologique | Mme CHARPENTIER S. | Thérapeutique, méd. d'urgence, addict |
| M. BUGAT R. (C.E) | <i>Cancérologie</i> | M. COGNARD C. | Neuroradiologie |
| M. CARRIE D. | Cardiologie | M. DE BOISSEZON X. | Médecine Physique et Réadapt Fonct. |
| M. CHAP H. (C.E) | Biochimie | M. FOURNIE B. | Rhumatologie |
| M. CHAUVEAU D. | Néphrologie | M. FOURNIÉ P. | Ophthalmologie |
| M. CHOLLET F. (C.E) | Neurologie | M. GAME X. | Urologie |
| M. CLANET M. (C.E) | Neurologie | M. GEERAERTS T. | Anesthésiologie et réanimation chir. |
| M. DAHAN M. (C.E) | Chirurgie Thoracique et Cardiaque | Mme GENESTAL M. | Réanimation Médicale |
| M. DEGUINE O. | O. R. L. | M. LAROCHE M. | Rhumatologie |
| M. DUCOMMUN B. | Cancérologie | M. LAUWERS F. | Anatomie |
| M. FERRIERES J. | Epidémiologie, Santé Publique | M. LEOBON B. | Chirurgie Thoracique et Cardiaque |
| M. FOURCADE O. | Anesthésiologie | M. MAZIERES J. | Pneumologie |
| M. FRAYSSE B. (C.E) | O.R.L. | M. MOLINIER L. | Epidémiologie, Santé Publique |
| M. IZOPET J. (C.E) | Bactériologie-Virologie | M. OLIVOT J-M | Neurologie |
| Mme LAMANT L. | Anatomie Pathologique | M. PARANT O. | Gynécologie Obstétrique |
| M. LANG T. | Biostatistique Informatique Médicale | M. PARIENTE J. | Neurologie |
| M. LANGIN D. | Nutrition | M. PATHAK A. | Pharmacologie |
| M. LAUQUE D. (C.E) | Médecine Interne | M. PAUL C. | Dermatologie |
| M. LIBLAU R. (C.E) | Immunologie | M. PAYOUX P. | Biophysique |
| M. MAGNAVAL J.F. | Parasitologie | M. PAYRASTRE B. | Hématologie |
| M. MALAVALD B. | Urologie | M. PORTIER G. | Chirurgie Digestive |
| M. MANSAT P. | Chirurgie Orthopédique | M. PERON J.M. | Hépatogastro-Entérologie |
| M. MARCHOU B. | Maladies Infectieuses | M. RONCALLI J. | Cardiologie |
| M. MONROZIES X. | Gynécologie Obstétrique | M. SANS N. | Radiologie |
| M. MONTASTRUC J.L. (C.E) | Pharmacologie | Mme SAVAGNER F. | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. MOSCOVICI J. | Anatomie et Chirurgie Pédiatrique | Mme SELVES J. | Anatomie et cytologie pathologiques |
| Mme MOYAL E. | Cancérologie | M. SOL J-Ch. | Neurochirurgie |
| Mme NOURHASHEMI F. | Gériatrie | | |
| M. OLIVES J.P. (C.E) | Pédiatrie | P.U. | |
| M. OSWALD E. | Bactériologie-Virologie | M. OUSTRIC S. | Médecine Générale |
| M. PARINAUD J. | Biol. du Dévelop. et de la Reprod. | | |
| M. PERRET B (C.E) | Biochimie | | |
| M. PRADERE B. (C.E) | Chirurgie générale | | |
| M. RASCOL O. | Pharmacologie | | |
| M. RECHER Ch. | Hématologie | | |
| M. RISCHMANN P. (C.E) | Urologie | | |
| M. RIVIERE D. (C.E) | Physiologie | | |
| M. SALES DE GAUZY J. | Chirurgie Infantile | | |
| M. SALLES J.P. | Pédiatrie | | |
| M. SERRE G. (C.E) | Biologie Cellulaire | | |
| M. TELMON N. | Médecine Légale | | |
| M. VINEL J.P. (C.E) | Hépatogastro-Entérologie | | |

Professeur Associé de Médecine Générale
Dr. MESTHÉ P.

| P.U. - P.H. | | P.U. - P.H. | |
|--|---|-------------------------------|--|
| Classe Exceptionnelle et 1^{ère} classe | | 2^{ème} classe | |
| M. ACAR Ph. | Pédiatrie | M. ACCADBLE F. | Chirurgie Infantile |
| M. ALRIC L. | Médecine Interne | Mme ANDRIEU S. | Epidémiologie |
| M. ARLET Ph. (C.E) | Médecine Interne | M. ARBUS Ch. | Psychiatrie |
| M. ARNAL J.F. | Physiologie | M. BERRY A. | Parasitologie |
| Mme BERRY I. | Biophysique | M. BONNEVILLE F. | Radiologie |
| M. BOUTAULT F. (C.E) | Stomatologie et Chirurgie Maxillo-Faciale | M. BUJAN L. | Uro-Andrologie |
| M. BUSCAIL L. | Hépatogastro-Entérologie | Mme BURA-RIVIERE A. | Médecine Vasculaire |
| M. CANTAGREL A. | Rhumatologie | M. CHAYNES P. | Anatomie |
| M. CARON Ph. (C.E) | Endocrinologie | M. CHAUFOUR X. | Chirurgie Vasculaire |
| M. CHAMONTIN B. (C.E) | Thérapeutique | M. CONSTANTIN A. | Rhumatologie |
| M. CHAVOIN J.P. (C.E) | Chirurgie Plastique et Reconstructive | M. DELOBEL P. | Maladies Infectieuses |
| M. CHIRON Ph. | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie | Mme DULY-BOUHANICK B. | Thérapeutique |
| Mme COURTADE SAIDI M. | Histologie Embryologie | M. COURBON | Biophysique |
| M. DELABESSE E. | Hématologie | M. DAMBRIN C. | Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire |
| Mme DELISLE M.B. (C.E) | Anatomie Pathologie | M. DECRAMER S. | Pédiatrie |
| M. DIDIER A. | Pneumologie | M. DELORD JP. | Cancérologie |
| M. ELBAZ M. | Cardiologie | M. GALINIER Ph. | Chirurgie Infantile |
| M. GALINIER M. | Cardiologie | M. GARRIDO-STÖWHAS I. | Chirurgie Plastique |
| M. GERAUD G. | Neurologie | Mme GOMEZ-BROUCHET A. | Anatomie Pathologique |
| M. GLOCK Y. | Chirurgie Cardio-Vasculaire | M. GROLLEAU RAOUX J.L. | Chirurgie plastique |
| M. GOURDY P. | Endocrinologie | Mme GUIMBAUD R. | Cancérologie |
| M. GRAND A. (C.E) | Epidémiologie, Eco. de la Santé et Prévention | M. HUYGHE E. | Urologie |
| Mme HANAIRE H. (C.E) | Endocrinologie | M. LAFOSSE JM. | Chirurgie Orthopédique et Traumatologie |
| M. KAMAR N. | Néphrologie | M. LEGUEVAQUE P. | Chirurgie Générale et Gynécologique |
| M. LARRUE V. | Neurologie | M. MARCHEIX B. | Chirurgie thoracique et cardiovasculaire |
| M. LAURENT G. (C.E) | Hématologie | M. MARQUE PH. | Médecine Physique et Réadaptation |
| M. LEVADE T. | Biochimie | Mme MAZEREEUW J. | Dermatologie |
| M. MALECAZE F. (C.E) | Ophthalmologie | M. MINVILLE V. | Anesthésiologie Réanimation |
| Mme MARTY N. | Bactériologie Virologie Hygiène | M. MUSCARI F. | Chirurgie Digestive |
| M. MASSIP P. | Maladies Infectieuses | M. OTAL Ph. | Radiologie |
| M. PLANTE P. | Urologie | M. ROLLAND Y. | Gériatrie |
| M. RAYNAUD J-Ph. | Psychiatrie Infantile | M. ROUX F.E. | Neurochirurgie |
| M. RITZ P. | Nutrition | M. SAILLER L. | Médecine Interne |
| M. ROCHE H. (C.E) | Cancérologie | M. SOULAT J.M. | Médecine du Travail |
| M. ROSTAING L (C.E). | Néphrologie | M. TACK I. | Physiologie |
| M. ROUGE D. (C.E) | Médecine Légale | M. VAYSSIERE Ch. | Gynécologie Obstétrique |
| M. ROUSSEAU H. | Radiologie | M. VERGEZ S. | O.R.L. |
| M. SALVAYRE R. (C.E) | Biochimie | Mme URO-COSTE E. | Anatomie Pathologique |
| 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) | Gériatrie | | |

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. | Génétique |
| Mme BONGARD V. | Epidémiologie |
| Mme CASPAR BAUGUIL S. | Nutrition |
| Mme CASSAING S. | Parasitologie |
| Mme CONCINA D. | Anesthésie-Réanimation |
| M. CONGY N. | Immunologie |
| Mme COURBON | 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 I. | Biochimie |
| Mme GENOUX A. | Biochimie et biologie moléculaire |
| M. HAMDI 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 SIFONTES S. | Réanimation |
| M. SOLER V. | Ophtalmologie |
| M. TAFANI J.A. | Biophysique |
| M. TREINER E. | Immunologie |
| Mme TREMOLLIERES 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. | Bactério. 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. | Génétique |
| Mme CLAVE D. | Bactériologie Virologie |
| M. CLAVEL C. | Biologie Cellulaire |
| Mme COLLIN L. | Cytologie |
| M. CORRE J. | Hématologie |
| M. DEDOIT 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 GRARE 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 PERIQUET 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 ABITTEBOUL Y. | Dr ANE S. |
| Dr CHICOULAA B. | |

A notre Maître et Président du jury,

Monsieur le Professeur Pierre BROUSSET

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Vous nous faites l'honneur de présider ce jury de thèse.

Vous m'avez accueilli au sein de votre service afin de m'enseigner par votre pratique quotidienne et votre science l'art de l'anatomie pathologique.

Nous admirons l'étendue de votre savoir.

Veuillez trouver en ce travail le gage de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Monsieur le Professeur Julien MAZIERES

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Pneumologie

Nous sommes très heureux et honorés de vous compter parmi les membres du jury.

Nous vous remercions sincèrement de l'honneur que vous nous faites en jugeant cette thèse. Merci pour votre collaboration et pour ce projet intéressant, pour votre savoir et pour ce que vous m'avez apporté au cours de ce travail.

Madame le Professeur Emmanuelle Uro-Coste

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury et de juger ce travail.

Tu es un modèle pour nous par tes compétences diagnostiques et scientifiques mais aussi pour tes qualités d'enseignement.

Outre ce travail, j'espère aussi avoir été à la hauteur en tant que référent des internes au cours de cette dernière année.

Sois assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

Madame le Professeur Monique Courtade

Professeur des Universités Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury.

Merci également pour le temps passé à nous former pour les travaux dirigés.

J'aimais bien l'histologie quand il y'a longtemps de cela j'étais le petit étudiant stressé de 1ère année, aujourd'hui j'ai la chance d'être de l'autre côté et je te remercie de me permettre cela.

Madame le Docteur Eliane MERY

Praticien Hospitalier – Médecin de centre

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Tout simplement merci pour tout ce que j'ai pu apprendre à tes cotés et pour ta disponibilité au cours de ces derniers mois.

Très rapidement tu as su me mettre en confiance et m'apprendre ta rigueur.

Il est évident pour moi qu'il fallait que tu sois là pour ce jour un peu spécial.

A notre directrice de thèse,

Madame le Docteur Isabelle ROUQUETTE

Praticien Hospitalier

Anatomie Pathologique et Histologie-Cytologie

Merci de m'avoir proposé de faire ce super projet.

Merci pour ton encadrement ainsi que pour ces nombreuses heures de lecture.

Sans toi ce travail n'aurait pu exister.

En dehors de cela, merci pour tout ce que tu m'as appris à travers les différents cours, mais aussi en me faisant confiance, en me confiant différentes missions et en acceptant souvent de me donner ton avis sur mes cas difficiles.

A Estelle,

Parce que tu as fait beaucoup pour faire avancer ce projet, et parce qu'il reste encore beaucoup à faire pour le concrétiser, je te transmets mes remerciements.

De l'initiation, en passant par les commandes, à la mise au point, et toutes les étapes techniques, mais aussi les nombreuses heures de lecture, tu as souvent été là, à nos côtés.

Ta disponibilité, ton expérience sont à la base du bon déroulement du projet.

Continuer à travailler ensemble serait un gage de sécurité pour concrétiser les travaux nombreux qui se poursuivront après ma thèse.

Encore merci pour ton aide précieuse et quoi qu'il arrive bon courage et bonne chance pour la suite de ta carrière !!!

A mes parents,

Sans votre soutien je serais bien loin de tout ça. Vous avez toujours fait le nécessaire pour que je ne manque de rien, pour que la vie soit plus facile. Sans vous tout cela n'aurait pas le même sens. Voir la fierté dans vos yeux est pour moi la plus grande des motivations et des récompenses. Je vous aime !!

A Inès,

Je ne m'éterniserai pas, car ce que l'on vit ensemble est plus fort que quelques mots perdus dans une thèse. Je préfère te dire les choses en me perdant dans ton regard. Merci pour ton soutien, ton aide et pour tout ce que tu m'apportes. Je t'aime !!!!

Au reste de la famille (et a ceux qui dans mon esprit en font déjà parti),

A tous je vous offre mes remerciements !!!!

A mes co internes

-Max : le gouteur officiel de l'IUC ☺. Nos débuts ensemble, notre fin d'internat ensemble, notre assistanat ensemble,...C'est toujours un plaisir que de travailler avec toi.

-Monsieur Camille : le plus grand monocycliste du monde de l'anapath, tu es celui qui a sû me faire évoluer dans mon travail et dans ma façon de voir les choses. Tu es aussi une machine à abattre du boulot. Je n'ai aucun doute sur le fait que ta motivation t'amènera là où tu le souhaites. Merci pour les nombreuses fois où j'ai fait appel à toi pour éclairer ma réflexion. Merci pour le DIU. Merci pour les bières.

-Audrey : tu n'as presque jamais été ma co interne. J'espère que le chantier est bientôt terminé, que tu vas faire installer une piscine et un barbeuc dans le jardin manière qu'on profite du beau temps de Tournefeuille avec ton voisin Alain C.

-Claire I : externe ensemble, interne ensemble, merci pour ton aide précieuse et les quelques conseils pour faire avancer ce travail.

-Aurore : tu t'y attends, tu n'y échapperas pas,... Alors c'est pour quand le bébé ?

-Gwendoline : la police te cherche Gwendodo !!!

-Sarah : j'espère juste que tu arriveras à faire ce que tu veux car tu le mérites

-Laure : tu as tous les atouts pour un jour prendre ma succession à la tête des internes, après avoir fait tes preuves en gérant de mains de maître le planning.

-Anne-Cha toi qui suit à la perfection mon modèle de maquette, qui choisit également la néphrologie pour partager tes discussions à table le soir (les rares jours où il rentre avant 22h), tu es sur la bonne voie ☺ !!

-Charlotte : tu t'es intégrée bien vite dans notre groupe mais méfie-toi de Seb !!

-Gautier : bon courage pour ta nouvelle vie de chirurgien

-Sébastien, le meilleur, le plus fort, le plus beau, le plus discret, le meilleur coupeur de placenta de tous les temps, celui à qui l'ont fait plein de compliments, je crois que tu n'as qu'un seul défaut, tu aimes regarder le Tour de France !! ☺

-Quentin, tu dormiras un jour dans un lit king size en rubis, j'en suis sûr.

-Claire R : merci de rigoler à mes blagues même les plus pourries.

-Cécile : si tu lis ça, c'est que tu es proche de la fin, mais reviendras-tu vivante de Rodez ?

-Alix : discrétion, efficacité, toujours prête à dépanner, attentive, simplement pour dire que tu seras une bonne anapath et ce sera toujours un plaisir de travailler avec toi.

-Aux 3 b... qui vont arriver en Novembre !!! J'ai bien géré les gars, non ?

-Romain D : le meilleur des interch'tis

-Thib la galiss : retour aux sources, tu as gagné le droit de te mettre près de la porte... welcome monsieur !!

A tous les autres que j'ai croisé dans mes stages hors Anapath et à tous ceux que l'on a accueillis ici.

A mes copains co externes

-Cédric : tellement de trucs à dire, qu'il est difficile de sortir quelque chose de précis. Merci pour tout et notamment pour toutes les bouffes ensemble.

-Denis “..” : je crois que tout est dit, ou suggéré, à un biceps près et à quelques dents qui ne sont pas tombées à cause des bonbons.

-Ludo le guignol : t'es vraiment un mec super, je regrette beaucoup que tu sois si loin dans ton Vaucluse d'adoption.

-Nani Baratseko : parce que Twix, parce que ces innombrables moments où tu m'as poussé dans la luxure et la débauche de la jeunesse... ces moments qui nous ont fait grandir !! Merci.

-Ben Rougé notre doyen : s'il y'avait un Strava de la binche tu aurais sans doute pas mal de KOD (King of Descent), tu es un super mec, merci pour tous ces moments sur les circuits, sur les terrains, dans les apéros et autres soirées.

-Seb le Balèze : pour te voir plus souvent, faudra-t-il que j'aille au cœur des montagnes ?

-Bento : mon voisin que je vois si peu...

-Le Polak : un retour dans le sud ? Gaillac primeur en novembre ?

-Damien : le chef des Deltas, j'espère que tu vérifies que personne ne prenne le départ d'un triathlon sans être en règle.

-Choco : c'est quoi la date pour toi ?

-Sophie, Alban, Louis, Delphine, Emilie, et à tous les autres, car il serait injuste que j'en oublie.

A ceux du Foot parce qu'on rêve plus grand depuis 2005

A la RAS : Julien, Matt, Thib, Alex, Fouad, Fred, Yopo, Pancho, Vico, Olmeta, Clem, Pey, Sam, Thom, Nab, Vince, Barth, Jacquot, Louis, Tonio, Brice, Coach,..

Mais aussi à tous ceux qui ont participé à ces matchs spartiates : Hubert, Nico(s), Max, Pierre(s), Ben, Clem(s), Rom, Marcus, Flo(s), Victor, Max, Bobo, ...et tous ceux que j'oublie. Merci à tous, c'était et cela reste encore un plaisir de jouer avec vous !!

A toute la bande

David (le meilleur interne hors filière en anapath de tous les temps), Emilie, Thib, Oubada, Lucie (merci de me prêter Cédric de temps en temps et de m'avoir accueilli quand les temps étaient durs), Laeti, Matt le corse (toi tu es un mec magique et complètement taré en même temps), Oliv (merci pour l'hébergement et merci pour avoir joué ton rôle de Meetic), Aurore Taylor (toutoutotuouuuu), Cyrielle, ...vous étiez des co-internes, vous êtes maintenant des amis.

A toute l'équipe du labo

Vous m'avez vu grandir, vous m'avez appris tous quelque chose d'important quelle que soit votre fonction.

Même si cela n'était pas toujours facile (surtout cette dernière année), cela a toujours été un plaisir de travailler avec vous et je ne doute pas que ça devrait durer encore un peu.

Un merci plus spécial à Philippe, Eliane, Mag, Véro, Raph et indirectement à Sophie car vous m'avez donné la chance de prendre quelques responsabilités avant l'heure. Votre disponibilité, votre patience et votre bonne humeur ont facilité grandement le passage de ce cap. Merci aussi pour votre soutien au cours de ce travail.

Je remercie également le reste de l'encadrement médical. De mon 1^{er} semestre à Purpan jusqu'à ce dernier à l'IUC, vous m'avez accepté à côté de vous au microscope pour m'apprendre mon métier. Pouvoir côtoyer des personnes référentes, talentueuses et agréables a été une chance pour moi et j'en suis bien conscient.

Je remercie aussi toute l'équipe technique, avec laquelle on peut nouer des liens, notamment pendant les longues heures à la macroscopie (même si j'avoue qu'à la fin je n'y allais plus beaucoup). Vous citer tous, serait bien trop long et sachez que j'apprécie la qualité de votre travail et c'est toujours un bonheur pour moi de venir me promener en technique et échanger un peu avec vous.

SOMMAIRE

| | | |
|-------|--|----|
| I. | INTRODUCTION | 6 |
| II. | GENERALITES | 8 |
| 1. | THYMUS NORMAL | 8 |
| 1.1. | Généralités sur les organes lymphoïdes..... | 8 |
| 1.2. | Structure du thymus..... | 9 |
| 2. | TUMEURS EPITHELIALES THYMIQUES | 12 |
| 2.1 | Epidémiologie des tumeurs thymiques..... | 12 |
| 2.2 | Les facteurs pronostiques | 12 |
| 2.3 | Anatomie pathologique..... | 14 |
| 2.4 | Prise en charge par le pathologiste | 18 |
| 2.5 | Thymome A | 20 |
| 2.6 | Thymome AB | 23 |
| 2.7. | Thymome B1..... | 26 |
| 2.8. | Thymome B2..... | 29 |
| 2.9. | Thymome B3..... | 32 |
| 2.10. | Carcinome thymique | 35 |
| 3. | MODALITES THERAPEUTIQUES | 39 |
| 3.1. | Eléments du diagnostic devant une masse médiastinale antérieure..... | 39 |
| 3.2. | Bilan pré thérapeutique | 40 |
| 3.3. | Chirurgie | 41 |
| 3.4. | Radiothérapie | 43 |
| 3.5. | Chimiothérapie..... | 45 |
| 3.6. | Thérapies ciblées | 46 |
| 3.7. | Surveillance | 46 |
| 3.8. | Synthèse des indications thérapeutiques | 47 |
| 4. | PROBLEMATIQUE THYMOMES B3 / CARCINOMES THYMIQUES..... | 49 |

| | | |
|------|---|----|
| 4.1 | Le problème du diagnostic différentiel | 49 |
| 4.2 | Le problème de la thérapeutique..... | 49 |
| 4.3 | L'immunothérapie : un espoir ? | 49 |
| 5. | SYSTEME ET CHECKPOINTS IMMUNITAIRES..... | 50 |
| 5.1 | Système immunitaire | 50 |
| 5.2 | Les mécanismes d'échappement à l'immunosurveillance | 52 |
| 5.3 | Checkpoints : CTLA4, PD1, LAG3, TIM3..... | 54 |
| 5.4 | Voie PD1/PDL1 | 58 |
| 5.5 | Actualités en immunothérapie..... | 61 |
| 5.6 | Les enjeux | 64 |
| III. | MATERIELS ET METHODES | 65 |
| 1. | SELECTIONS DES PATIENTS..... | 65 |
| 2. | DONNEES CLINIQUES..... | 65 |
| 3. | RECUEIL | 66 |
| 4. | CHOIX DES BIOMARQUEURS | 68 |
| 5. | REALISATION TECHNIQUE | 69 |
| 6. | EVALUATION DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE | 71 |
| 7. | TEMOINS POSITIFS ET MISE AU POINT | 73 |
| 7.1 | PDL1 clone SP142 (Roche)..... | 73 |
| 7.2 | PDL1 clone E1L3N (CST)..... | 77 |
| 7.3 | PDL1 clone 22C3 (Dako) | 78 |
| 7.4 | Témoin CD8 (Ventana) | 79 |
| 7.5 | Témoin PD1 (Ventana) | 79 |
| 8. | ANALYSES STATISTIQUES..... | 80 |
| IV. | RESULTATS..... | 81 |
| 1. | CARACTERISTIQUES DES PATIENTS | 81 |
| 2. | MARQUAGES OBTENUS SUR LES THYMOMES B3 | 83 |
| 2.1 | PDL1..... | 83 |

| | | |
|------|--|-----|
| 2.2 | PD1..... | 85 |
| 2.3 | CD8..... | 86 |
| 3. | MARQUAGES SUR LES CARCINOMES THYMIQUES..... | 87 |
| 3.1. | PDL1..... | 87 |
| 3.2. | CD8 | 88 |
| 3.3. | PD1 | 89 |
| 4. | COMPARAISON DU MARQUAGE DES DIFFERENTS CLONES | 90 |
| 5. | PRESENTATION DES RESULTATS..... | 91 |
| 5.1 | Marquage PDL1 selon le pourcentage de cellules tumorales | 91 |
| 5.2 | Marquage PDL1 selon le H-Score..... | 93 |
| 5.3 | Corrélation de marquage de PDL1 entre les différents prélèvements d'un même patient..... | 94 |
| 5.4 | Marquage de PDL1 sur les lymphocytes intra tumoraux..... | 95 |
| 5.5 | Marquage de CD8 sur les cellules tumorales | 96 |
| 5.6 | Marquage de CD8 sur les lymphocytes | 96 |
| 5.7 | Marquage de PD1 sur les cellules tumorales..... | 96 |
| 5.8 | Marquage de PD1 sur les lymphocytes | 96 |
| 5.9 | Corrélation des résultats immunohistochimiques..... | 97 |
| 5.10 | Analyse de la survie globale selon le marquage PDL1..... | 99 |
| 5.11 | Analyse de la survie globale pour les thymomes B3 | 101 |
| 5.12 | Analyse de la survie globale pour les carcinomes thymiques | 102 |
| 5.13 | Analyse de la survie sans progression | 103 |
| 5.14 | Analyse de la survie sans progression des thymomes B3 | 105 |
| 5.15 | Analyse de la survie sans progression des carcinomes thymiques | 106 |
| V. | DISCUSSION | 107 |
| VI. | PERSPECTIVES..... | 111 |
| VII. | BIBLIOGRAPHIE..... | 113 |

ABREVIATIONS UTILISEES

ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity (Cytotoxicité Dépendante des Anticorps)

AFP : Alpha Foeto Proteine

β HCG : β Human Chorio Gonadotrophine

BMS : Bristol Myer Squibb

CASTLE : Carcinoma showing thymus-like elements

CD : Cluster de Différenciation

CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité

CHU : Centre Hospitalo-Universitaire

EFR : Epreuves Fonctionnelles Respiratoires

EMA : Epithelial Membrane Antigen

IASLC : International Association for the Study of Lung Cancer

IL-10 : Interleukine 10

INF : Interféron gamma

ITMIG : International Thymic Malignancy Interest Group

HPF : High Power Field (champs au fort grossissement x 40)

KIR : Killer cell Ig-like Receptor

NK : Natural Killer

PD1 : Program Death 1

PDL1 : Program Death Ligand 1

PDL2 : Program Death Ligand 2

Rythmic : Réseau tumeurs thymiques et cancer

TAM : Macrophages intra tumoraux

TAP1 Transporter associated with Antigen Processing 1

TCR : T Cell Receptor

TDM : Tomodensitométrie

TdT : Terminal Desoxynucleotidyl Transferase

TET : Tumeurs Epithéliales Thymiques

VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

I. INTRODUCTION

Les tumeurs thymiques sont des tumeurs rares, souvent découvertes tardivement car pauci-symptomatiques et dont la prise en charge est longtemps restée mal codifiée dans les formes non accessibles au traitement chirurgical. Les solutions thérapeutiques alternatives étaient la radiothérapie et la chimiothérapie mais sans standard bien établi et avec une efficacité médiocre.

Des progrès ont été effectués dans le typage et la prise en charge de ces tumeurs rares grâce au développement du réseau multicentrique RYTHMIC, et grâce au travail de l'ITMIG (International Thymic Malignancy Interest Group)

Dans la catégorie des tumeurs épithéliales thymiques, les thymomes B3 et les carcinomes thymiques sont les tumeurs les plus agressives et dont le pronostic est le plus péjoratif.

L'avènement des thérapies ciblées en cancérologie a suscité un espoir vite déçu dans ces tumeurs puisqu' aucune anomalie spécifique susceptible d'être activée, aucune mutation « driver » n'a véritablement été identifiée.

Aujourd'hui, l'immunothérapie suscite de nouveaux espoirs et des essais cliniques prometteurs ont permis d'obtenir des résultats très encourageants dans les cancers du poumon et le mélanome.

Elle pourrait représenter une piste thérapeutique intéressante dans le traitement des tumeurs du thymus, organe immunocompétent.

Les molécules aujourd'hui utilisées sont dirigées contre PDL1 ou PD1, récepteurs et cibles des checkpoints immunitaires et leur efficacité pourrait être dans certains cas corrélée au niveau d'expression de ces protéines.

Les anticorps PDL1 utilisés dans les études cliniques sont issus de différents clones et fournisseurs et les études comparatives sont rares.

Ce travail a donc pour objectif de tester et comparer sur une série de thymomes B3 et C les trois clones principaux de PDL1 aujourd'hui disponibles et qui pour certains sont pressentis en tant que test compagnon dans le cancer du poumon.

On y associera l'étude de l'expression d'autres marqueurs intervenant dans le système des checkpoints immunitaires, CD8 et PD1.

II. GENERALITES

1. THYMUS NORMAL

1.1. Généralités sur les organes lymphoïdes

Le thymus est un organe lymphoïde primaire situé dans le médiastin antérieur et supérieur (Fig.1). C'est à son niveau que prend place la maturation des lymphocytes. Il existe également des organes lymphoïdes secondaires tels que les ganglions, la rate, et les différents tissus lymphoïdes associés aux muqueuses. Une fois matures, les lymphocytes qui ont été générés dans les organes lymphoïdes primaires, circulent dans un réseau de vaisseaux (sanguins et lymphatiques).

Les lymphocytes immatures générés par l'hématopoïèse effectuent leur maturation à l'intérieur des organes lymphoïdes primaires où ils acquièrent une spécificité antigénique particulière. Ce n'est qu'après avoir effectué sa maturation à l'intérieur d'un organe lymphoïde primaire qu'un lymphocyte devient une cellule immuno compétente c'est-à-dire capable de développer une réponse immunitaire. Chez l'Homme, les cellules T effectuent leur maturation dans le thymus et les cellules B dans la moelle osseuse.

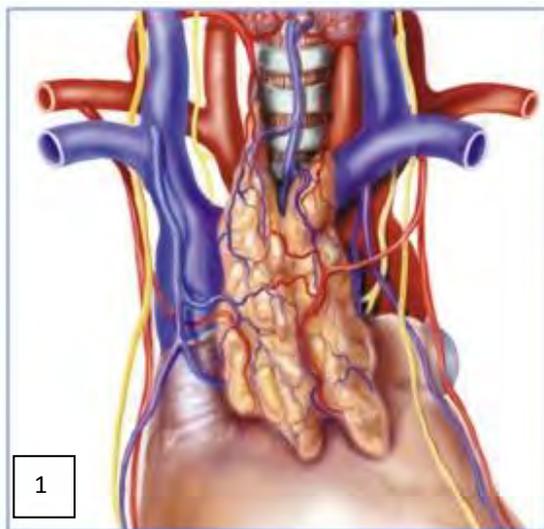


Figure 1 : Position anatomique du thymus avec ses rapports avec les gros vaisseaux

1.2. Structure du thymus

Le thymus est un organe encapsulé (Fig.2A), bilobé, localisé dans le thorax et plus précisément dans le médiastin antérieur, entre le cœur et les poumons. Il se développe fortement dans l'enfance (masse de 20-30g), pour régresser à partir de la vie adulte. Cette régression se fait sous forme d'une involution adipeuse (Fig.3A-3B). Chaque lobe est constitué de nombreux lobules séparés par des travées conjonctives. On distingue 2 parties, la plus périphérique est le cortex et la plus centrale est la médulla (Fig.2B). Chaque lobule est entouré par des capillaires sanguins qui envahissent le cortex et atteignent la médulla le long des travées pour former un dense réseau au niveau de la jonction corticomédullaire. Les travées contiennent les artères, les nerfs et les vaisseaux lymphatiques.

Le thymus fournit un micro-environnement favorable à la maturation des lymphocytes T. Il comprend plusieurs types cellulaires d'origine hématopoïétique ou non, qui participent à l'établissement de ce micro-environnement. Les lymphocytes T en cours de maturation dans le thymus, appelés thymocytes, exécutent une migration de la périphérie vers le centre du thymus au cours de laquelle ils franchissent plusieurs étapes de différenciation avant de devenir des lymphocytes T matures et exportés en périphérie.

Anatomiquement, chaque lobule peut être divisé en 4 régions.

La région sous capsulaire, située sous la capsule, elle est tapissée par un épithélium qui produit la majorité des hormones thymiques (thymosine, thymopoïétine). Cette région est très riche en thymocytes en cours de prolifération.

La région corticale comprend un réseau de cellules épithéliales corticales munies de longs prolongements membranaires en contact avec les thymocytes. Proches de la périphérie de l'organe, des complexes multicellulaires se forment, comprenant de nombreux thymocytes en interaction avec des cellules nurses. Enfin, éparpillés dans le cortex, résident des macrophages qui éliminent les lymphocytes en apoptose. (Fig.2C-2D)

La région cortico-médullaire contient de nombreuses cellules dendritiques se concentrant à l'interface cortex-médulla. Elles sont d'origine lymphoïde et myéloïde. Elles sont impliquées dans l'éducation thymique des thymocytes.

La région médullaire ou médulla est constituée de cellules épithéliales interconnectées, toujours en interaction avec des thymocytes. Au centre de la médulla se forment des corpuscules de Hassal dont le nombre augmente tout au long de la vie : il s'agit de structures lamellaires éosinophiles faites de cellules épithéliales sénescents kératinisées et enroulées. Des macrophages et des cellules dendritiques sont dispersés dans la médulla. (Fig. 2E-2F)

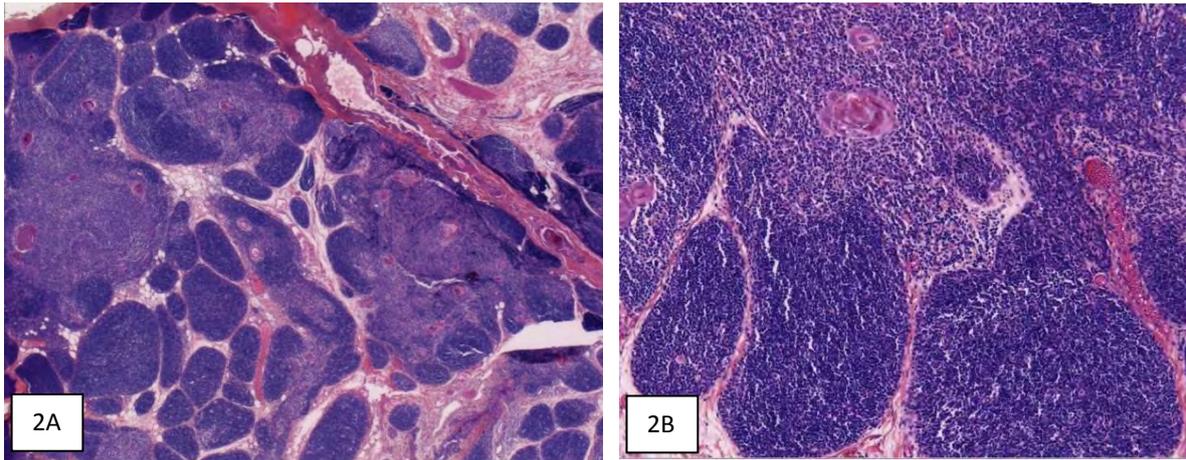


Figure 2A : aspect lobulé délimité par une capsule fibreuse (x2)

Figure 2B : aspect basophile de la zone corticale et aspect pâle de la zone médullaire (x5)

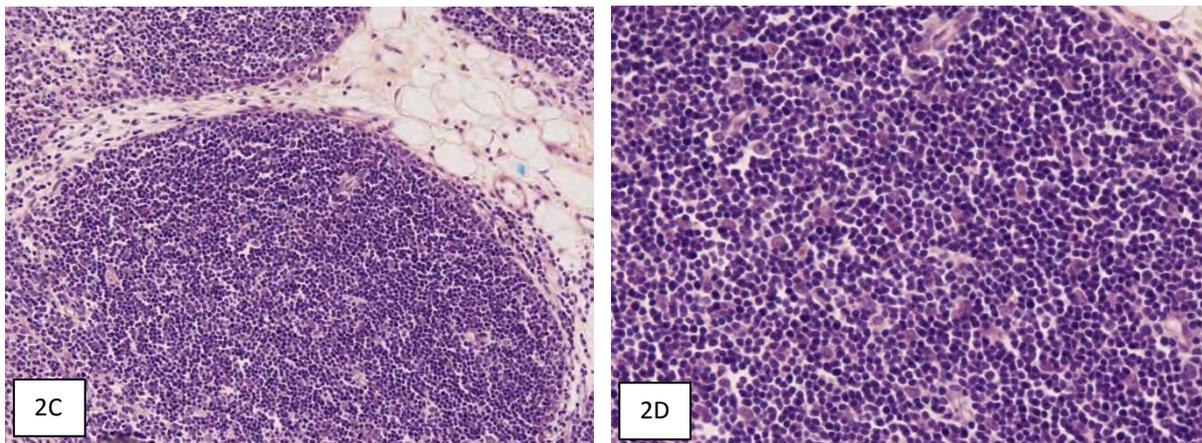


Figure 2C-2D : zone corticale avec nombreux thymocytes et quelques macrophages. Il existe un gradient de taille de la périphérie vers la partie interne au fur et à mesure de la maturation de lymphoblastes en lymphocytes. (x10) et (x20)

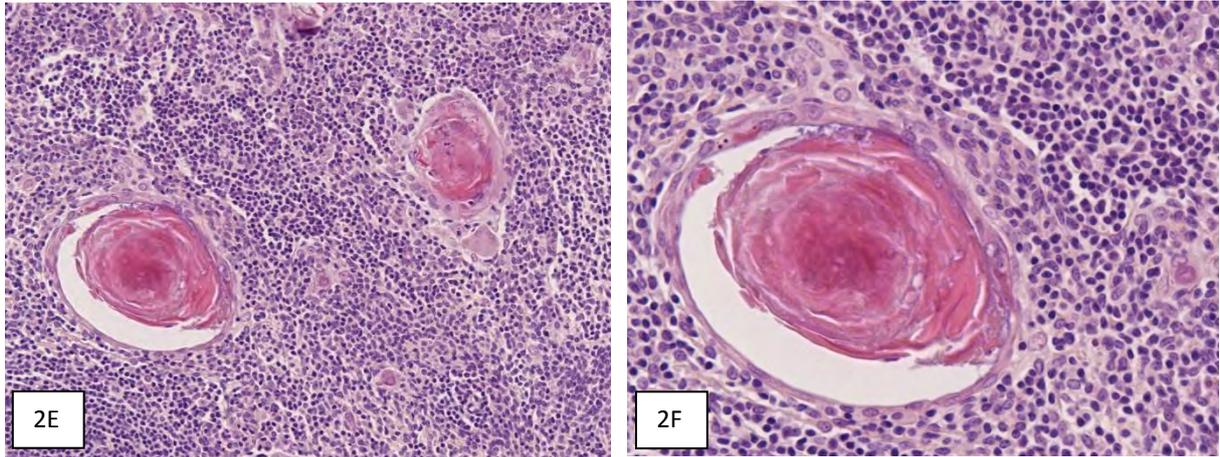


Figure 2E-2F: Zone médullaire avec des cellules épithéliales au cytoplasme éosinophile et pâle. Corpuscules de Hassal (x10) et (x20)

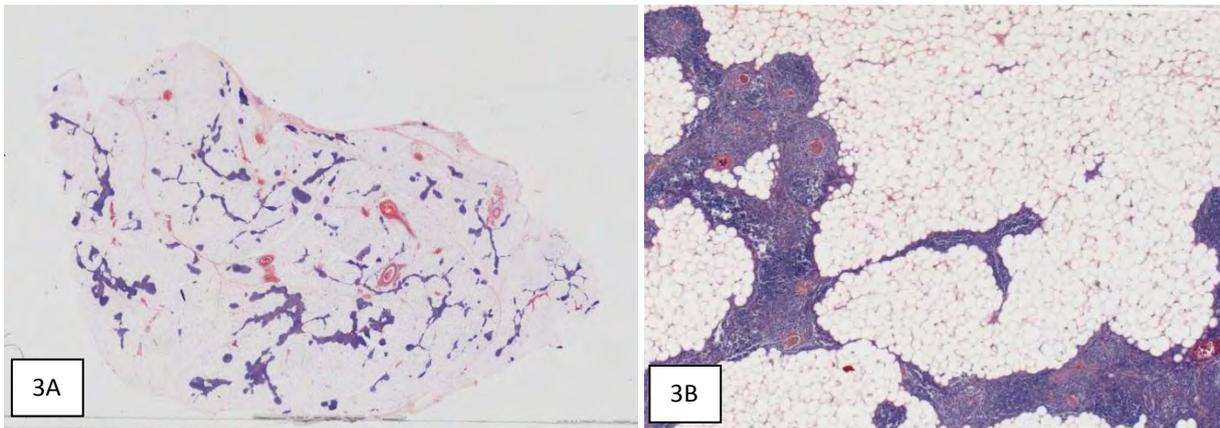


Figure 3A: involution adipeuse thymique (panorama)

Figure 3B : involution adipeuse thymique (x5)

2. TUMEURS EPITHELIALES THYMIQUES

2.1 Epidémiologie des tumeurs thymiques

Les tumeurs épithéliales du thymus, qui comprennent les thymomes et les carcinomes thymiques sont des tumeurs rares. Il y a seulement 250 nouveaux cas par an en France (1). Elles représentent environ 50% des tumeurs du médiastin antérieur (1). Ces tumeurs sont le plus souvent retrouvées chez l'adulte entre 40 et 50 ans mais des cas sont décrits chez l'enfant. Une légère prédominance féminine est observée.

Les tumeurs peuvent être découvertes dans un contexte de maladie auto-immune ou se manifester par une myasthénie. En dehors de ce contexte, 65% des tumeurs sont de découverte fortuite. Les symptômes sont peu spécifiques à type de toux, douleurs, dyspnée, dysphonie, dysphagie...

Du fait de leur situation anatomique et de leur rareté, les tumeurs épithéliales thymiques (TETs) posent des problèmes de diagnostic anatomopathologique et de prise en charge thérapeutique.

La stratégie thérapeutique varie en fonction du type histologique et du stade. Il est capital d'avoir un diagnostic anatomopathologique précis et une évaluation correcte du stade pour proposer une prise en charge adaptée.

C'est dans ce but que le réseau RYTHMIC a été créé. Ce réseau national de centres d'experts nationaux et régionaux, dédié à la prise en charge des tumeurs thymiques s'appuie sur les réunions de concertations pluridisciplinaires (RCP) régionales, une RCP de recours nationale et un groupe de relecture constitué d'experts anatomo-pathologistes.

2.2 Les facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques de la survie globale des patients sont difficiles à définir compte tenu de la rareté de ces tumeurs, des modifications successives des classifications

histologiques, peu reproductibles, et de la durée d'évolution de certaines de ces tumeurs nécessitant un suivi prolongé (jusqu'à 15 ans). La notion de tumeur encapsulée ou invasive ainsi que le caractère complet ou incomplet de la résection chirurgicale sont les facteurs pronostiques les plus significatifs.

La classification OMS 2004, réactualisée en 2015, associée au stade de la tumeur a également une valeur pronostique. La survie des patients atteints de tumeur de stade I-II, plus souvent de type A, AB, ou B1, est supérieure à celles des patients atteints de tumeur de stade III-IV, plus souvent de type B2, B3 ou carcinome thymique (2).

Il existe également une classification en stades cliniques qui fait référence en termes de pronostic. Il s'agit de la classification de Masaoka-Koga qui tient compte du franchissement de la capsule, de l'envahissement des organes de voisinage et de la dissémination. Sa valeur pronostique a été évaluée récemment chez plus de 2000 patients inclus dans la cohorte de l'European Society of Thoracic Surgery (3). Les données de cette étude ont abouti à une proposition de classification de Masaoka Koga modifiée par l'ITMIG. (tableau 1).

Tableau 1 : Classification de Masaoka-Koga modifiée par ITMIG en 2011

| CLASSIFICATION MODIFIEE DE MASAOKA | |
|------------------------------------|--|
| Stade I | Tumeur macroscopiquement et microscopiquement encapsulée |
| Stade II | A : Envahissement microscopique et complet de la capsule B : Envahissement macroscopique des tissus mous adjacents ou adhérence à la plèvre médiastinale ou au péricarde qui ne sont pas franchis |
| Stade III | Envahissement macroscopique des organes adjacents A : sans atteinte des gros vaisseaux B : avec atteinte des gros vaisseaux |
| Stade IV | A : Dissémination pleurale ou péricardique B : Métastase par voie lymphatique ou sanguine |

2.3 Anatomie pathologique

Dans les tumeurs épithéliales thymiques, on retrouve un double contingent lymphocytaire et épithélial mais seul ce dernier est tumoral. Le terme de thymome est aujourd'hui réservé à ces tumeurs épithéliales.

De nombreuses classifications histologiques ont été successivement proposées : la classification de Levine et Rosai était basée sur une description morphologique et distinguait des thymomes bénins et malins, celle de Müller Hermelink avait une approche histofonctionnelle associant la morphologie et le compartiment cortical ou médullaire. On retient depuis 1999 la classification OMS qui a conservé les deux approches. Elle a été modifiée en 2004 et actualisée en 2015 à la suite de la réunion de consensus de 2011 de l'ITMIG. Elle est validée comme le standard afin de définir des critères diagnostiques reproductibles.

Elle fait appel à un système de lettres et de chiffres (A comme atrophic, B comme bioactive, la lettre C qui désignait les carcinomes thymiques bien différenciés a été abandonnée. On distingue donc les thymomes A, AB, B1, B2, B3 d'une part et les carcinomes thymiques d'autre part. (Tableau 2)

Morphologiquement les thymomes A sont constitués de cellules tumorales fusiformes alors que les thymomes B sont constitués d'une association de cellules épithéliales polygonales et de lymphocytes non tumoraux (thymocytes) matures ou immatures en proportions variables. Le thymome AB est l'association des deux contingents A et B.

Tableau 2 : classification des thymomes OMS 2015

| TYPE | CELLULES EPITHELIALES | LYMPHOCYTES |
|---|--|--------------------------|
| A : médullaire ou à cellules fusiformes | Fusiformes ou ovoïdes | Rares |
| AB : mixte | Pas d'atypie cytonucléaire | Variable selon les zones |
| B1 : prédominance lymphocytaire | Grandes avec noyau nucléolé Pas ou peu d'atypies cytonucléaires | Très nombreux |
| B2 : cortical | Grandes avec noyau nucléolé Pas ou peu d'atypies cytonucléaires | Nombreux |
| B3 : prédominance épithéliale avec atypies | Atypies cytonucléaires nettes | Peu nombreux |

L'examen morphologique doit être complété d'une étude immunohistochimique. qui fait appel à des marqueurs du contingent tumoral épithélial et lymphocytaire.

Il existe un panel minimum devant une suspicion de tumeur thymique comprenant AE1/AE3, P63, CD5, TdT, CD20. On peut y ajouter le CD117 en cas de suspicion de carcinome thymique. Les caractéristiques des marquages selon les thymomes sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : caractéristiques des anticorps du panel minimum devant une tumeur thymique

| ANTICORPS | MARQUAGE | TUMEURS THYMIQUES |
|----------------|-----------------------|---|
| AE1/AE3 | Cellules épithéliales | Tous types intensité répartition variable |
| P63 | Cellules épithéliales | Tous types intensité répartition variable |
| CD5 | Lymphocytes T | Tous types |
| | Cellules épithéliales | Carcinome thymique |
| CD20 | Lymphocytes | Centres germinatifs B2 |
| | Cellules épithéliales | Thymomes A et AB |
| TdT | Lymphocytes immatures | Thymomes B1 B2 ++ |
| | | A AB et B3 rares |
| | | Jamais dans les carcinomes |
| CD117 | Cellules épithéliales | Carcinomes thymiques et rares B3 |

Une proposition de classification TNM, commune aux thymomes et aux carcinomes thymiques a été développée par l'ITMIG et par l'IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer) avec les données d'une base internationale rétrospective ayant collecté les caractéristiques anatomo-cliniques et évolutives de 10808 patients pris en charge entre 2000 et 2012 (2) (tableau 4). Cette classification tient compte de la tumeur, des ganglions et de leur localisation ainsi que de la présence de métastase.

Tableau 4 : Classification TNM proposée par l'OMS en 2015 (4)

| TNM | CRITERES DIAGNOSTIQUES OMS |
|----------------------|---|
| TUMEUR (T) | |
| T1 | Tumeur complètement encapsulée |
| T2 | Invasion du tissu conjonctif péri-capsulaire |
| T3 | Invasion des structures de voisinage : péricarde, plèvre médiastinale, paroi thoracique, gros vaisseaux, poumon |
| T4 | Dissémination pleurale ou péricardique |
| GANGLION (N) | |
| N0 | Absence d'adénopathie tumorale |
| N1 | Adénopathies médiastinales antérieures |
| N2 | Adénopathies intra-thoraciques en dehors de la région médiastinale antérieure |
| N3 | Adénopathies scalènes et/ou supra-claviculaires |
| METASTASE (M) | |
| M0 | Absence de métastase à distance |
| M1 | Présence de métastase à distance |

L'OMS en 2015 a également publié une classification en stades en fonction de la classification TNM OMS 2015. (Tableau 5)

Tableau 5: TNM selon OMS 2015

| STADE | CRITERES TNM |
|-----------|--------------|
| Stade I | T1 N0 M0 |
| Stade II | T2 N0 M0 |
| Stade III | T1-2 N1 M0 |
| | T3 N0-1 M0 |
| Stade IV | T4 N0-3 M0 |
| | T1-4 N2-3 M0 |
| | T1-4 N0-3 M1 |

2.4 Prise en charge par le pathologiste

L'ITMIG a proposé des recommandations pour l'analyse des tumeurs thymiques.

2.4.1 Analyse générale

Une bonne communication entre le pathologiste et le chirurgien est nécessaire afin d'identifier les régions pour laquelle l'invasion est suspectée.

L'ITMIG a proposé des recommandations aux chirurgiens pour la préparation de la pièce opératoire. Il s'agit de repérer et orienter la pièce par l'intermédiaire de fils et d'un schéma en notant en particulier la présence de plèvre médiastinale, d'un fragment de péricarde, de la veine cave supérieure ou du tronc innominé. . Les adénopathies suspectes devront être enlevées et adressées à part. Le compte rendu opératoire devra mentionner le caractère complet de la résection ainsi que son étendue, la présence et localisation des adhérences, lister les structures de voisinages envahies et réséquées, ainsi que préciser les régions pour lesquelles l'invasion est suspecte et où l'exérèse peut être douteuse. Le résultat de l'exploration pleurale et péricardique doit être également mentionné.

2.4.2 Place de l'examen extemporané

L'examen extemporané devra être évité autant que possible devant une masse médiastinale car beaucoup de diagnostics nécessitent une aide immunohistochimique. Il est difficile dans certaines conditions, et peut être trompeur comme par exemple dans le cas du thymome B1 et du lymphome lymphoblastique.

Si la tumeur est entièrement résécable il n'est pas réalisé d'examen extemporané.

Si la tumeur n'est pas résécable d'emblée, on réalise en règle générale une biopsie pré-opératoire afin de connaître le diagnostic et de proposer éventuellement un traitement néo-adjuvant.

2.4.3 Macroscopie

Ensuite le pathologiste devra sectionner la pièce en faisant des tranches d'une épaisseur de 1cm maximum. Les prélèvements seront réalisés sur la tumeur avec un minimum de 5 blocs quel que soit le diamètre tumoral. Le thymus non tumoral devra également faire l'objet de quelques prélèvements à titre systématique.

2.4.4 Microscopie

Ensuite il faudra évaluer les marges de résection. Les marges positives seront celles où la tumeur arrive au contact de l'encre. Si la marge est inférieure à 1mm il est conseillé de vérifier l'absence d'envahissement de la berge chirurgicale sur 3 niveaux de coupe supplémentaires.

L'évaluation de l'invasion tumorale devra s'appuyer sur la classification de Masaoka redéfini par l'ITMIG.

Le pathologiste doit rechercher :

- la présence d'une capsule et l'invasion trans capsulaire
- l'invasion de la graisse médiastinale
- l'invasion de la plèvre médiastinale et l'invasion péricardique en cas de résection de péricarde associée d'où l'importance de l'orientation préalable par le chirurgien.
- la présence d'implants (péricardiques ou pleuraux)
- la présence d'une extension aux organes de voisinage (poumon)
- la présence de métastases ganglionnaires (avec leur situation) ou à distance (dont les sites seront précisés).

Sur une pièce réséquée après traitement néo adjuvant, il faudra préciser le pourcentage de cellules tumorales viables (à 10% près) après avoir examiné au moins cinq sections.

2.5 Thymome A

Ce sont des thymomes bénins composés de cellules épithéliales tumorales ovales ou fusiformes et de quelques lymphocytes. Ils représentent moins de 20% des thymomes et ils surviennent à un âge moyen un peu plus élevé que pour les autres thymomes. Pour la majorité, ils sont classés stade I ou II de la classification de Masaoka-Koga.

2.5.1. Macroscopie

Macroscopiquement, il s'agit d'une lésion bien limitée et encapsulée. A la coupe, ils sont blancs ou bruns, vaguement lobulés avec des fibres collagènes fines. La capsule peut être calcifiée ou être le siège de remaniements kystiques.

2.5.2. Histologie

Histologiquement, la tumeur est composée de plages solides faites de cellules ovales ou fusiformes sans atypie, avec des nucléoles discrets. (Fig.4A-4B) L'architecture peut être storiforme, hémangiopéricytaire-like, former des nids ou des rosettes. Les remaniements kystiques ou microkystiques sont fréquents. Quelques rares lymphocytes sont présents. Des amas d'histiocytes spumeux et des structures pseudo glandulaires et l'absence de corpuscule de Hassal caractérisent également cette lésion. A noter qu'il existe un réseau réticulinique tout à fait particulier enserrant chaque cellule tumorale. Des critères majeurs et mineurs ont été proposés afin d'aider au diagnostic (tableau 6).

2.5.3 Immunohistochimie

En immunohistochimie, les cellules tumorales épithéliales ont pour particularité une co-expression de CD20 et des cytokératines. (Fig.4C-4D)

Les rares lymphocytes présents se caractérisent par des marqueurs d'immaturité comme le CD1a, la TdT et le CD99.

2.5.4. Diagnostics différentiels

Les diagnostics différentiels principaux sont :

- Les tumeurs carcinoïdes lorsque la tumeur est riche en rosettes: on s'aidera des marqueurs neuroendocrines.

- Les sarcomes parmi lesquels le synoviosarcome, qui n'aura qu'un marquage focal avec les cytokératines, et la tumeur fibreuse solitaire qui sera CD34 et STAT6 positive.

- Les rares thymomes B3 à cellules fusiformes mais les atypies sont plus marquées, il existe des espaces périvasculaires et on ne note pas d'expression de CD20.

- Le thymome A doit être également distingué du variant « atypique » qui est diagnostiqué à un stade avancé, parfois métastatique indiquant l'agressivité et le potentiel malin de ces tumeurs. (5) (6). Les critères sont une activité mitotique élevée (>4 mitoses / 10 HPF) et la présence d'une vraie nécrose tumorale dite de coagulation, différente de celle ischémique ou liée à la biopsie. D'autres critères sont plus difficiles à quantifier tels que l'hypercellularité, les noyaux hyperchromatiques et volumineux, l'important nucléole, l'augmentation de l'index de prolifération (Ki67) ou l'étendue des zones atypiques. Une proposition de subdivision de ces thymomes en sous types A1, A2, A3 a été rejetée par le réseau d'experts (ITMIG) en 2014 devant l'absence de données convaincantes disponibles.

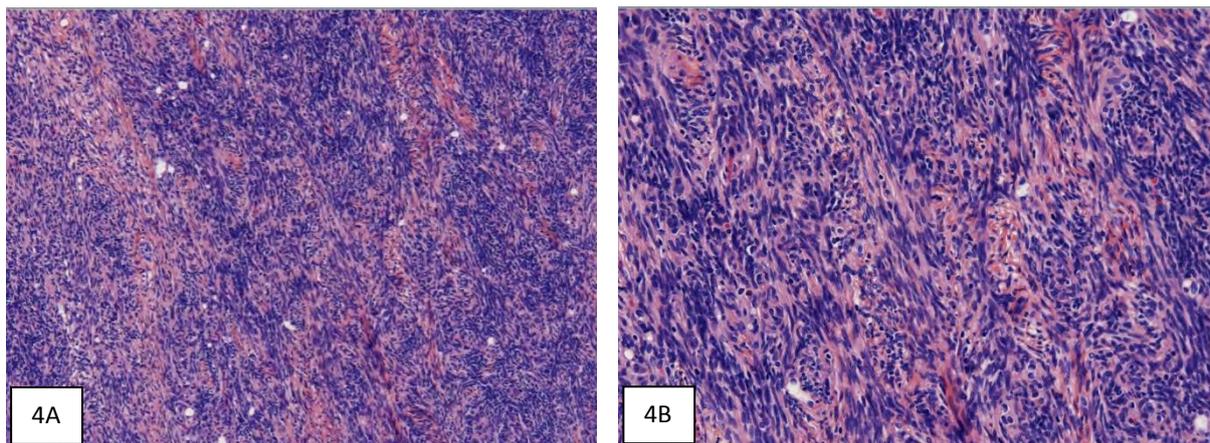


Figure 4 A-B : Thymome A : présence de plages de cellules fusiformes

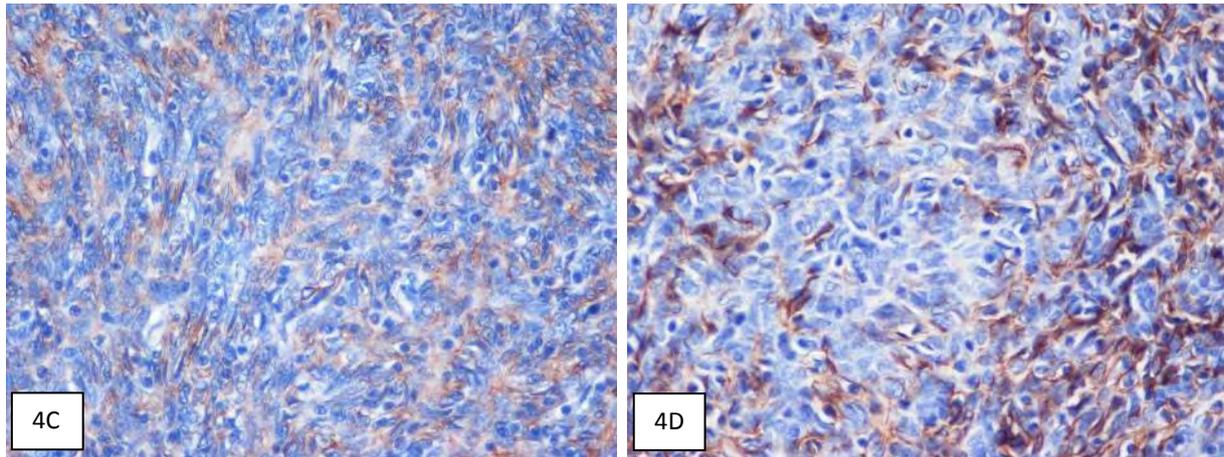


Figure 4 C-D : Thymome A : co expression des cytokératines (AE1/AE3) (C) et du CD20 (D).

Tableau 6 : résumant les critères majeurs et mineurs des thymomes A conventionnels. (7)

| CRITERES MAJEURS | CRITERES MINEURS |
|--|--|
| Plages de cellules tumorales fusiformes et/ou ovalaires sans atypie cytonucléaire | Présence de rosettes ou de kystes sous capsulaires (doivent être distingués des EPV) |
| Absence ou faible abondance de lymphocytes immatures (TdT+) au sein de la tumeur | Présence de formations glandulaires focales |
| | Vascularisation hémangiopéricytaire |
| | Absence ou faible abondance des EPV contrastant avec la présence de nombreux capillaires |
| | Absence de corpuscules de Hassal |
| | Encapsulation complète |
| | Expression du CD20 au niveau des cellules épithéliales sans marqueur spécifique du cortex |

2.6 Thymome AB

Ce sont des thymomes bénins que l'on dit « mixte » car ils présentent à la fois des aspects corticaux et des aspects médullaires. Il s'agit donc d'une tumeur associant des zones de type A analogues à celles sus-décrites et des zones de type B riche en lymphocytes (>50% de la population cellulaire). Ils sont les plus fréquents et pour la majorité, ils sont classés stade I ou II de la classification de Masaoka-Koga. La survie est en général proche de 100% à 10 ans.

2.6.1. Macroscopie

Macroscopiquement, il s'agit habituellement d'une lésion bien limitée et encapsulée. A la coupe, ils sont blancs ou bruns, avec des nodules séparés par des bandes fibreuses plus épaisses que dans les thymomes A.

2.6.2. Histologie

Histologiquement, il existe une proportion variable de chacun des contingents A et B. (Fig.5A-5B) qui peuvent être soit séparés soit étroitement entremêlés. Le type A est composé de plages de cellules fusiformes et le type B de cellules épithéliales arrondies associées à un contingent lymphoïde (Fig.6A-6B, 7A-7B). Les noyaux sont petits, ronds ou ovales, la chromatine est dispersée et les nucléoles discrets.

2.6.3. Immunohistochimie

En immunohistochimie, les deux contingents ont des expressions différentes.

Il existe un marquage caractéristique membranaire d'une partie des cellules épithéliales par le CD20. (Fig.7D)

Le marquage par les cytokératines est fort et diffus sur le contingent A (Fig.7C) et forme un réseau sur le contingent B. Le contingent B comporte une partie de thymocytes immatures exprimant le TdT, une partie de thymocytes matures CD5 positifs.

2.6.4. Diagnostics différentiels

- Le thymome A dans les rares formes riches en lymphocytes. (7)

- Le thymome micronodulaire car il est fréquent de trouver un contingent minoritaire de thymome micronodulaire avec un stroma lymphoïde au sein d'un thymome A ou AB. Le contingent lymphocytaire du thymome micronodulaire exprime le CD20 à la différence de celui du thymome AB.

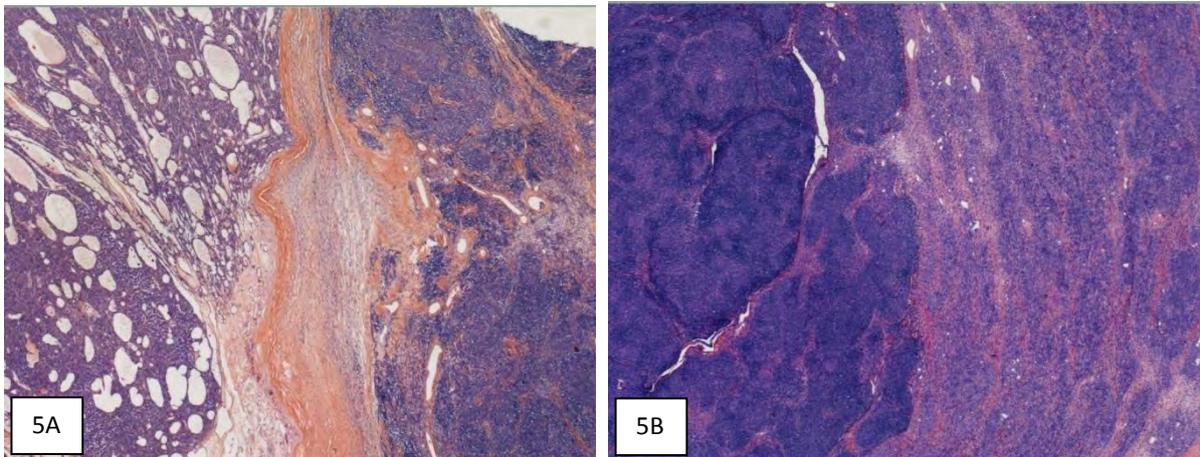


Figure 5A : la zone A (à gauche) et la zone B (à droite) (x2)

Figure 5B : la zone A (à droite) et la zone B (à gauche) (x2)

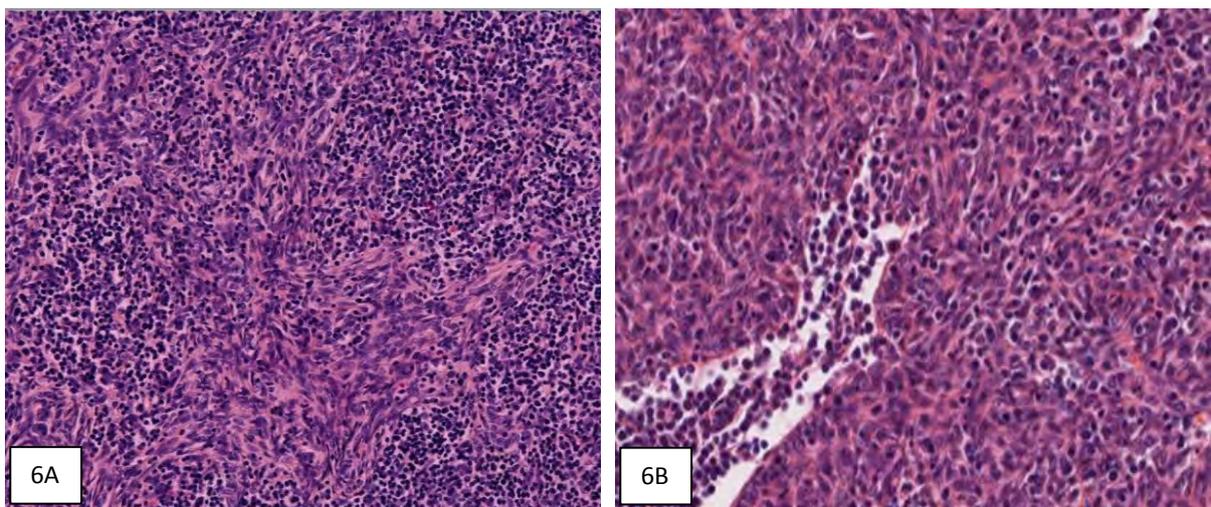


Figure 6A : zone A avec des cellules tumorales fusiformes (x10)

Figure 6B : zones A et B intriquées (x20)

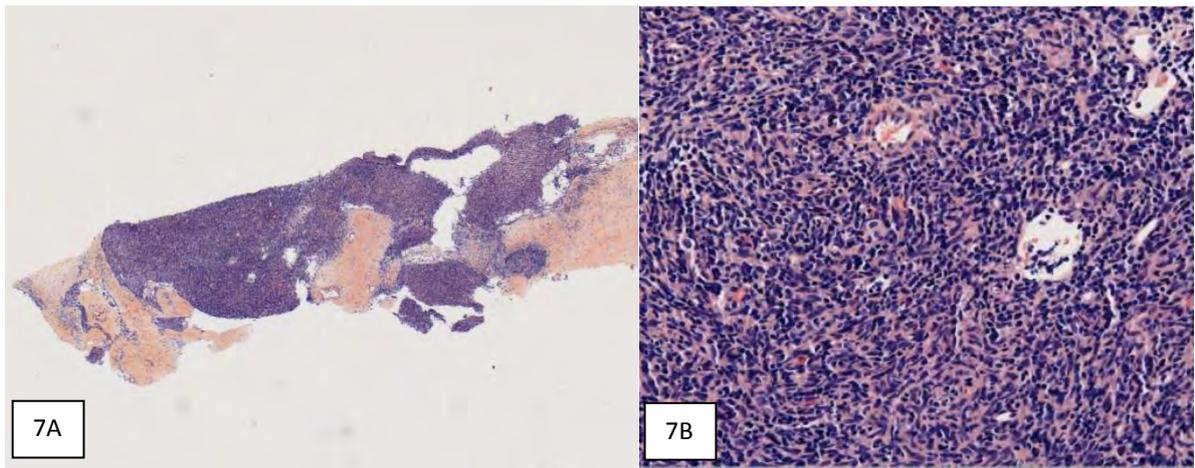


Figure 7A : biopsie d'un thymome AB (panorama)

Figure 7B : biopsie d'un thymome AB (x10)

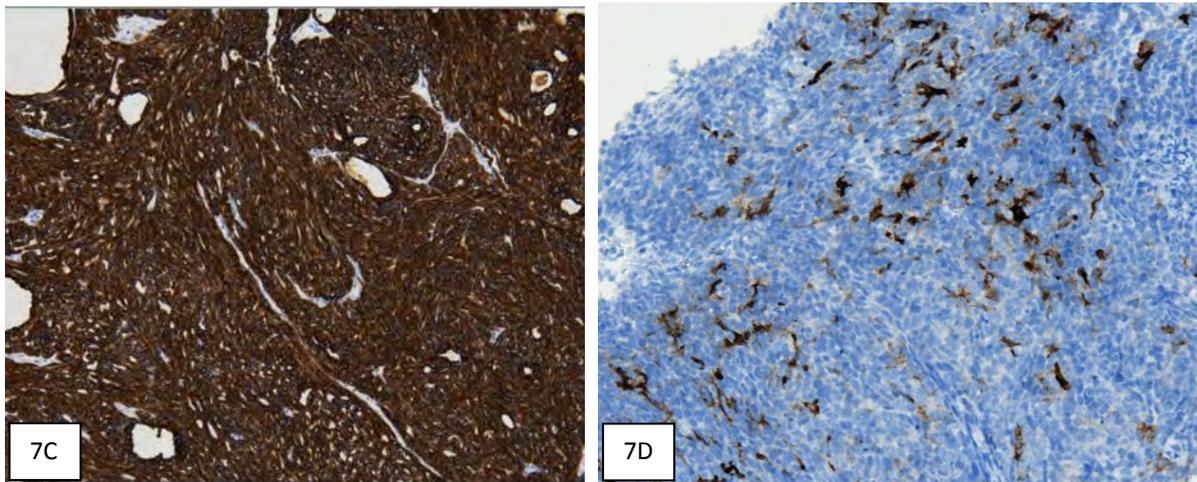


Figure 7C : marquage intense des cellules tumorales avec AE1/AE3 (x10)

Figure 7D : marquage de quelques cellules avec CD20 (x10)

2.7. Thymome B1

Thymome de bas grade de malignité rappelant par sa morphologie le thymus normal. Il est constitué de cellules tumorales épithéliales peu visibles et dispersées dans un abondant fond lymphoïde. Il représente moins de 20% des thymomes et la moyenne d'âge est inférieure à 50 ans. Les métastases sont exceptionnelles, mais on note quelques cas envahissant la graisse médiastinale (stade II de Masaoka Koga modifiée) ou la plèvre, le péricarde, les gros vaisseaux et les organes adjacents (stade III de Masaoka Koga modifiée). La survie globale reste supérieure à 90% à 10 ans.

2.7.1. Macroscopie

Macroscopiquement, il s'agit d'une masse, blanc grisâtre bien limitée voire encapsulée avec parfois d'épaisses travées fibreuses pouvant naître de la capsule (Fig.8A).

2.7.2. Histologie

Histologiquement, il ressemble au thymus normal avec une architecture lobulée organoïde séparée par des travées fibreuses. On le décrit comme un thymome riche en lymphocytes ou à prédominance corticale (Fig.8B). Il est composé de cellules épithéliales tumorales peu visibles et entourées d'une dense population de lymphocytes T immatures non tumoraux. Les corpuscules de Hassal sont rares mais peuvent être présents. On peut aussi trouver des macrophages à corps tingibles avec une pseudo apparence de ciel étoilé. Comparé à un thymus normal cette lésion montre une modification du rapport cortex / médullaire.

2.7.3. Immunohistochimie

En immunohistochimie, les cellules épithéliales montrent un marquage fin en réseau dendritique avec les cytokératines alors que P63 montre un marquage nucléaire épars (Fig.8C-8D). Les lymphocytes T corticaux expriment les marqueurs d'immaturités CD1a, CD99

et TdT. et leur présence en grande quantité est responsable d'un index de prolifération évalué par Ki67 très élevé (environ 90%). Les lymphocytes T de la médullaire sont quant à eux matures et expriment CD3 et CD5 mais sont CD1a, CD99 et TdT négatifs.

2.7.4. Diagnostics différentiels

- Le thymome B2 se différencie par un plus grand nombre de cellules épithéliales formant de petits agrégats mieux visualisés par la P63. Ces cellules tumorales sont plus grandes avec un nucléole plus proéminent.

- Sur biopsie, le principal diagnostic différentiel est le lymphome lymphoblastique T qui atteint plus fréquemment les jeunes adultes. Il exprime la TdT et le CD5. L'index de prolifération est aussi très élevé. Le diagnostic repose donc sur les cytokératines qui montrent l'absence de marquage du réseau épithélial.

- Devant l'aspect organoïde proche du thymus normal on peut se poser le problème d'une hyperplasie thymique mais elle ne contient pas de cellules épithéliales tumorales.

- La distinction peut se poser avec le thymome AB riche en lymphocytes. Les corpuscules de Hassal sont fréquemment retrouvés dans les thymomes B1 (50%) alors qu'ils sont toujours absents des thymomes AB. De même on ne retrouve pas de cellules épithéliales CD20 positives dans les thymomes B1.



Figure 8A : aspect macroscopique blanc, nacré et bien limité d'un thymome B1.

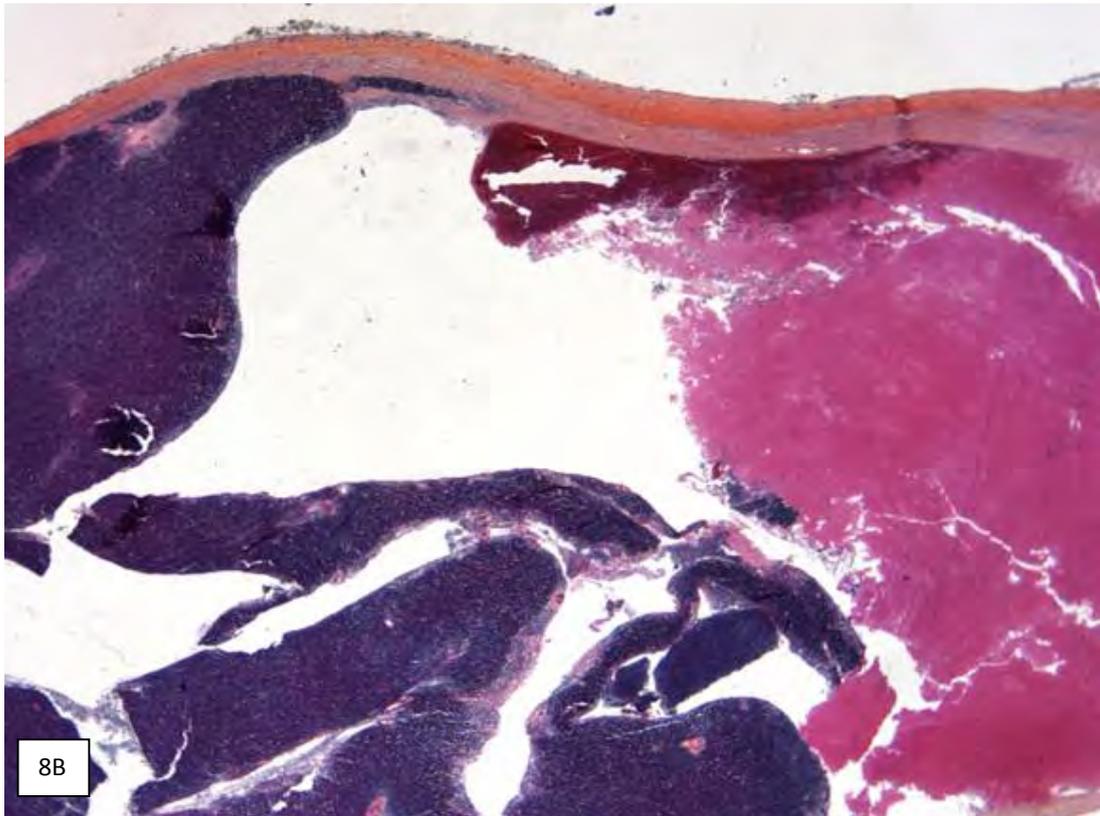


Figure 8B : Thymome B1 bien encapsulé, kystique et d'aspect basophile « bleu » (x2)

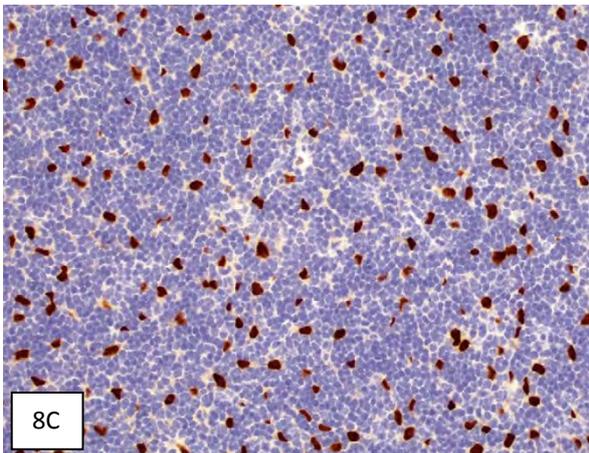


Figure 8C: Présence de rares cellules tumorales P63+ dans un fond lymphocytaire important

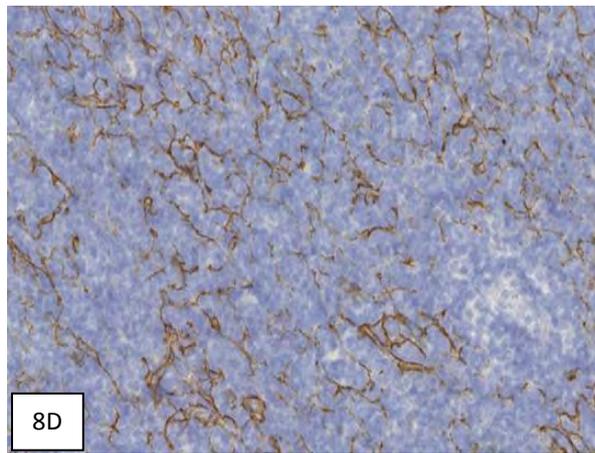


Figure 8D : marquage dendritique en réseau par les cytokératines AE1/AE3 (x10)

2.8. Thymome B2

C'est le plus fréquent des sous types de thymome. Il est de grade intermédiaire, composé de grandes cellules épithéliales dans un fond abondant de petits lymphocytes immatures non tumoraux. L'âge moyen de survenue est 50 ans. L'agressivité est supérieure à celle des B1 et l'on diagnostique cette forme à des stades plus avancés. Souvent invasif, il n'est pas résecable chirurgicalement dans 5 à 10% des cas. La survie à 10 ans se situe entre 70 et 80%.

2.8.1. Macroscopie

Macroscopiquement, habituellement encapsulé ou plus vaguement délimité, il peut envahir la graisse médiastinale ou les organes adjacents. A la coupe, l'aspect est celui de nodules blancs grisâtres fermes ou plus mous séparés par des travées fibreuses. Des remaniements kystiques ou hémorragiques peuvent être retrouvés.

2.8.2. Histologie

Histologiquement, il s'agit d'une tumeur lobulée avec des travées fibreuses (Fig. 9A). Cette tumeur est composée de grandes cellules épithéliales polygonales au cytoplasme abondant. Les noyaux sont nucléolés et la chromatine est vésiculeuse. Il s'y associe de nombreux lymphocytes T immatures non tumoraux (Fig.9B).

Les cellules épithéliales forment un réseau lâche, et se regroupent en petits « clusters » dans la zone corticale. Les espaces péri-vasculaires caractérisés par la présence autour d'un vaisseau d'un espace clair rempli de lymphocytes sont nombreux (Fig.9C). Les corpuscules de Hassal peuvent être visibles. Des follicules lymphoïdes sont volontiers retrouvés en cas de myasthénie grave associée. L'association avec le thymome B3 est fréquente (environ 25% des cas). Dans ce cas les contingents sont bien individualisables, et les plages de thymome B3 sont faites de cellules épithéliales cohésives avec peu de lymphocytes.

2.8.3. Immunohistochimie

En immunohistochimie, les cytokératines mettent en évidence un réseau de cellules épithéliales plus structuré que dans le B1 (Fig.9D). Le marquage par P63 montre des amas de plus de trois cellules épithéliales (Fig.9E). Les lymphocytes ont un profil identique au thymome B1 et expriment donc les marqueurs suivants, CD1a, CD99, TdT et CD3.

2.8.4. Diagnostics différentiels

- Thymomes B1 : d'aspect plus organoïde, plus pauvres en cellules épithéliales, ils renferment moins d'espaces péri-vasculaires, la p63 aide à les distinguer en montrant les regroupements de plus de trois cellules dans les thymomes B2.

- Thymomes B3 : plus pauvres en lymphocytes, ils sont composés de cellules épithéliales confluentes avec des atypies nucléaires modérées et donnent l'impression au faible grossissement d'une couleur rose (« pink pattern ») par opposition aux thymomes B2 , qui donnent l'impression d'une couleur bleue (« blue pattern ») en raison de leur plus grande richesse en lymphocytes Dans les thymomes B3, on peut compter les lymphocytes marqués par la TdT, alors que cela n'est pas possible dans les thymomes B2. Néanmoins il y a des cas frontières (7).

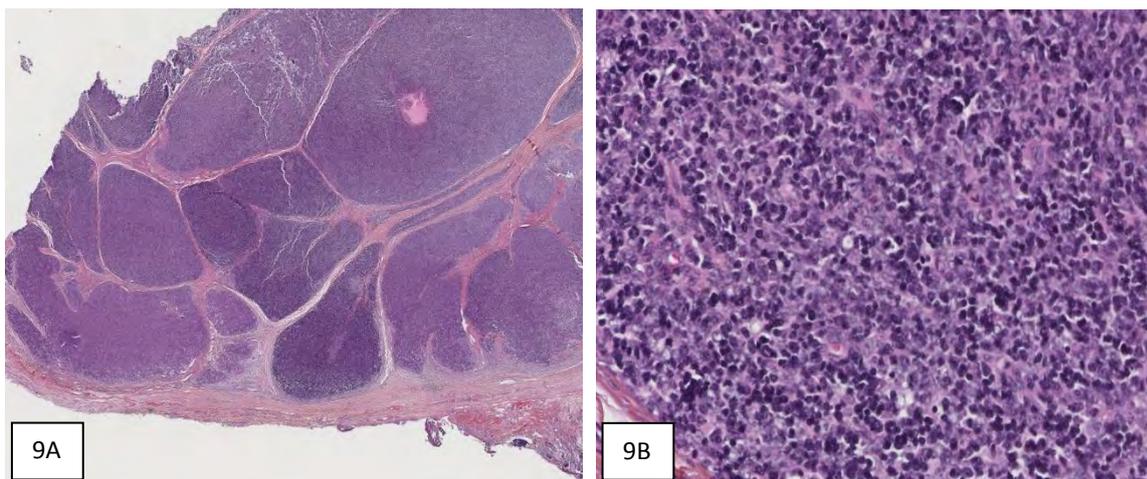


Figure 9A : Thymome B2 : aspect lobulé (x5)

Figure 9B: Thymome B2 : regroupement de cellules épithéliales donnant un aspect plus clair (x40)

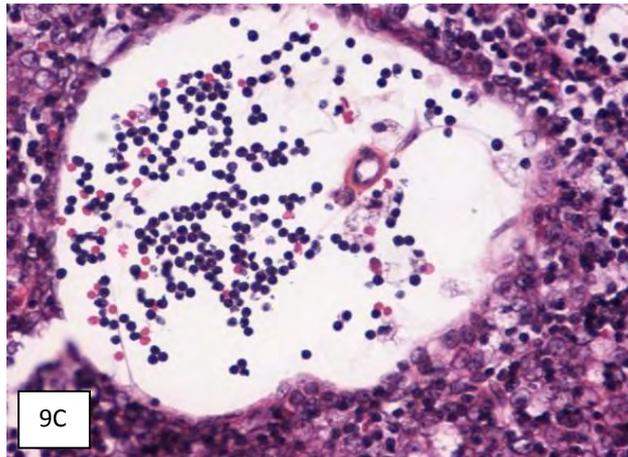


Figure 9C : Thymome B2 : espace périvasculaire (x20)

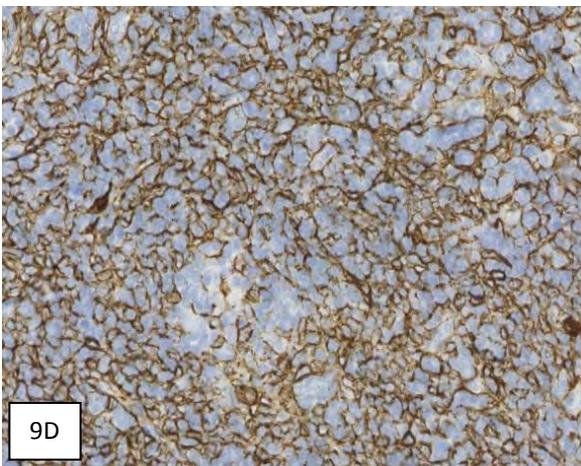


Figure 9D : marquage en réseau plus cohésif que dans un B1 avec AE1/AE3 (x10)

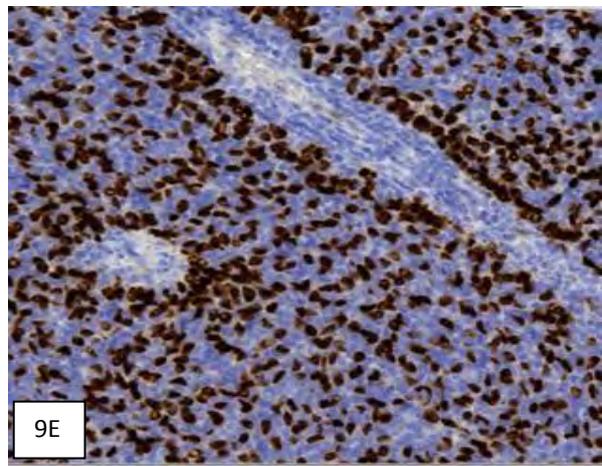


Figure 9E : petits amas de cellules épithéliales mis en évidence par P63 (x20)

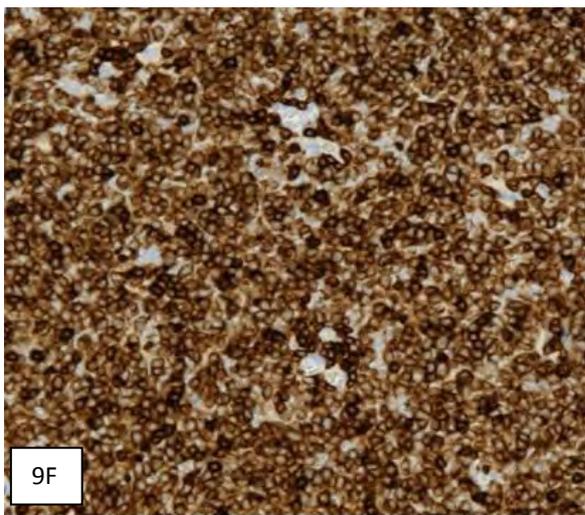


Figure 9F : Thymome B2 : marquage intense des lymphocytes avec CD5 (x10)

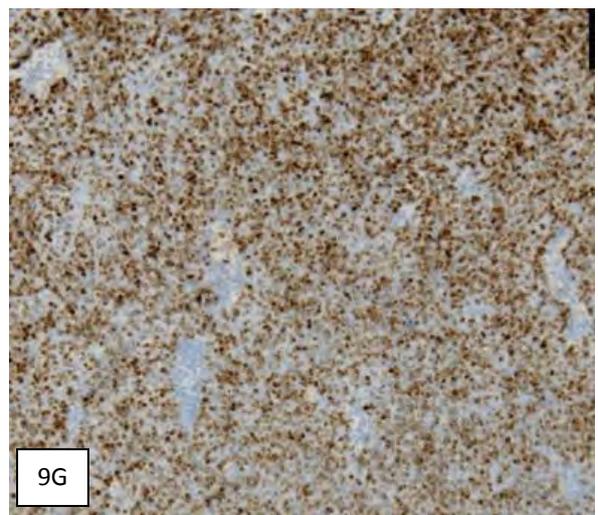


Figure 9G : Thymome B2 : marquage de nombreux lymphocytes immatures avec TdT (x10)

2.9. Thymome B3

Il s'agit d'un thymome de grade intermédiaire, composé de plages de cellules épithéliales rondes ou polygonales de tailles moyennes. Les atypies sont discrètes accompagnées de peu ou pas de lymphocytes. Il représente moins de 25% des thymomes et l'âge de survenue est situé entre 45 ans et 50 ans. Le symptôme le plus fréquent est la myasthénie. L'exérèse chirurgicale est souvent difficile ou impossible sans un traitement néo adjuvant. Les métastases et les récives locales sont fréquentes. La survie à 10 ans varie entre 50% et 70%.

2.9.1. Macroscopie

Macroscopiquement, il est généralement non encapsulé et s'étend souvent aux organes adjacents ainsi qu'à la graisse médiastinale. A la coupe, les nodules sont blancs grisâtres, fermes et séparés par des travées fibreuses épaisses. Il peut exister des remaniements kystiques ou calciques.

2.9.2. Histologie

Il se présente sous forme de lobules à contours nets délimités par des travées fibreuses épaisses. Les lymphocytes sont absents ou très rares lui conférant son aspect « pink pattern » (Fig10A-D). Les cellules tumorales sont polygonales, de taille moyenne. Les cytoplasmes sont à limite nette, responsables d'un aspect cohésif de la prolifération. Les noyaux sont ronds, ovales ou parfois plus allongés avec des contours irréguliers. Ils sont plus petits que ceux du thymome B2, mais plus atypiques et les nucléoles sont moins proéminents. On retrouve un agencement volontiers palissadique autour des espaces péri vasculaires et le long des septas (Fig.10E et 10F).

2.9.3. Immunohistochimie

En immunohistochimie, les cellules épithéliales sont fortement marquées par les cytokératines (Fig10G). Habituellement elles sont négatives avec le CD5, le CD117 et le CD20. Les rares lymphocytes immatures parfois présents sont marqués avec la TdT et CD1a (Fig10H).

2.9.4. Diagnostics différentiels

- Le thymome B2 : dont les critères distinctifs sont abordés dans le chapitre correspondant.

- Les carcinomes épidermoïdes de bas grade doivent être éliminés : ils n'ont pas l'organisation architecturale organoïde du thymome et expriment en général le CD5. Ils peuvent aussi présenter des foyers de kératinisation et des ponts intercellulaires.

- Le thymome A : absence d'espaces péri vasculaires, cytologie beaucoup plus régulière, et expression du CD20 sont les critères habituels de distinction.

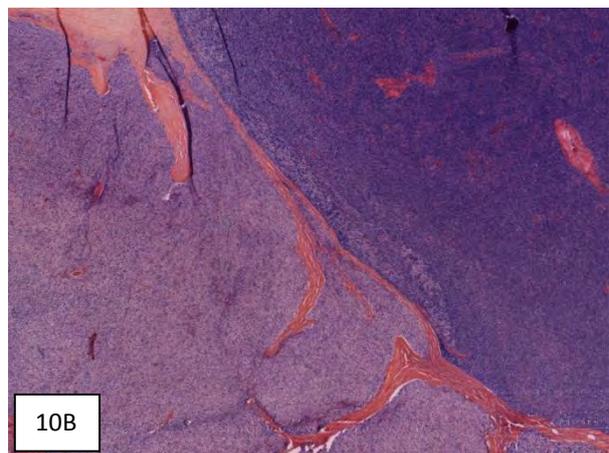
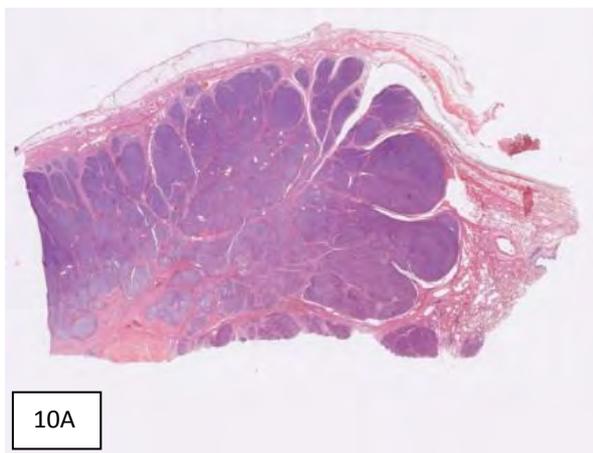


Figure 10A : Thymome B3 : aspect rose (pink pattern) (panorama)

Figure 10B : Thymome B2/B3 : blue pattern (B2) versus pink pattern (B3) (x2)

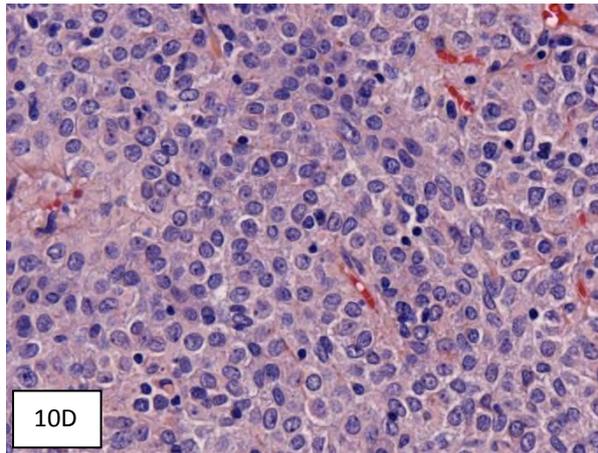
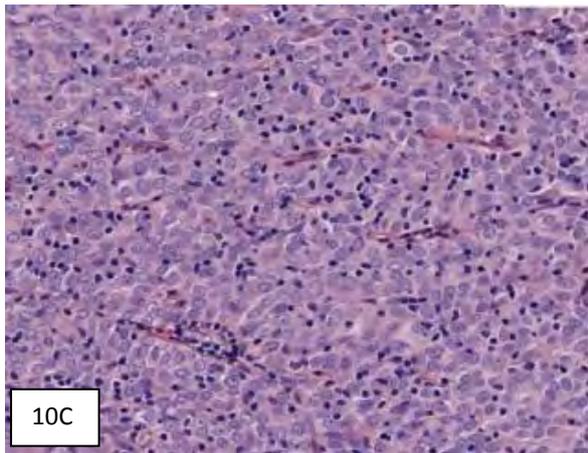


Figure 10C-D : Thymome B3 : aspect rose (pink pattern) avec très peu de lymphocytes (x20)

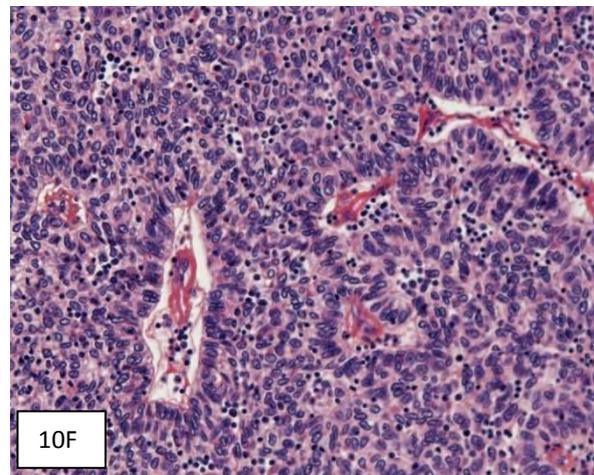
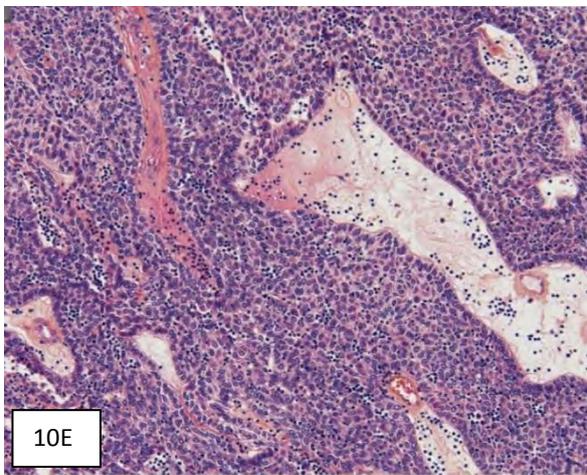


Figure 10E-F : Thymome B3 : présence de nombreux espaces péri vasculaires. (x10) et (x20)

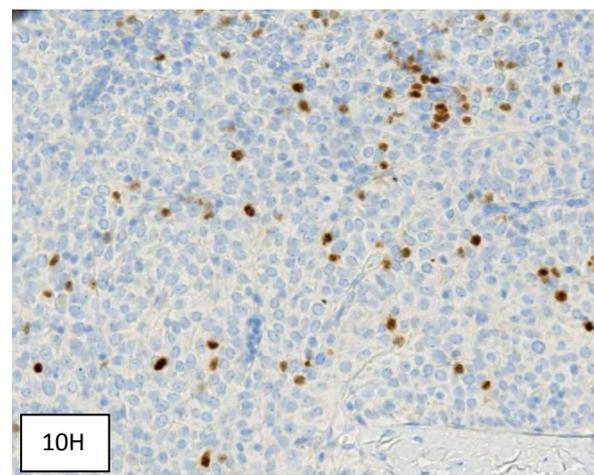
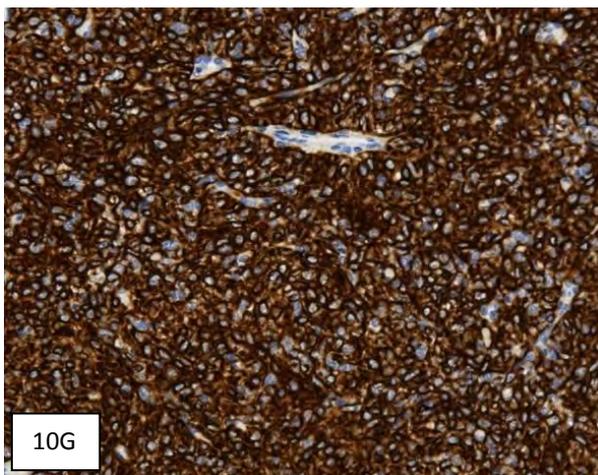


Figure 10G : Thymome B3 : marquage en réseau dense par AE1/AE3 (x20)

Figure 10H : Thymome B3 : marquage de rares lymphocytes immatures avec TdT (x20)

2.10.Carcinome thymique

Il s'agit de la tumeur maligne thymique. Elle possède des atypies cytologiques, une invasion évidente, et elle perd l'architecture organoïde thymus-like. L'âge de survenue est majoritairement supérieur à 50 ans avec des cas pouvant survenir à un âge avancé.

Il s'agit d'une tumeur rare, beaucoup plus rare que l'invasion du médiastin antérieur et du thymus par une tumeur provenant d'un autre organe. Le cas le plus fréquent étant constitué par l'extension de voisinage d'une tumeur primitive pulmonaire.

Cliniquement, les patients sont symptomatiques (douleur thoracique, dyspnée ou syndrome cave supérieur). Le pronostic dépend du sous type histologique.

2.10.1.Macroscopie

Macroscopiquement, il s'agit d'une tumeur non encapsulée mal limitée, ne possédant pas de travées fibreuses disséquant. A la coupe, la couleur varie du jaune au gris-blanc. La consistance est ferme. Des remaniements hémorragiques et nécrotiques peuvent être associés. Cependant, le diagnostic se fait le plus souvent sur matériel biopsique du fait de l'extension tumorale.

2.10.2.Histologie

Histologiquement, l'aspect est proche de celui des carcinomes des autres organes. Les atypies cytologiques sont évidentes et il y'a une perte de l'architecture organoïde. En effet, les massifs tumoraux présentent des contours très irréguliers, disséqués par un stroma fibreux et inflammatoire qualifié de desmoplasique (Fig.11A-F). On peut voir un fond de lymphocytes B matures à la différence des thymomes qui ont plutôt des lymphocytes T immatures.

Il existe plusieurs sous-types histologiques. Le plus fréquent est le carcinome variant épidermoïde ou l'on peut trouver une kératinisation abrupte simulant des corpuscules de Hassal. Les autres sous-types sont moins fréquents, il s'agit du carcinome basaloïde, du

carcinome mucoépidermoïde, du carcinome lymphoépithélial, du carcinome montrant des éléments thymus like (CASTLE), du carcinome sarcomatoïde, et autres carcinomes plus exceptionnels.

2.10.3. Immunohistochimie

En immunohistochimie, les cellules épithéliales tumorales sont positives avec les cytokératines et l'EMA. Le marquage avec CD5 et CD117 est très fréquent (Fig.11G-J). Suivant les sous-types, le profil d'expression sera variable (exemple : marquage avec CK5/6 et P63 dans le sous type épidermoïde). Absence d'expression avec TdT.

2.10.4. Diagnostics différentiels

L'extension médiastinale d'un cancer bronchique et le thymome B3 sont les deux diagnostics différentiels qui posent le plus de problèmes.

- La métastase d'un carcinome, bronchique le plus souvent sera en règle négative avec les marqueurs CD5 et CD117.

- L'absence de ponts intercellulaires, la bonne limitation des massifs tumoraux, la présence d'espaces périvasculaires, l'absence de stroma desmoplasique orienteront plutôt vers un thymome B3. L'immunohistochimie aide aussi avec une absence de marquage avec CD5 dans le thymome B3, mais en cas d'incohérence, elle ne peut faire changer de diagnostic que si les critères morphologiques sont suffisants.

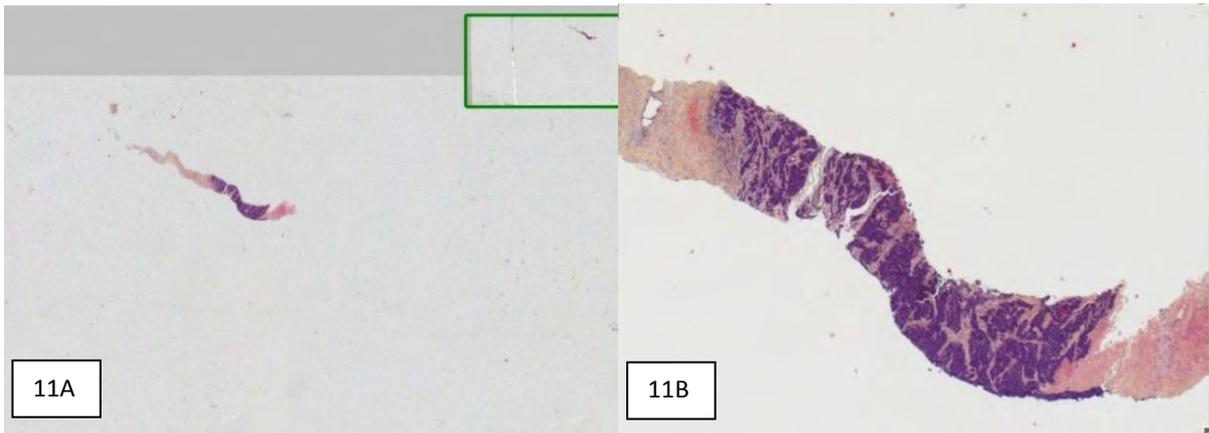


Figure 11A : Biopsie carcinome thymique (faible quantité de matériel) (panorama)

Figure 11B : Biopsie carcinome thymique (faible quantité de matériel) (x5)

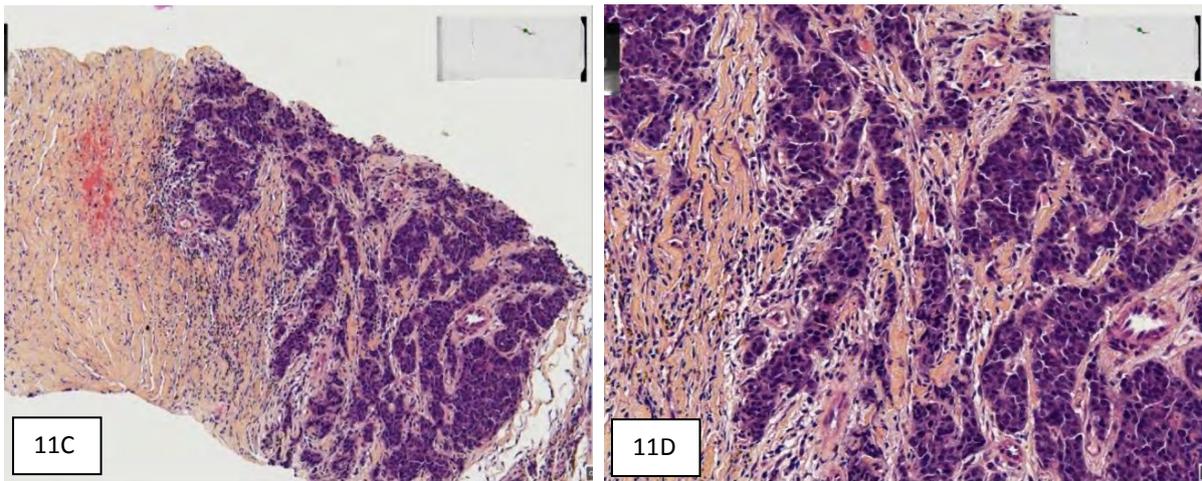
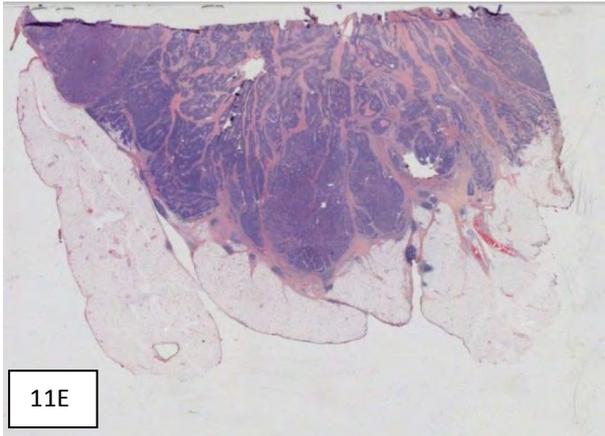
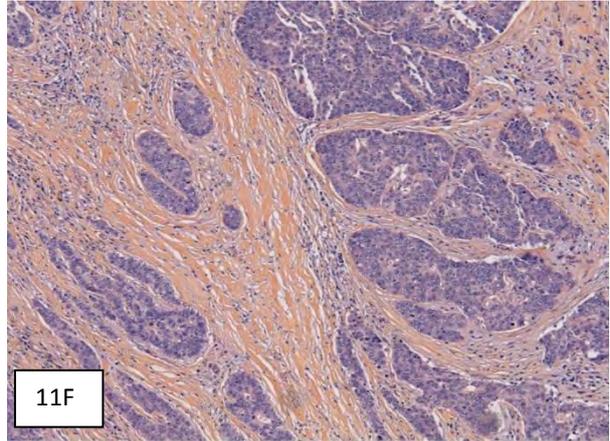


Figure 11C-D : Biopsie carcinome thymique : aspect infiltrant avec stroma réaction (x10)



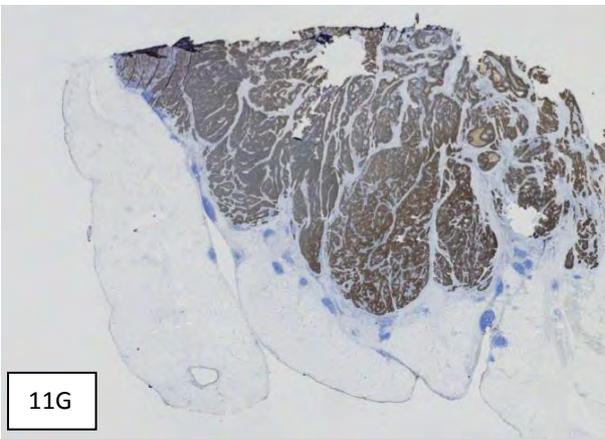
11E



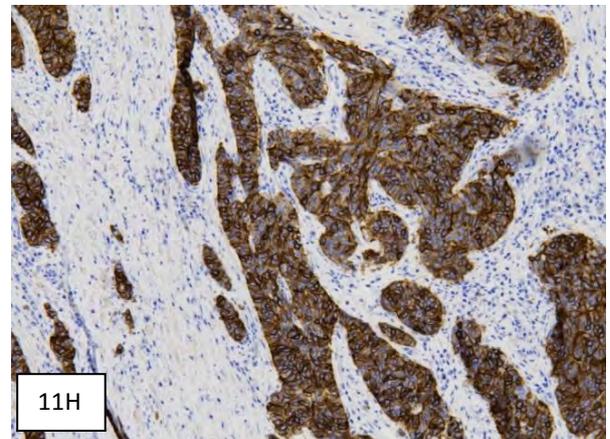
11F

Figure 11E : Pièce opératoire de carcinome thymique (panorama)

Figure 11F : massifs à contours irréguliers avec stroma réaction desmoplasique (x20)

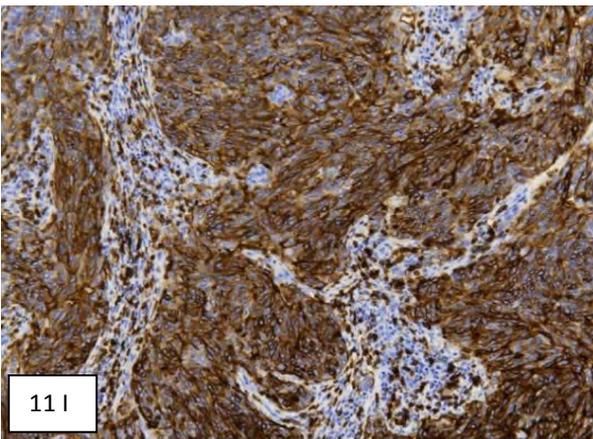


11G

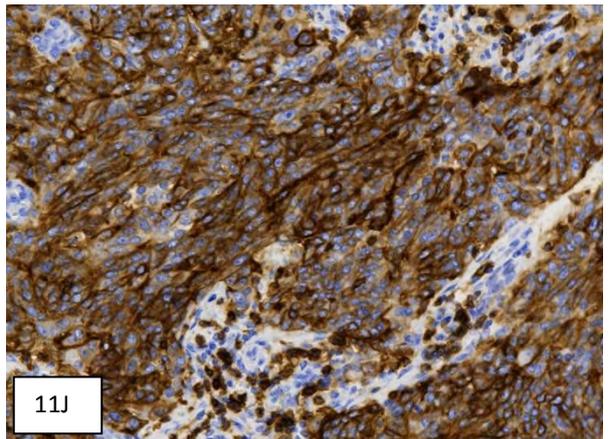


11H

Figure 11G-H: Marquage intense des cellules tumorales avec CD117 (panorama) et (x10)



11I



11J

Figure 11 I-J : marquage intense des cellules tumorales avec CD5 (x10) et (x20)

3. MODALITES THERAPEUTIQUES

3.1. Eléments du diagnostic devant une masse médiastinale antérieure

La prise en charge diagnostique doit intégrer les éléments de diagnostic positif et de diagnostic différentiel face à une masse médiastinale antérieure. Il n'y a pas à ce jour de classification cTNM.

Une tumeur intra thymique parfaitement encapsulée est habituellement réséquée d'emblée. En cas de résécabilité douteuse, une preuve histologique doit être apportée par une biopsie de taille suffisante. La méthode de biopsie doit éviter l'ensemencement tumoral iatrogénique en respectant l'espace pleural. La ponction biopsie transpariétale peut être une alternative. La médiastinoscopie et la cytoponction ne sont pas recommandées.

Il est recommandé de faire un bilan d'extension complet avec notamment un dosage des LDH pour s'orienter vers un lymphome et un dosage de l'AFP et des β -hCG chez les hommes pour éliminer une tumeur germinale.

3.2. Bilan pré thérapeutique

Une fois le diagnostic suspecté ou établi sur un prélèvement biopsique, il faut faire un bilan pré thérapeutique qui comprend :

- une radiographie thoracique
- une tomodensitométrie (TDM) thoracique, voire une IRM thoracique s'il existe des doutes sur une hyperplasie thymique.
- un TEP-Scan est recommandé devant une tumeur invasive ou récidivante.
- des épreuves fonctionnelles respiratoires (EFR) seront également nécessaires pour évaluer l'opérabilité, le retentissement respiratoire et la gravité devant une tumeur de grande taille ou compressive.
- le TDM avec reconstruction vasculaire, est l'examen idéal devant une suspicion de compression vasculaire.
- une endoscopie bronchique sera réalisée en cas d'atteinte bronchique.
- des examens biologiques à la recherche d'une myasthénie (acétylcholine) et un syndrome auto-immun (hémogramme, électrophorèses des protéines sériques avec dosage pondéral des immunoglobulines, puis des anticorps anti nucléaires et un dosage de la TSH) seront recommandés.

L'ITMIG a récemment proposé des critères d'interprétation de l'imagerie des tumeurs thymiques (8).

3.3. Chirurgie

La chirurgie devra être effectuée par un chirurgien qualifié en chirurgie thoracique.

Avant tout geste, le patient devra être évalué par un anesthésiste, jugé stable, et il faudra avoir contrôlé les manifestations cliniques pouvant accompagner des troubles auto immuns ou une myasthénie.

L'objectif de la chirurgie est tout d'abord d'évaluer le stade anatomo chirurgical. Dans les tumeurs invasives, seule l'exérèse monobloc garantit un bon pronostic à long terme.

Les recommandations chirurgicales sont une thymectomie totale emportant le thymome avec tout le thymus ainsi que la graisse périthymique (9). Il ne faut pas ouvrir l'interface tumorale. Si des ganglions suspects sont repérés, une exérèse de ceux-ci est nécessaire afin d'en évaluer l'envahissement.

L'approche opératoire va dépendre de la localisation et de l'étendue de la tumeur. La voie d'abord élective est la sternotomie médiane. D'autres solutions de recours peuvent être envisagées en cas de tumeurs volumineuses ou lorsqu'il existe une extension pleurale ou bien lorsqu'une exérèse pulmonaire est prévue.

La chirurgie de réduction est une solution qui peut être discutée dans des cas précis afin de faciliter la réalisation de la radiothérapie. Son intérêt en termes de survie semble limité (10).

En cas de récurrence des exérèses itératives peuvent permettre d'apporter des survies prolongées.

Certaines équipes ont décrit la faisabilité de la chirurgie « mini invasive ». Elle nécessite un équipement adapté (chirurgie vidéo assisté, chirurgie robotique). L'objectif est de faire une résection complète de la tumeur, du thymus résiduel, de la graisse péri thymique et de la plèvre médiastinale antérieure en évitant un écartement costal ou une sternotomie.

Parmi les recommandations proposées par l'ITMIG, le chirurgien peut repérer la pièce par l'intermédiaire de fils mais aussi en la déposant sur un calque d'orientation. Il pourra notamment y rajouter des annotations (Fig. 12).

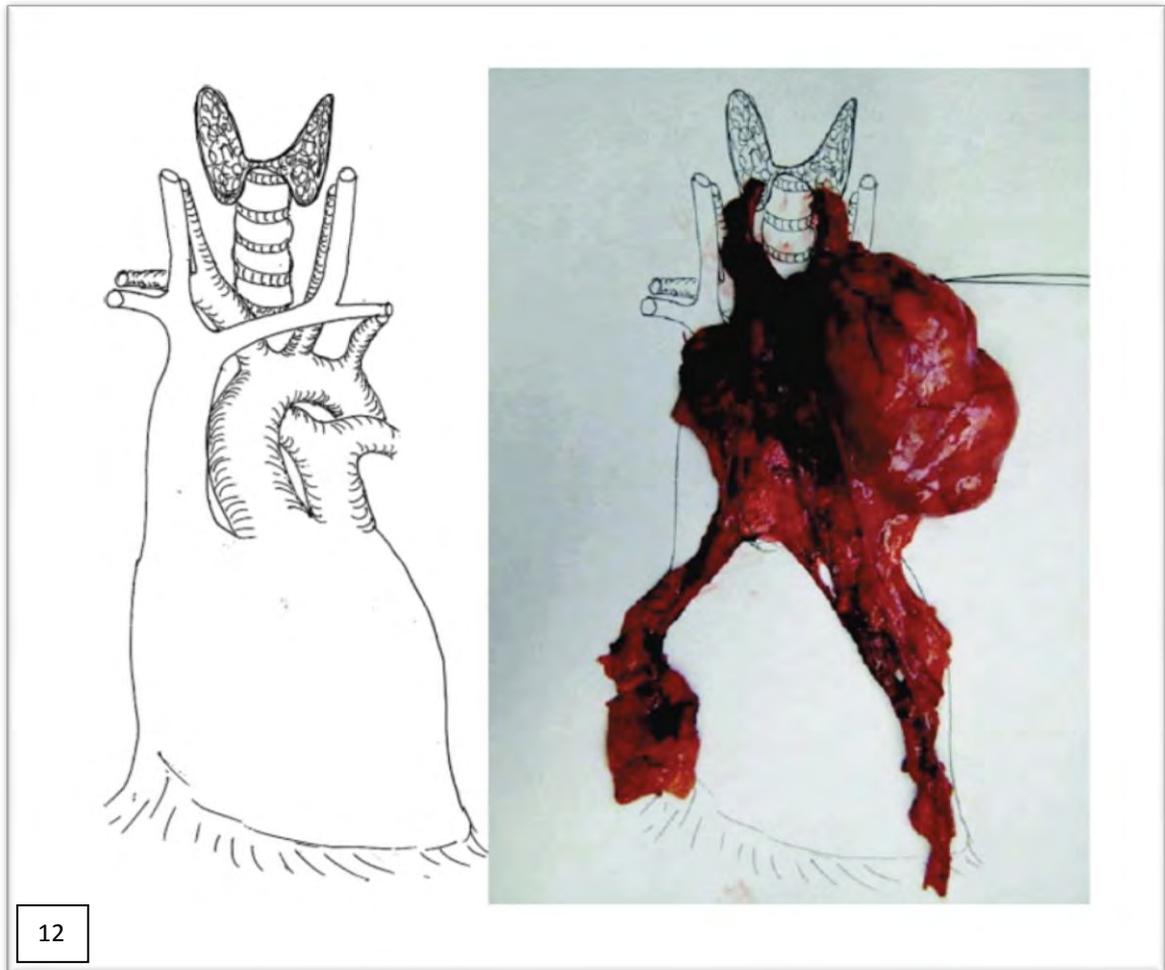


Figure 12 : Exemple de schéma utilisé pour l'orientation des pièces

3.4. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement loco-régional basé sur l'irradiation.

Il est nécessaire de bien connaître, à la fois la région à irradier, de trouver la dose et la fréquence d'irradiation pour permettre une efficacité thérapeutique en étant le moins délétère possible. On utilise pour cela une technique de radiothérapie externe, la radiothérapie conformationnelle 3D.

Au niveau des volumes cibles, il est recommandé d'irradier la totalité de la loge thymique ainsi que d'éventuelles extensions tumorales (péricarde, gros vaisseaux, plèvre, poumon,...), Ces volumes sont définis grâce à l'imagerie pré et post opératoire, à la description per opératoire et à la mise en place de clips radio opaques. Si le traitement était basé sur une chimiothérapie néo-adjuvante, le volume sera défini en post thérapeutique.

Les doses sont à adapter pour chaque patient et il n'y a pas de consensus. En cas de résection incomplète, il y aura une surimpression des zones à risque repérées par des clips en per opératoire.

La radiothérapie doit être débutée dans les 3 mois suivant la chirurgie.

Les indications sont :

-Une radiothérapie post-opératoire sera proposée en cas de carcinomes thymiques quelle que soit la qualité de la résection.

-Pour les thymomes, elle sera proposée en cas de résection incomplète (R1).

-En cas de résection complète, une radiothérapie sera proposée pour les stades III de Masaoka-Koga ou stade II, IIIA et IIIB de la classification TNM 2015.

-Une radiothérapie pourra être discutée pour les stades IIa de Masaoka-Koga des thymomes B3, et pour les stades IIb de Masaoka-Koga des thymomes B2 et B3.

-Il n'est pas conseillé de faire de radiothérapie post-opératoire dans les stades I, les stades IIa s'il s'agit d'un thymome A, AB, B1 ou B2, ou pour les stades IIb s'il s'agit d'un thymome A, AB ou B1.

Ces indications sont synthétisées au sein du tableau 7.

Tableau 7 : Proposition de stratégie pour la radiothérapie post-opératoire

| | Stade TNM 2015 | Masaoka-ITMIG | Sous types | Radiothérapie post-opératoire |
|---------------------------|----------------|---------------------------|------------------|-------------------------------|
| THYMOME R0 | Stade I | Stade I | | NON |
| | | Stade IIa | A-B1-B2 | NON |
| | | | B3 | A discuter |
| | | Stade IIb | A-B1 | NON |
| | | | B2-B3 | A discuter |
| | | Stade II IIIA IIIB | Stade III | |
| THYMOME R1 | | | OUI | |
| CARCINOME THYMIQUE | | | OUI | |

3.5. Chimiothérapie

La chimiothérapie est un traitement comportant l'administration per os ou en intra veineux ayant pour but d'empêcher les cellules tumorales de se multiplier.

Pour les tumeurs thymiques la chimiothérapie à 2 indications.

Dans le cas d'une tumeur localement avancée, la chimiothérapie sera proposée en 1^{ere} intention (néoadjuvante) lors de la RCP, et sera dite « d'induction ». Elle aura pour but de diminuer le volume tumoral pour permettre une exérèse chirurgicale secondaire ou une radiothérapie séquentielle. Le taux de réponse est compris entre 70% et 80% ce qui permet d'atteindre au final une exérèse complète dans 30 à 50% des cas (11). Les patients ayant peu ou pas répondu se verront proposer une irradiation séquentielle.

L'autre indication est la tumeur métastatique ou récidivante, non résécable et dont le traitement reposera uniquement sur la chimiothérapie. Le taux de réponse compris entre 20% et 60% est plus faible que celui obtenu lorsque la chimiothérapie est pré-opératoire

Le protocole CAP est le plus fréquemment utilisé et celui donnant probablement les meilleurs taux de réponse. Il associe 3 molécules, le Cisplatine (50mg/m²), l'Adriamycine (50mg/m²) et le Cyclophosphamide (500mg/m²) (12).

L'utilisation de la chimiothérapie en post opératoire après une résection R0 ou R1 n'est pas recommandée.

3.6. Thérapies ciblées

En l'absence d'anomalie moléculaire driver, les thérapies ciblées ne sont ni un standard ni d'une utilisation courante pour le traitement des tumeurs épithéliales thymiques et nécessitent d'être validées en réunion de concertation pluridisciplinaire nationale.

Quelques mutations du gène KIT ont été ponctuellement rapportées et peuvent être sensibles au sunitinib ou au sorafenib, mais la stabilisation de la maladie induite par ces molécules est aussi observée en dehors de ces mutations et pourrait être liée à leur effet anti-angiogénique (13).

Les inhibiteurs de mTOR (évérolimus) peuvent représenter une alternative après discussion en réunion de concertation pluridisciplinaire de recours.

Il est recommandé d'inclure les patients porteurs de tumeurs thymiques réfractaires dans des protocoles de phase I.

Enfin l'émergence de l'immunothérapie, isolée ou associée au traitement classique pourra peut-être apporter d'autres atouts thérapeutiques pour ces patients échappant aux thérapies classiques.

3.7. Surveillance

Il n'y a aujourd'hui aucune donnée objective sur le suivi à effectuer. Le rythme de surveillance doit être adapté à l'agressivité de la tumeur. Pour les tumeurs invasives, c'est-à-dire à partir du stade II, un TDM thoracique annuel est recommandé, et ce pendant au moins 15 ans car le risque de rechutes tardives reste conséquent.

Il conviendra de surveiller les anticorps anti récepteurs à l'acétylcholine chez les patients myasthéniques, car la persistance de ces derniers après chirurgie est un facteur prédictif de crise myasthénique. Celle-ci peut survenir de manière spontanée ou provoquée (médicament, infection, stress) et ce, sans récurrence de la tumeur thymique.

3.8. Synthèse des indications thérapeutiques

Les modalités thérapeutiques sont discutées dans le cadre des RCP régionales et nationales mises en place par le réseau RYTHMIC. Une fois le diagnostic établi, plusieurs modalités thérapeutiques peuvent être envisagées selon l'extension tumorale:

- Chirurgie de première intention suivie ou non d'une radiothérapie post-opératoire.
- Chimiothérapie néoadjuvante suivie d'une chirurgie, d'une radiothérapie séquentielle, ou d'une chimiothérapie adjuvante.

Le tableau 8 résume les principales indications thérapeutiques en fonction du stade de Masaoka, de la qualité de l'exérèse chirurgicale, du diagnostic, de la présence de greffes pleurales résécables ainsi que de métastase.

Tableau 8 : Synthèse des indications thérapeutiques

| STADE | | PROPOSITION THERAPEUTIQUE |
|------------------|----------------------------------|--|
| Stade I | Exérèse complète | Chirurgie seule |
| Stade IIa | Exérèse complète (A, AB, B1, B2) | Chirurgie + Radiothérapie discutée selon envahissement microscopique de la capsule |
| | Exérèse complète (B3-CT) | Chirurgie + Radiothérapie |
| Stade IIb | Exérèse complète (B2-CT) | Chirurgie + Radiothérapie post-op |
| Stade III | Résécable | Chirurgie + Radiothérapie |
| | Non résécable | Chimio NA + Chirurgie et/ou Radiothérapie |
| Stade IVa | Greffes pleurales résécables | Chimio NA + Chirurgie + Radiothérapie médiastinale et pleurale |
| | Greffes pleurales non résécables | Chimio NA +/- Chirurgie +/- Radiothérapie |
| Stade IVb | | Chimio NA +/- Chirurgie et/ou Radiothérapie |

Synthèse des indications thérapeutiques selon la stadification Masaoka- ITMIG :

- stade I : si l'exérèse est complète : pas de traitement complémentaire.
- stade IIa : si l'exérèse est complète : seules les tumeurs très agressives (thymome B3 et carcinome thymique) auront de la radiothérapie complémentaire. Elle pourra être discutée en fonction de l'envahissement microscopique de la capsule dans des tumeurs moins agressives.
- stade IIb : si l'exérèse est complète : les tumeurs agressives (thymome B2, thymome B3 et carcinome thymique) auront de la radiothérapie post-opératoire pour diminuer le risque de récurrence locale.
- stade III : si la tumeur est résécable, la chirurgie sera suivie d'une radiothérapie complémentaire. Si la tumeur n'est pas résécable, une chimiothérapie néo-adjuvante précèdera la chirurgie et/ou la radiothérapie. Si l'exérèse est incomplète une radio-chimiothérapie en première intention suivie d'une radiothérapie post-opératoire pourra être discutée.
- stade IVa : s'il y a des greffes pleurales résécables, on discutera une chimiothérapie néo adjuvante. La chirurgie sera suivie d'une radiothérapie médiastinale et pleurale. En cas de greffes pleurales non résécables, la chimiothérapie néo-adjuvante sera suivie si possible de la chirurgie et de la radiothérapie.
- stade IVb : en cas de métastases, une chimiothérapie néo-adjuvante sera proposée avant d'envisager une éventuelle chirurgie et/ou radiothérapie.

4. PROBLEMATIQUE THYMOMES B3 / CARCINOMES THYMIQUES

4.1 Le problème du diagnostic différentiel

Le diagnostic différentiel entre le thymome B3 et les carcinomes thymiques repose sur la morphologie et sur l'examen immunohistochimique.

Dans la forme habituelle du carcinome, l'architecture se fait sous un mode infiltrant avec des amas à contours irréguliers dans un stroma desmoplasique, et des plages de nécrose peuvent être retrouvées. La cytologie est atypique avec des mitoses nombreuses. D'un point de vue immunohistochimique les cellules tumorales sont CD5+, CD117+, AE1/AE3 fortement positives et on n'identifie pas de lymphocytes TdT+.

Il existe des cas frontières difficiles, comme des carcinomes thymiques pouvant ne pas exprimer CD5 ou des thymomes B3 atypiques dépourvus de lymphocytes immatures TdT+.

4.2 Le problème de la thérapeutique

Les thymomes B3 et les carcinomes thymiques sont plus volontiers de stade de Masaoka III ou IV : dans ces cas, l'exérèse chirurgicale n'est pas toujours envisageable et souvent incomplète. Comme on vient de le voir les tumeurs agressives sont traitées par des associations thérapeutiques comportant chirurgie, chimiothérapie néo-adjuvante ou adjuvante, souvent associées à la radiothérapie. Les réponses thérapeutiques et les survies à 10 ans sont faibles et on ne dispose pas de thérapies ciblées.

4.3 L'immunothérapie : un espoir ?

L'émergence de l'immunothérapie pourrait être un choix supplémentaire dans la batterie thérapeutique. Les molécules sont nombreuses et ciblent différentes voies. L'inhibition de la voie PD1/PDL1 est une piste thérapeutique nouvelle et intéressante qui a montré son intérêt dans plusieurs tumeurs solides dans le but de restaurer l'efficacité du système immunitaire contre la cellule tumorale.

5. SYSTEME ET CHECKPOINTS IMMUNITAIRES

5.1 Système immunitaire

5.1.1 Généralités

L'immunité fait référence aux mécanismes de défense d'un organisme vivant contre des agents étrangers, infectieux ou tumoraux, susceptibles de menacer son bon fonctionnement ou sa survie. Les cellules communiquent entre elles soit par contact direct (notion de récepteur-ligand) soit à distance par le biais de molécules sécrétées (notion de récepteur-médiateur). Ces molécules sécrétées, solubles, sont appelées les cytokines.

La réaction coordonnée de ces 2 mécanismes constitue la réponse immunitaire. Sur le plan physiologique, le système immunitaire joue un rôle important pour empêcher la prolifération tumorale.

L'organisme dispose de 2 systèmes de défense : l'immunité innée et l'immunité adaptative.

5.1.2 Immunité innée

L'immunité innée, encore appelé naïve ou naturelle, correspond à une réponse constitutive d'action immédiate, non spécifique et non adaptative. Elle repose sur une distinction globale du soi et non-soi. Celle-ci passe par le fait que les cellules de l'immunité innée expriment un ensemble de récepteurs capables de reconnaître différents motifs moléculaires. Elle fournit une réponse immédiatement recrutée en attendant que l'immunité acquise devienne opérationnelle. Elle repose sur des mécanismes humoraux (complément, cytokines, protéines de la phase aiguë de l'inflammation,...) et cellulaires (cellules à fonction phagocytaire ou lytique, telles que les polynucléaires, les cellules tueuses naturelles, ou NK pour « Natural Killer », macrophages,...). A noter que les cellules NK vont lyser les cellules qui à la différence des cellules normales n'expriment plus les molécules KIR (Killer cell Ig-like Receptor) qui inhibent les fonctions cytotoxiques des NK.

5.1.3 Immunité adaptative

L'immunité adaptative ou acquise est une réponse spécifique de l'antigène du fait que les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes, portent un seul type de récepteur capable de reconnaître un déterminant antigénique (encore appelé épitope). Elle repose sur une distinction très fine de l'antigène associé aux tumeurs. Elle est de mise en œuvre plus lente, apparaît plus tardivement mais permet de défendre plus efficacement. (14). Les cellules présentatrices d'antigènes (cellules dendritiques, macrophages,...) vont après avoir phagocyté l'élément du « non soi » le présenter par l'intermédiaire du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) aux lymphocytes T, ce qui va entraîner toute une série d'évènements aboutissant à la réponse immunitaire (15). Les cellules de l'immunité adaptative sont les lymphocytes B et T. Ils sont respectivement responsables de l'immunité humorale et cellulaire. Les lymphocytes B peuvent reconnaître les épitopes dans leur forme native alors que les lymphocytes T reconnaissent les épitopes sous forme de peptides à condition qu'ils soient présentés par des molécules du CMH.

Pour les lymphocytes T CD8 cytotoxiques, la reconnaissance se fait par l'intermédiaire du CMH de classe I situé à la surface de toutes les cellules. Cette reconnaissance du complexe CMH-peptide via leur T Cell Receptor (TCR) les active et induit leur fonction cytotoxique.

Les lymphocytes B produisent les anticorps qui peuvent reconnaître directement des antigènes associés aux tumeurs et interférer avec le développement tumoral via différents mécanismes dont le principal est la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC : Antibody Dependent Cell Cytotoxicity).

5.1.4 Interaction immunité innée versus immunité adaptative

Au cours de la réponse immunitaire, il existe une interaction étroite entre l'immunité innée et adaptative. C'est là qu'intervient notamment le rôle des cellules présentatrices d'antigène qui permettent de présenter les peptides antigéniques aux lymphocytes T. Il existe aussi de nombreuses coopérations cellulaires entre les lymphocytes B et T pour aboutir à une réponse humorale efficace, mais également entre les lymphocytes T CD4 et CD8 pour aboutir à une réponse cellulaire efficace.

5.2 Les mécanismes d'échappement à l'immunosurveillance

Pour déjouer le système immunitaire, la cellule tumorale va mettre en jeu différents mécanismes qui vont lui permettre de contourner la réponse immunitaire anti-tumorale. Elle active les lymphocytes régulateurs qui vont exercer un contrôle du système immunitaire en bloquant la réponse immune. Cette action est nécessaire au fonctionnement normal du système immunitaire afin qu'il ne s'emballe pas et n'entraîne pas de dommage à l'hôte en cas d'inflammation (16) (17). Les cellules transformées sont capables d'échapper à l'immunosurveillance soit par immunosélection, soit par immunosubversion.

5.2.1 Immunosélection

L'immunosélection correspond à la sélection de variants cellulaires tumoraux non reconnus par le système immunitaire et donc non immunogènes. Les cellules tumorales peuvent ainsi acquérir des défauts dans les voies de présentation des antigènes (TAP-1, CMH-1, ...) qui empêchent leur reconnaissance par les cellules du système adaptatif (18). Ce phénomène d'échappement prend toute son importance lorsqu'il est associé à la perte de la réponse à l'interféron γ (IFN γ) qui rend les cellules tumorales résistantes à l'induction de l'expression du CMH-I. L'instabilité génomique peut entraîner la perte des antigènes associés aux tumeurs, qui ne sont donc plus reconnus par les cellules T CD8 qui en étaient spécifiques (19). Mais encore, la perte de ligands activateurs des cellules NK à la surface des cellules tumorales peut les rendre indétectables par les cellules du système immunitaire inné (20).

5.2.2 Immunosubversion

L'immunosubversion est un processus actif affectant le système immunitaire et ayant pour conséquence une inhibition des fonctions des cellules ayant des propriétés anti-tumorales et un recrutement actif des cellules immunosuppressives.

Les cellules tumorales vont produire des médiateurs suppresseurs et recruter des cellules suppressives (Treg, macrophages, MDSC,...) (21)(22). Le conditionnement de l'environnement tumoral permet la production de facteurs immunomodulateurs (IL-10 par les TAM, PDL1 par le stroma,...) et/ou une modification des fonctions des cellules immunes (différenciation des lymphocytes de type Th, différenciation de TAM de type M2,...).

La tumeur et son environnement détournent plusieurs types de molécules afin d'échapper à la réponse immune et permettre une prolifération. On peut les classer en fonction de leurs actions sous forme de familles :

- cytokines inhibitrices.
- médiateurs immunosuppresseurs : PGE2, kynurénine, adénosine,...
- enzymes suppressives impliquées dans la synthèse de ces médiateurs : COX2, CD39/73, IDO, Arg1,...
- ligands de récepteurs de mort cellulaire : FasL, Trail,...
- chimiokines impliquées dans le recrutement d'acteurs pro-tumoraux : CCL22, CCL2,...
- ligands de récepteurs co-inhibiteurs des lymphocytes T (PD1, TIM3, LAG3,...) exprimés par la cellule tumorale ou son environnement (PDL1, PDL2, Gal-9, B7-H4,...)(23).

La voie PD1/PDL1 joue donc un rôle important dans la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des cellules tumorales.

5.3 Checkpoints : CTLA4, PD1, LAG3, TIM3....

5.3.1 Généralités

Les checkpoints immunitaires ont à l'état normal un rôle de contrôle du système immunitaire dans le but d'éviter des réactions immunes exacerbées ou des phénomènes auto-immuns. Dans une situation tumorale, la tumeur va être capable de détourner son action et de freiner le développement d'une immunité anti-tumorale adaptative qui aurait permis le contrôle voire le rejet de la tumeur.

Les principaux acteurs sont le récepteur PD1 et son ligand principal PDL1, ainsi que le récepteur CTLA-4 et ses ligands principaux CD80 et CD86 (24). Il existe également d'autres acteurs tels que LAG3, TIM3 et bien d'autres...(Fig. 13)

5.3.2 CTLA-4

Certaines molécules comme le CTLA-4 jouent un rôle primordial dans la tolérance du système immunitaire vis-à-vis des tumeurs. Il s'agit d'un élément freinateur des lymphocytes T qui régule l'activation précoce des lymphocytes cytotoxiques. Il est exprimé rapidement à la surface des lymphocytes T où il agit en inhibant leur fonction par compétition avec CD28 dont il partage les ligands B7-1 (CD80) et B7-2 (CD86) (Fig.14-15). Il recrute également des phosphatases qui déphosphorylent la voie de signalisation TCR/CD28 (25)(26). Il existe donc un rétro contrôle nécessaire à l'homéostasie immunologique. Le blocage de sa fonction permet de renforcer le pouvoir cytotoxique des lymphocytes T dirigé contre les cellules cancéreuses.

Le développement récent d'anticorps monoclonaux inhibant le CTLA-4 a montré des effets intéressants chez les patients atteints de carcinome bronchique non à petites cellules (27)(28) mais aussi dans les mélanomes métastatiques (23).

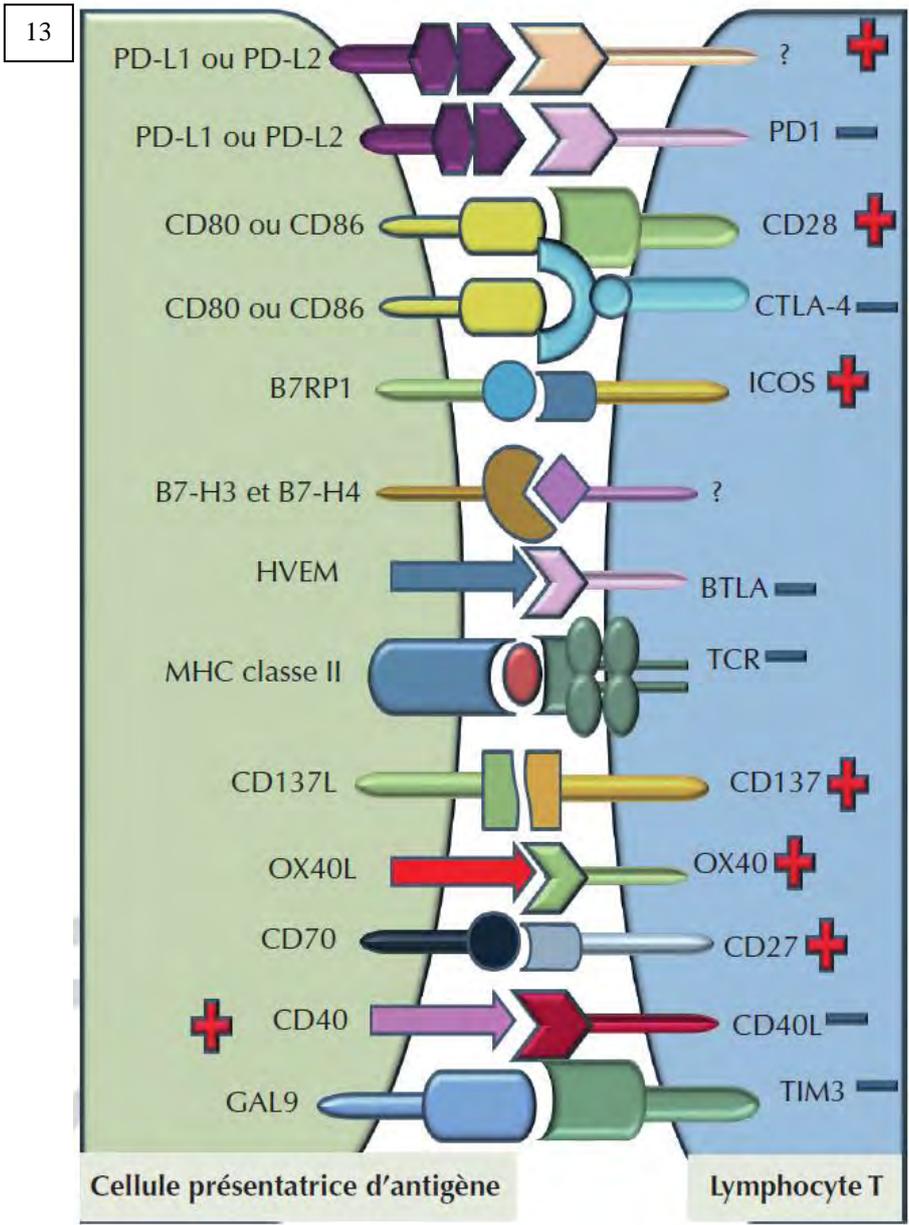


Figure 13 : multiples checkpoints immunologiques identifiés pouvant constituer des cibles thérapeutiques.

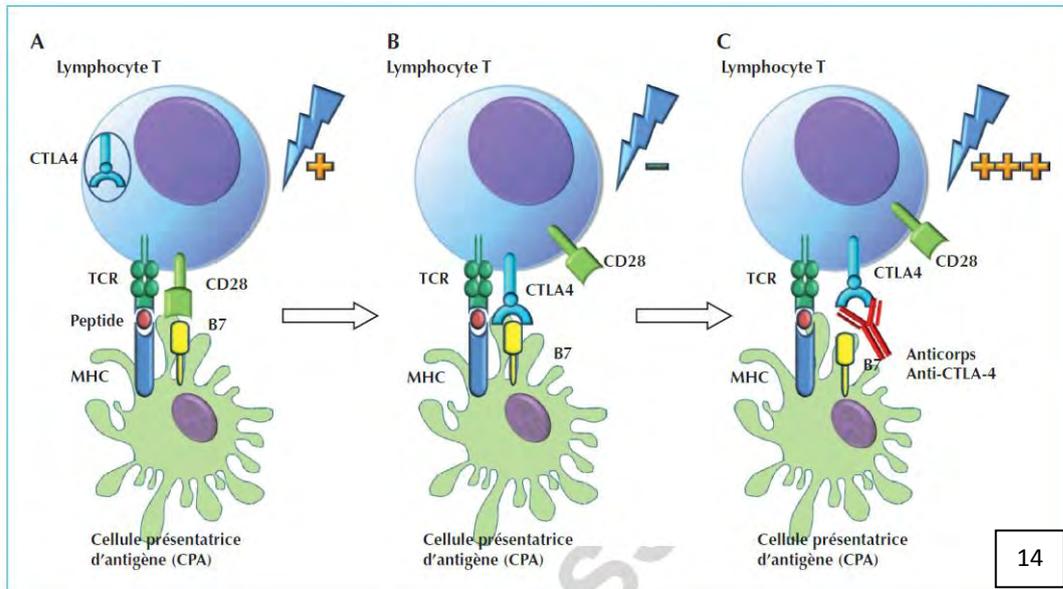


Figure 14: mécanismes d'action des anticorps anti-CTLA-4.

A) Activation lymphocytaire par la liaison MCH-peptide antigénique-TCR et co-stimulation par les corécepteurs CD28 et B7.

B) Après stimulation du TCR, le CTLA4 est transporté à la surface cellulaire et se couple avec le récepteur B7 pour inhiber l'activation du lymphocyte T.

C) Les anticorps anti-CTLA-4 bloquent le récepteur CTLA-4, permettant l'activation lymphocytaire T.

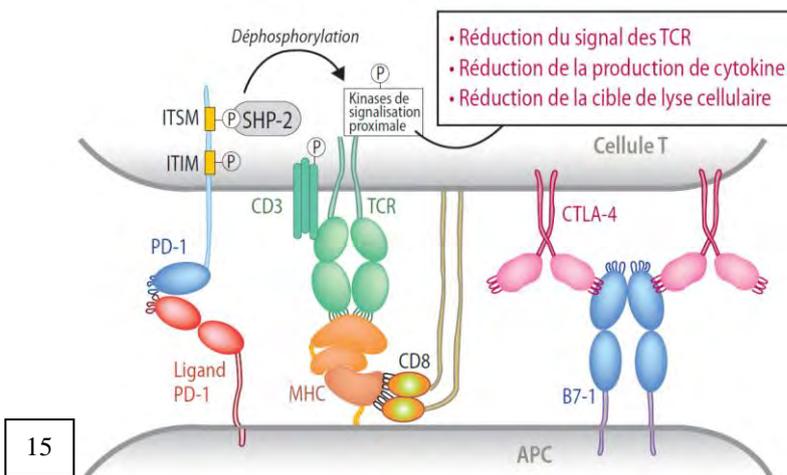


Figure 15 : La voie CTLA-4 et PD-1 inhibe les réponses des cellules T (29).

5.3.3 PD1

Il s'agit d'un régulateur négatif de l'activation T à différents stades de la réponse immune lorsqu'il interagit avec ses ligands PDL1 et PDL2 (30)(31). Il est également présent à la surface des lymphocytes T activés. Il va exercer son action inhibitrice de la voie de signalisation conduisant à l'activation T à travers le recrutement d'une phosphatase (30). A la différence de CTLA-4 qui inhibe l'activité précoce, PD1 inhibe l'activité des lymphocytes T lors de la phase effectrice dans les tissus et les tumeurs (32).

A noter que PD1 peut interagir avec le CD80 exprimé à la surface des lymphocytes et se comporter comme un récepteur inhibiteur. Cependant le rôle de cette interaction n'a pas été clairement établi (33)(34).

5.3.4 TIM3

Il est également un régulateur négatif induit au cours de l'activation. Il est engagé par galectine 9 (Gal-9), qui est une molécule de la famille des galectines exprimée par des cellules non hématopoïétiques (23). L'activation du récepteur entraîne « l'exhaustion » du lymphocyte qui se distingue de la senescence car il s'agit d'un phénomène réversible. L'expression du TIM3 par les lymphocytes a été décrite dans des modèles d'inflammation chronique et plus récemment dans des cancers.

5.3.5 LAG3

Il est exprimé à la surface des lymphocytes T au cours de l'activation et de la différenciation T. Il interagit avec une partie constante du CMH de classe II et induit un signal inhibiteur.

5.3.6 Autres

Il existe encore d'autres points de contrôle beaucoup moins bien connus.

5.4 Voie PD1/PDL1

L'inhibition de la voie PD1/PDL1 est une piste thérapeutique dans le but de restaurer l'efficacité du système immunitaire contre la cellule tumorale. Le récepteur PD1 (Programmed Death 1) est situé sur les lymphocytes. Son ligand, PDL1 (Programmed Death Ligand 1) est situé sur les cellules présentatrices d'antigènes. Ce sont des molécules de co-inhibition.

Il existe un rapport paradoxal entre le système immunitaire et les cellules tumorales. Ces cellules ont des différences antigéniques qui permettent de les différencier du « soi » et qui devraient les rendre plus vulnérables au système immunitaire.

Le récepteur PD1 ou CD279, est un membre de la famille B7-CD28. Il s'agit d'un récepteur de co-inhibition exprimé à la surface cellulaire des lymphocytes T, lymphocytes B, monocytes et cellules NK (Natural Killer). Il possède un domaine de la superfamille des immunoglobulines et un domaine cytoplasmique contenant 2 motifs tyrosine : un motif ITIM (tyrosine-based inhibitory motif) qui transduit un signal inhibiteur et un motif ITSM (immunoreceptor tyrosine-based switch motif) associé à un signal d'adaptation. (35). (Fig. 16A). Ce récepteur possède 2 ligands. Le premier est PDL1 (aussi appelé B7-H1 ou CD274) et le deuxième est PDL2 (aussi appelé B7-DC ou CD273) (36)(37). (Fig16B). Ces 2 ligands ont un domaine extracellulaire « immunoglobuline-V-like » et « immunoglobuline-C-like » ainsi qu'un court domaine intra cellulaire.

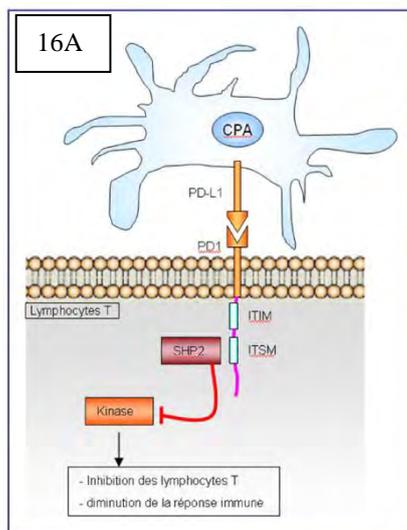


Figure 16A : mécanisme d'inhibition de la voie PD1 / PDL1

CPA : Cellule présentatrice d'antigène

SHP2 : tyrosine phosphatase avec 2 domaines SH2

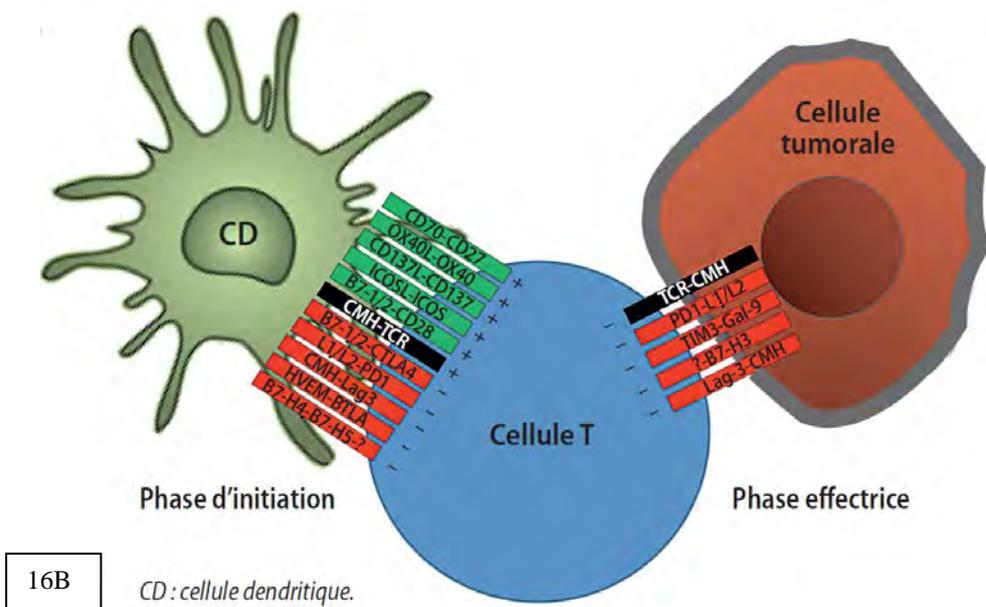


Figure 16B : Pour limiter l'auto-immunité, l'activation des lymphocytes T est régulée par des points de contrôle immunitaire. De multiples interactions de cosignalisation (molécules costimulatrices [+] et co-inhibitrice [-]) régulent les réponses des cellules T. Les principales interactions entre les cellules T (*bleu*) et les APC/cellules tumorales (*vert ou marron*) qui régulent la réponse à l'antigène de cellules T sont illustrées. Ces interactions interviennent soit lors de l'initiation de l'activation T dans les ganglions, soit lors de la phase effectrice dans les tissus périphériques ou les tumeurs (38).

Le rôle majeur de PD1 réside dans le fait qu'il limite l'activité des lymphocytes T dans les tissus périphériques au moment de l'inflammation.

L'action de la voie PD1 / PDL1 se produit lorsqu'un ligand se fixe sur le récepteur. Cela va entraîner une inhibition des kinases impliquées dans l'activation des lymphocytes T (39). Il semble que la voie PD1/PDL1 puisse avoir également un effet en diminuant la durée de contact entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène (31). Il existe un mécanisme d'échappement pouvant induire une tolérance du système immunitaire. Ce mécanisme est lié au fait que le récepteur PD1 est fortement exprimé à la surface des lymphocytes T régulateurs peut augmenter leur prolifération en présence de son ligand.

Dans le cancer, PD1 est exprimé à la surface de lymphocytes infiltrant la tumeur (TIL : Tumor Infiltrative Lymphocytes). Il s'agit souvent de lymphocytes T régulateurs. L'exposition chronique aux antigènes tumoraux va conduire à une augmentation d'expression de PD1 à l'origine d'un épuisement ou d'une anergie des lymphocytes T. Les ligands de PD1 sont surexprimés à la surface des cellules tumorales de nombreux cancers. Ceci a été montré notamment dans le cancer bronchique non à petites cellules. (32) Le ligand principal exprimé à la surface des cellules tumorales des cancers solides est PDL1. Une forte expression de PDL1 à la surface des cellules tumorales inhibe la réponse immunitaire des lymphocytes T vis à vis de la tumeur (40). PDL1 est également surexprimé par les cellules myéloïdes présentes dans le microenvironnement tumoral (41) (42).

La résistance immunitaire innée et la résistance immunitaire adaptative sont impliquées dans l'expression de PDL1 à la surface des cellules tumorales (23).

La résistance immunitaire innée se fait par l'activation de voies de signalisations (voie PI3K-AKT, voie ALK) par des oncogènes à l'origine d'une expression constitutive de PDL1. (43)(44)

La résistance immunitaire adaptative provient de la réponse de l'hôte à l'inflammation ou à la présence de cellules tumorales. Celle-ci va entraîner une réponse inflammatoire avec production de cytokines (interféron γ) à l'origine d'une expression de PDL1 sur les cellules tumorales et donc d'une tolérance du système immunitaire (45).

5.5 Actualités en immunothérapie

5.5.1 Anticorps anti-PD1

5.5.1.1 Nivolumab

Le Nivolumab (anti PD1 produit par BMS) est un produit ayant l'AMM depuis Avril 2015 dans les carcinomes épidermoïdes pulmonaires avancés ou métastatiques en deuxième ligne sans évaluation préalable de PDL1 par immunohistochimie. Il a aussi une AMM dans le mélanome métastatique (46).

5.5.1.2 Pembrolizumab

Le Pembrolizumab (anti-PD1 produit par Merck) n'a à l'heure actuelle ni AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) ni ATU (Autorisation Temporaire d'Utilisation).

La comparaison Pembrolizumab (anti-PD1) et Ipilimumab (anti-CTLA4) a été testée dans un essai clinique de phase III randomisé dans le mélanome métastatique et a montré une augmentation de la survie sans progression (47,3% vs 26,5%) et de la survie globale (74,1% vs 68,4%). Le Pembrolizumab présente également 2 fois moins d'effets indésirables de grade 3-5 ce qui prouve que le blocage de la voie PD1-PDL1 conduit à moins de toxicité que le blocage de la voie CTLA-4.

Dans le poumon, dans l'essai KEYNOTE 001 ce traitement était plus efficace chez les patients dont la tumeur présentait une forte expression de PDL1 en immunohistochimie mais pouvait aussi l'être en l'absence d'expression de ce marqueur.

5.5.1.3 Pidilizumab

Le blocage de voie PD1-PDL1 par cette molécule a montré des réponses dans les hémopathies malignes aussi bien en monothérapie qu'en association au Rituximab (47) (48) (49).

5.5.2 Anticorps anti-PDL1

Les anticorps anti PD1-PDL1 se sont avérés efficaces dans les cancers de la vessie. Dans un essai clinique, plus de 40% des patients ont présenté des réponses objectives, dont 7% de rémissions complètes. (50)

5.5.3 Anticorps anti-PDL2

L'AMP-224 est une protéine recombinante qui se lie au récepteur PD1 de manière compétitive. Il est composé du domaine extra cellulaire de B7-DC (PDL2) et d'un fragment de Fc d'IgG1 (51).

5.5.4 Anticorps anti-CTLA4

Il existe deux molécules : Ipilimumab et Trémélimumab.

L'ipilimumab est un anticorps humanisé anti CTLA-4. Il a fait ses preuves en monothérapie chez des patients atteints d'un mélanome métastatique traité par chimiothérapie au cours d'un essai de phase III (52).

Il a également été étudié dans d'autres cancers : pancréas (53), la prostate (54) (55) et dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (28).

Le trémélimumab à quant à lui été testé sur le mésothéliome (56).

Dans le mélanome, un essai de phase III sur des patients métastatiques a montré une supériorité de l'association ipilimumab + dacarbazine (chimiothérapie de référence) versus la chimiothérapie seule par dacarbazine (11mois versus 9mois, et une survie à 3ans de 20,8% versus 12,2%) (57).

Son association avec des immunomodulateurs (Interféron) ou d'autres agents cytotoxiques est aussi étudiée dans le mélanome.

5.5.5 Combinaison d'immunothérapie

La combinaison de ces anticorps immunomodulateurs a été évaluée dans une cohorte de 142 patients porteurs de mélanomes métastatiques. La combinaison de l'anti PD1 (Nivolumab) et de l'anti CTLA-4 (Ipilimumab) génère un taux de réponses objectives de 61% et un taux de réponses complètes de 22%, versus 11% et 0% respectivement lors de l'utilisation de l'anti CTLA-4 (Ipilimumab) en monothérapie (58).

Ces associations ont une efficacité au prix d'effets indésirables et en l'occurrence d'une toxicité inflammatoire et auto-immune de grade 3-4. Cette toxicité est réversible chez 50% des patients.

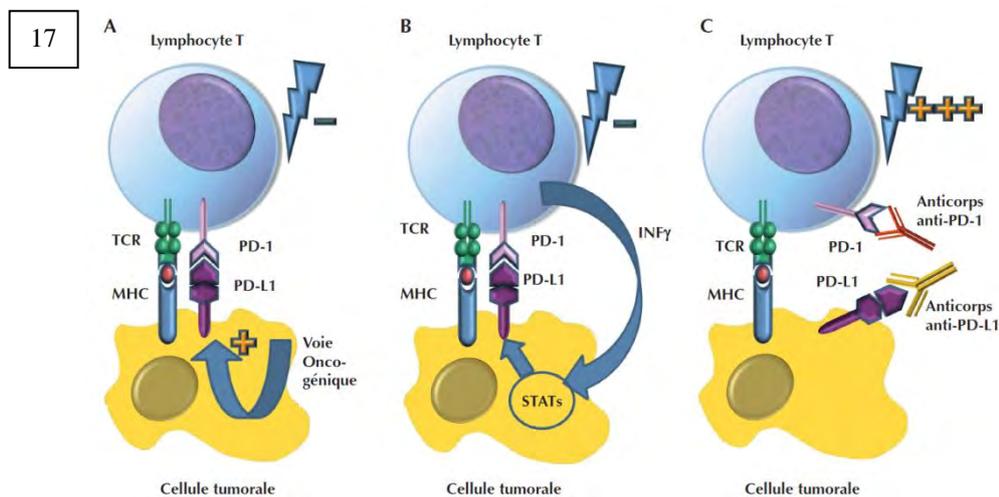


Figure 17 : Mécanisme d'expression des ligands du PD-L1 et mécanisme d'action des anticorps anti PD-1 et anti PD-L1.

A) Résistance constitutive au système immunitaire : l'activation de voies de signalisations oncogéniques entraîne la surexpression de PD-L1 à la surface de la cellule tumorale et empêche l'activation lymphocytaire.

B) Résistance acquise au système immunitaire : l'expression de PD-L1 est induite à la surface de la cellule tumorale par des signaux inflammatoires (IFN) produits par la réponse immunitaire anti tumorale qui activent les facteurs de transcriptions STAT (Signal transducer and activator of transcription) et empêchent l'activation lymphocytaire.

C) en bloquant le récepteur (PD-1) ou son ligand (PD-L1), les anticorps vont empêcher l'inhibition de la voie PD1/PD-L1 et permettre l'activation du lymphocyte T (59).

5.6 Les enjeux

On connaît l'efficacité de l'immunothérapie, mais les enjeux sont désormais de disposer de biomarqueurs permettant de prédire l'efficacité des différents immunomodulateurs et, d'autre part, de proposer des alternatives pour les patients non sensibles à ces inhibiteurs des checkpoints de l'immunité.

Hormis l'efficacité anti-tumorale, on rencontre des problèmes tels que ceux liés à la toxicité, à la qualité de vie ou au coût de ce nouvel arsenal thérapeutique.

III. MATERIELS ET METHODES

1. SELECTIONS DES PATIENTS

Il s'agit d'une étude rétrospective, réalisée sur une série de 29 patients ayant subi une résection chirurgicale dans le service de Chirurgie Thoracique de l'hôpital Larrey à Toulouse de 2004 à 2015 et dont les blocs de paraffine étaient disponibles au laboratoire d'Anatomie Pathologique.

Nous n'avons inclus que des thymomes B3 et des carcinomes thymiques.

Pour certains patients nous avons étudié l'expression immunohistochimique sur plusieurs blocs provenant de différents prélèvements (biopsie diagnostique, pièce opératoire, récurrence locale, métastase).

Nous avons exclu les patients dont le matériel a été épuisé au cours de l'étude.

2. DONNEES CLINIQUES

Les données cliniques et le suivi des patients, ont été obtenus grâce aux différents logiciels de traitement du dossier médical : Orbis, Fusion et Medar pour les données cliniques et Diamic pour les informations anatomopathologiques.

Pour les patients suivis à l'extérieur (hors CHU de Toulouse), les données cliniques et de survie ont été recueillies auprès des médecins traitants et des cliniciens assurant ou ayant assuré le suivi du patient.

Nous avons essayé d'obtenir les informations cliniques suivantes : état civil complet du patient, diagnostic anatomo-pathologique, taille et stade (TNM et Masaoka-Koga) de la tumeur initiale, traitements et suivi du patient.

3. RECUEIL

Le matériel provenait en majorité de pièces chirurgicales issues de la tumeur initiale, d'une récurrence locale ou d'une localisation métastatique. On disposait aussi de biopsies préopératoires de la lésion primitive ou de lésions secondaires pour lesquelles le matériel devait être suffisamment abondant pour procéder aux analyses utiles à notre étude sans épuiser le prélèvement.

Le choix s'est fait grâce au logiciel DIAMIC qui nous a permis de retrouver nos différents patients ainsi que l'ensemble de leurs différents prélèvements par l'intermédiaire du système de codification ADICAP.

Pour chacun des tissus désarchivés nous n'avons retenu que les prélèvements fixés dans du formol dilué à 10% puis nous avons fait une sélection des blocs les plus représentatifs, suivi d'une relecture complète à deux pathologistes.

Nous avons complété dans certains cas l'étude immunohistochimique en accord avec les recommandations de la classification actuelle (cf tableau 9 détaillant les caractéristiques des six anticorps dont nous avons eu l'utilité).

Tableau 9 : Caractéristiques des différents anticorps utilisé pour le diagnostic des thymomes : aspects techniques

| BIOMARQUEUR | REFERENCES | FOURNISSEUR | ANTICORPS / CLONE | ESPECE | DILUTION | METHODE DE DEMASQUAGE | SYSTEME DE REVELATION | MARQUAGE |
|-----------------|------------|-------------|--|----------------------|-----------|-----------------------|-----------------------|--------------------------------|
| AE1/ AE3 | GA053 | Dako | FLEX Anti-Human Cytokeratin Clone AE1/AE3 | Monoclonal souris | Pré-dilué | Omnis 30min Low pH | Envision FLEX | membranaire/ cytoplasmique |
| CD5 | 790-4451 | Ventana | Confirm anti CD5 /SP19 | Monoclonal lapin | Pré-dilué | Ventana 64min CC1 | Optiview | cytoplasmique |
| CD20 | - | Dako | L26 | Monoclonal souris | 1/100 | Ventana 32min CC1 | Optiview | membranaire |
| CD117 | A4502 | Ventana | - | Polyclonal lapin | Pré-dilué | Ventana 56min CC1 | Optiview | cytoplasmique / membranaire |
| P63 | M7317 | Dako | DAK-p63 | Monoclonal souris | 1/50 | Dako 20min High pH | Envision FLEX | nucléaire |
| TDT | 760-2670 | Ventana | SEN28 - TdT (polyclonal) | Polyclonal lapin | 1/50 | Ventana 64min CC1 | Optiview | nucléaire |

4. CHOIX DES BIOMARQUEURS

Le choix des biomarqueurs a été fait en accord avec les objectifs de l'étude.

Il existe de nombreux anticorps anti-PDL1.

Le premier est le clone 5H1-A3 de Lieping Chen, il existe depuis 2012 et a été testé dans plusieurs études notamment une, en 2015 sur les thymomes et les carcinomes thymiques (60). Il n'a pas été retenu car il n'est pas commercialisé (61).

Il existe aussi le polyclonal de lapin (ab58810) de Abcam mais qui n'a pas été retenu car il manque de spécificité (62) (63).

De nombreux autres anticorps anti-PDL1 sont disponibles et nous avons choisi de comparer plusieurs clones. Notre choix a porté sur deux anticorps utilisés dans des essais cliniques, le clone SP 142 de Spring Biosciences/Ventana utilisé dans l'essai CHECKMATE, et le clone 22C3 de Dako/Merck utilisé dans l'essai KEYNOTE 001.

Le troisième anticorps testé, le clone E1L3N de Cell Signaling Technology (CST) est retrouvé dans de nombreuses publications ou communications dans les congrès internationaux.

Les protocoles pour les clones SP142 de Ventana et E1L3N de CST ont fait l'objet d'une mise au point.

L'anticorps clone 22C3 de Dako est fourni dans un kit prototype « fermé ». Il est livré pré-dilué avec un programme installé sur nos machines.

Les anticorps PD1 (clone NAT105) et CD8 (clone SP57), sont couramment faits en immunohistochimie de routine notamment en pathologie lymphoïde. Le protocole n'a donc pas fait l'objet de modification.

5. REALISATION TECHNIQUE

Pour chacun des blocs sélectionnés nous avons fait une coupe colorée pour l'analyse morphologique, puis des coupes d'une épaisseur de 3µm montées sur lames Superfrost pour la réalisation de l'immunohistochimie.

Elles ont subi les étapes habituelles de déparaffinage, réhydratation, puis un démasquage antigénique adapté à l'anticorps.

Les lames ont ensuite été incubées avec les anticorps monoclonaux :

- PDL1 clone SP142 : anticorps monoclonal de lapin, dilué au 1/100
- PDL1 clone E1L3N : anticorps monoclonal de lapin, pré-dilué
- PDL1 clone 22C3 : anticorps monoclonal de lapin, dilué au 1/500
- PD1 clone NAT105 : anticorps monoclonal de souris, pré-dilué
- CD8 clone SP57 : anticorps monoclonal de lapin, pré-dilué

Les caractéristiques de ces anticorps et les méthodes utilisées sont synthétisées dans le tableau 10.

Toutes les lames ont été révélées par le système peroxydase-DAB et contre colorées à l'hématoxyline sur les automates BenchMark ULTRA de Ventana Roche ou bien Autostainer Link de Dako.

Tableau 10 : caractéristiques des anticorps utilisés pour la détection des biomarqueurs

| BIOMARQUEUR | REFERENCES | FOURNISSEUR | ANTICORPS / CLONE | ESPECE | DILUTION et temps d'incubation | METHODE DE DEMASQUAGE | SYSTEME DE REVELATION | MARQUAGE |
|--------------|------------|------------------------------|---------------------------|----------------------|--------------------------------|-------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| PD-L1 | M4424 | Spring biosciences | PDL1/ clone SP142 | Monoclonal lapin | 1/100 60 min | Dako link 20 min pH9 | Envision FLEX | Membranaire/ cytoplasmique |
| PD-L1 | - | DAKO | PDL1 clone 22c3 | Monoclonal souris | Pré dilué 30 min | Dako link 20 min pH6 | Envision FLEX | Membranaire/ cytoplasmique |
| PDL1 | #13684 | Cell Signaling Technology | PDL1 E1L3N | Monoclonal lapin | 1/500 60 min | Dako link 20 min pH9 | Envision FLEX | Membranaire/ cytoplasmique |
| PD-1 | 760-4895 | Ventana | NAT 105 | Monoclonal souris | Pré dilué 32 min | Ventana 64 min cc1 | Optiview | Cytoplasmique |
| CD8 | 790-4460 | Ventana | Confirm anti CD8/ SP57 | Monoclonal lapin | Pré-dilué 20 min | Ventana 64 min cc1 | Optiview | Membranaire |

6. EVALUATION DU MARQUAGE IMMUNOHISTOCHIMIQUE

La quantification du marquage sur tissus est faite en double aveugle.

Pour chaque anticorps, les critères de positivité retenus sont :

- Un marquage net, membranaire, circonférentiel des cellules épithéliales. Le marquage cytoplasmique n'a pas été pris en compte.
- Le marquage des éléments inflammatoires (membranaire ou cytoplasmique).
- L'absence de bruit de fond.
- La présence de témoins positifs.

Pour chaque anticorps, on évalue le pourcentage des cellules tumorales marquées et l'intensité du marquage (Fig.18A-C) :

- Absence de marquage : score 0
- Marquage faible : score 1
- Marquage modéré : score 2
- Marquage intense : score 3

Un H-Score est ensuite attribué :

Il s'obtient en additionnant les produits des intensités par le pourcentage de cellules marquées selon la formule suivante :

H-score = 3 x % de cellules fortement marquées + 2 x % cellules modérément marquées + 1 x % cellules faiblement marquées. On obtient un score entre 0 et 300 pour chaque échantillon (64).

On procède de la même façon pour la lecture du marquage des lymphocytes. Nous avons choisi d'évaluer les lymphocytes présents au niveau de la zone tumorale, directement au contact des cellules tumorales ou entre les amas tumoraux. Nous n'avons pas tenu compte des lymphocytes situés à distance.

Pour chaque série de marquage nous avons réalisé un témoin positif externe qui permet de valider la technique sur une série d'échantillons.

Pour les prélèvements ne présentant pas de marquage, l'identification d'éléments inflammatoires marqués même faiblement a permis d'écartier d'éventuels faux négatifs.

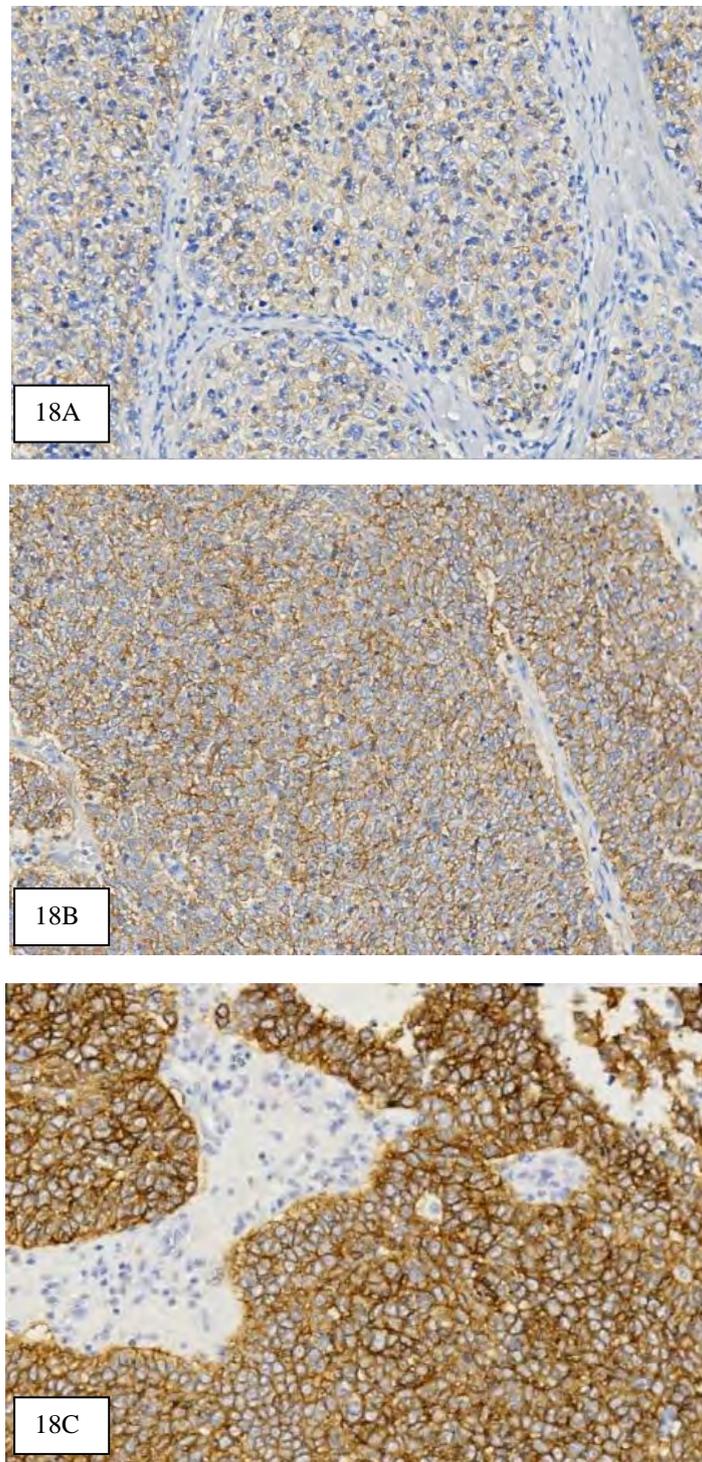


Figure 18 : variation de l'intensité du marquage en cadre avec PDL-1. Intensité 1+ (A), 2+ (B), 3+ (C).

7. TEMOINS POSITIFS ET MISE AU POINT

L'essentiel des mises au point a concerné les anticorps commerciaux PDL1: SP142 et E1L3N. Les témoins les plus utilisés dans les études sont l'amygdale et le placenta.

Le marquage au niveau des amygdales se retrouve surtout au niveau du revêtement épithélial et des centres germinatifs. Un marquage moindre étant retrouvé au niveau des cryptes. En ce qui concerne le placenta, on retrouve le marquage sur les cellules cytotrophoblastiques tapissant les villosités.

Pour l'anticorps non commercial de Dako clone 22C3, des lames témoins positif et négatif étaient fournies dans le kit.

7.1 PDL1 clone SP142 (Roche)

7.1.1 Témoin placenta

Bien que commercial, les premières lames marquées avec l'anticorps PDL1 SP142 de Ventana/Roche avec le protocole recommandé par le fabricant montraient un marquage peu intense et hétérogène du placenta (Fig.19). Le témoin amygdale ne posant pas de problèmes particulier, nous nous sommes assurés qu'un défaut de chauffage de l'automate Benchmark ultra n'était pas en cause en utilisant d'autres machines et d'autres positions pour le placenta. Nous avons également testé différents placentas pour vérifier si les différences n'étaient pas dues à une mauvaise fixation des tissus.

N'obtenant pas de marquage satisfaisant sur placenta, une optimisation du protocole sur Benchmark ultra a été faite en modifiant les temps, les températures de démasquage et d'incubation de l'anticorps.

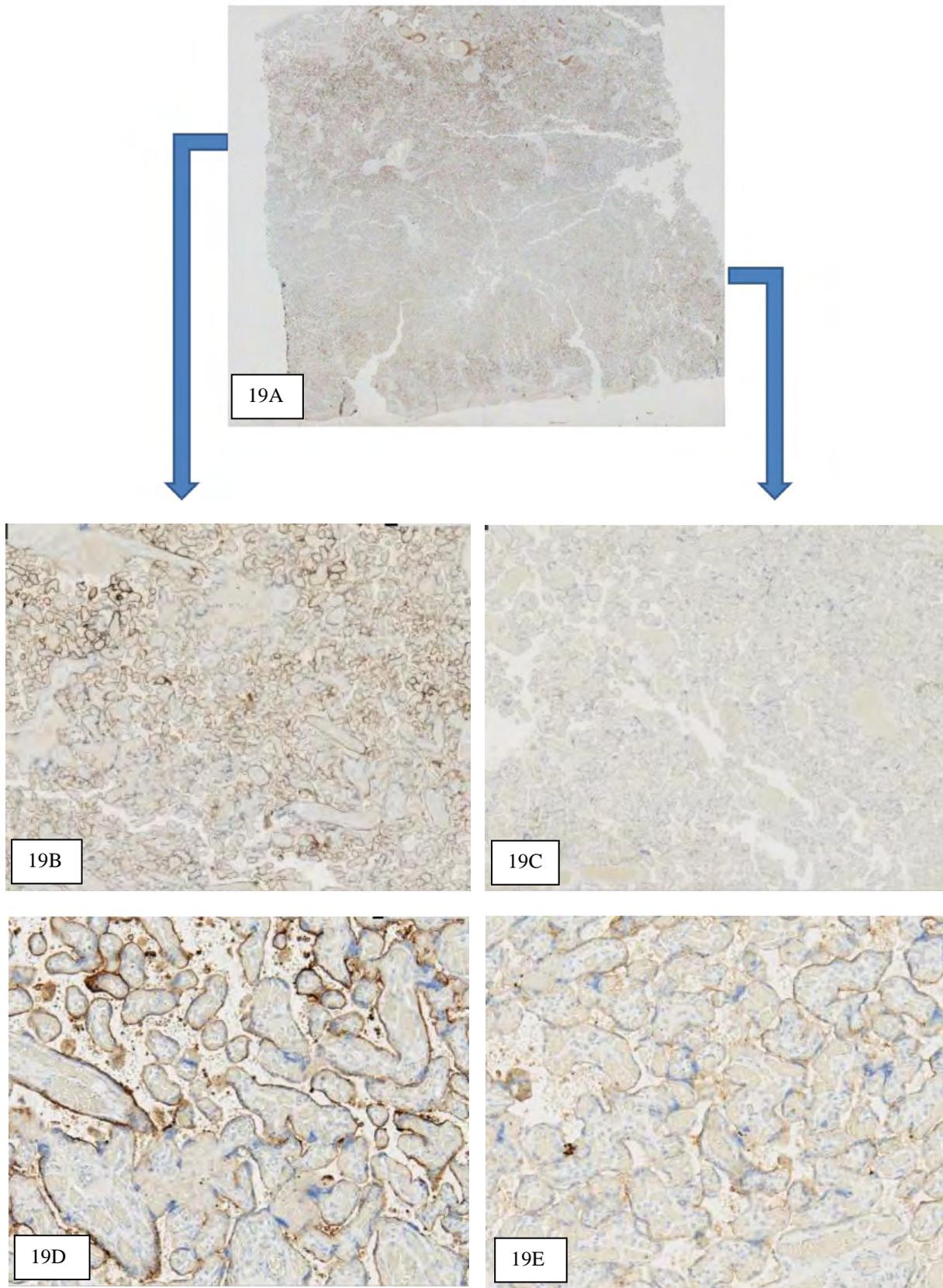


Figure 19 : Hétérogénéité du marquage sur placenta fait sur Benchmark ultra. On note des zones avec un marquage d'intensité faible (C-E) et d'autres zones où le marquage est modéré (B-D).

Après différentes modifications et devant la persistance de ce marquage hétérogène, nous avons décidé de tester l'anticorps PDL1 Ventana/Roche clone SP142 sur l'Autostainer Link de Dako. Si le système de révélation Dako est relativement équivalent à celui de Ventana/ Roche, le tampon de démasquage pH9 est propre au système Dako. Ce démasquage plus intense a permis d'augmenter la dilution de l'anticorps.

Un marquage optimal de l'anticorps homogène et intense, a ainsi été obtenu sur le placenta (Fig.20).

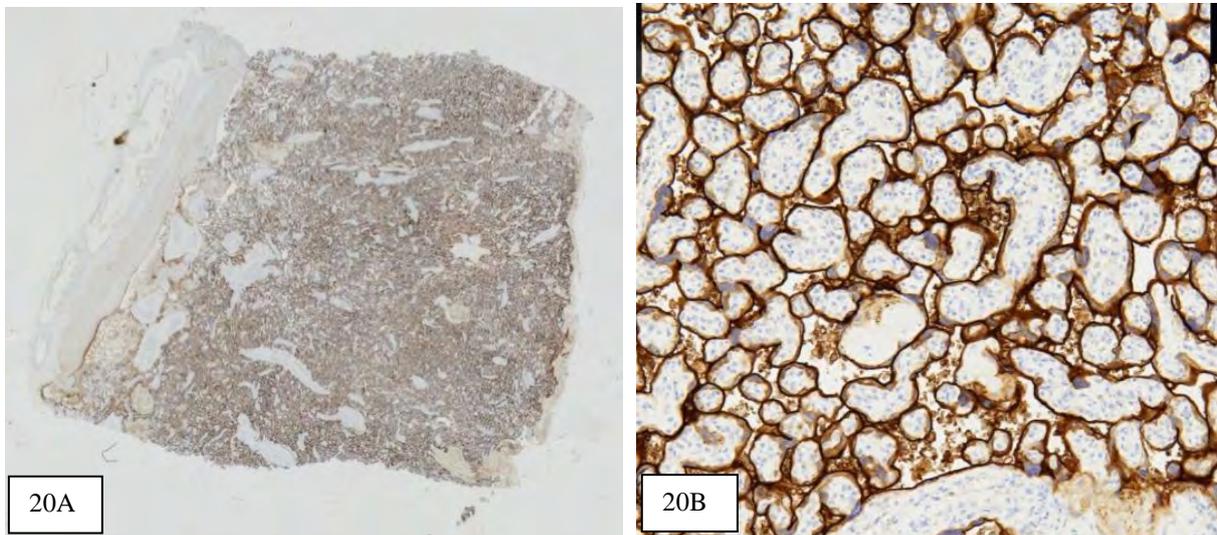


Figure 20A-B : marquage circonférentiel des villosités placentaires avec PDL1 (SP142) réalisé sur l'automate Dako Link.

7.1.2 Témoin amygdale

La première mise au point fonctionnait correctement, une nouvelle vérification sur amygdale avec un passage sur l'automate Autostainer de Dako a confirmé un marquage satisfaisant (Fig.21).

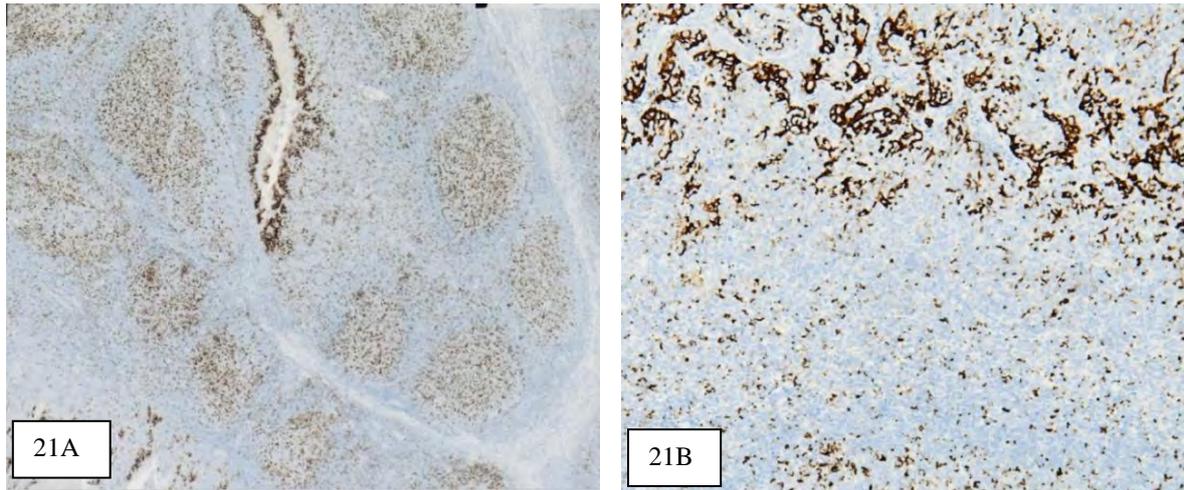


Figure 21 A-B : marquage des cellules épithéliales et des centres germinatifs avec PDL1.

Sur les amygdales le clone SP142 de PDL1 a montré un marquage net avec une bonne intensité au niveau des centres germinatifs, des cellules épithéliales du revêtement et des cryptes.

7.2 PDL1 clone E1L3N (CST)

Une légère mise au point avec ajustement de la dilution de l'anticorps a été nécessaire.

7.2.1 *Témoin placenta*

Le même placenta que pour l'anticorps SP142 a été utilisé. Nous avons obtenu avec une dilution au 1/500 un marquage optimal, homogène et intense des villosités (Fig.22).

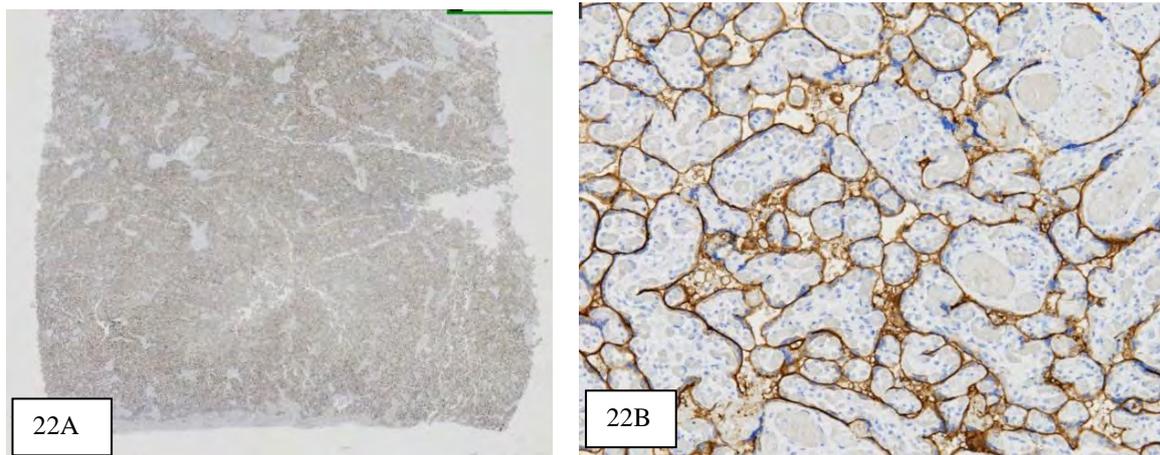


Figure 22 A-B : marquage circonférentiel des villosités placentaires avec PDL1 (E1L3N)

7.2.2 *Témoin amygdale*

Nous avons également évalué l'anticorps sur des amygdales. Sur les amygdales le clone E1L3N de PDL1 a montré un marquage net avec une bonne intensité au niveau des centres germinatifs, des cellules épithéliales du revêtement et des cryptes (Fig.23).

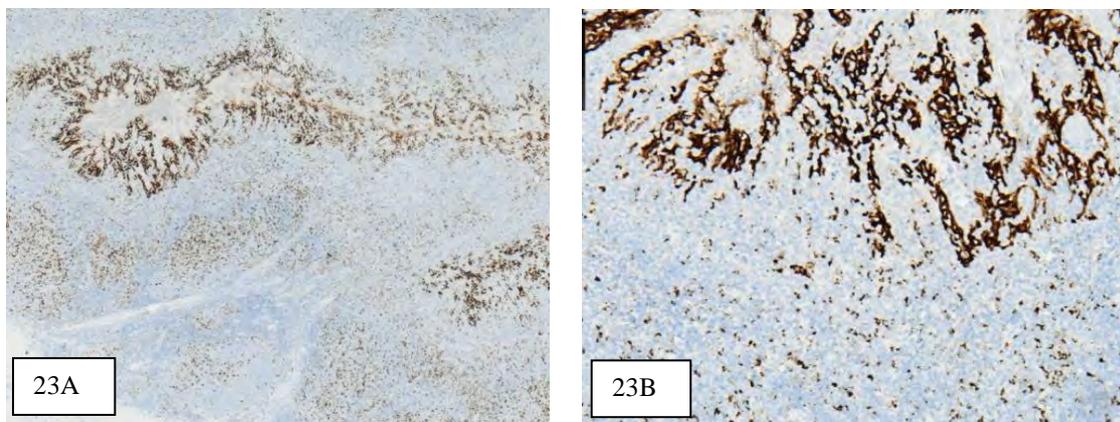


Figure 23 A-B : marquage témoin positif amygdale PDL1 CST

7.3 PDL1 clone 22C3 (Dako)

Dako fournit son anticorps au sein d'un kit contenant des contrôles.

Dans chaque kit, on dispose d'étalements de cellules en culture comportant un spot témoin positif et un spot témoin négatif (Fig.24). Aucune optimisation n'a été nécessaire, le fabricant proposant un protocole adapté. Nous avons simplement fait un marquage préliminaire pour s'assurer de l'efficacité du marquage. Nous avons également vérifié sur nos témoins (placenta et amygdale) la concordance du marquage par rapport aux autres anticorps.

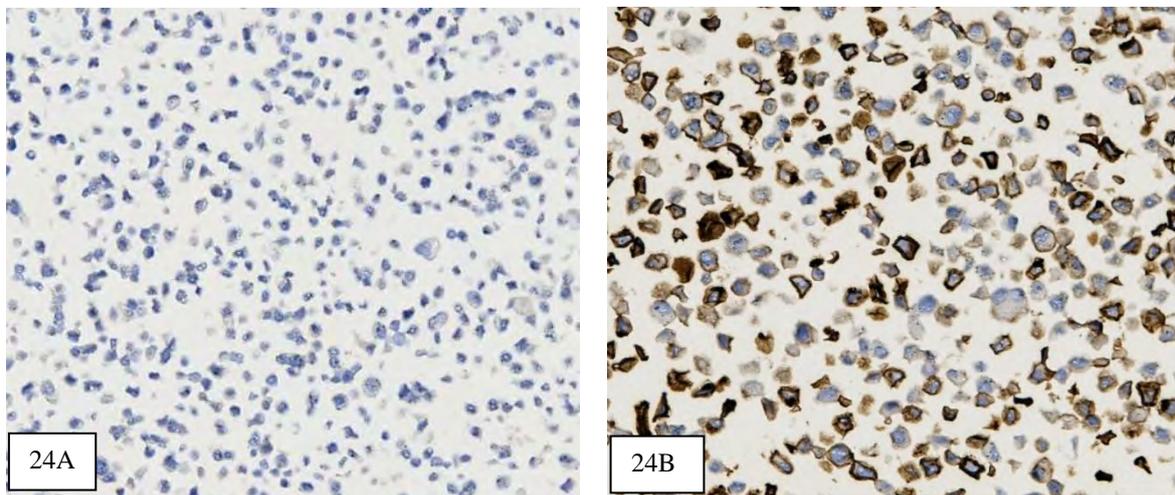


Figure 24 : Témoin négatif (A) et positif (B) : PDL1 clone 22C3 (Dako) (x20)

7.4 Témoin CD8 (Ventana)

Le CD8 confirm de chez Ventana est un anticorps de routine dans le laboratoire d'anatomie pathologique. Il est régulièrement utilisé et ne nous a pas demandé de mise au point pour le marquage de notre série. Nous avons testé l'anticorps anti-CD8 sur l'amygdale pour évaluer le marquage (Fig.25).

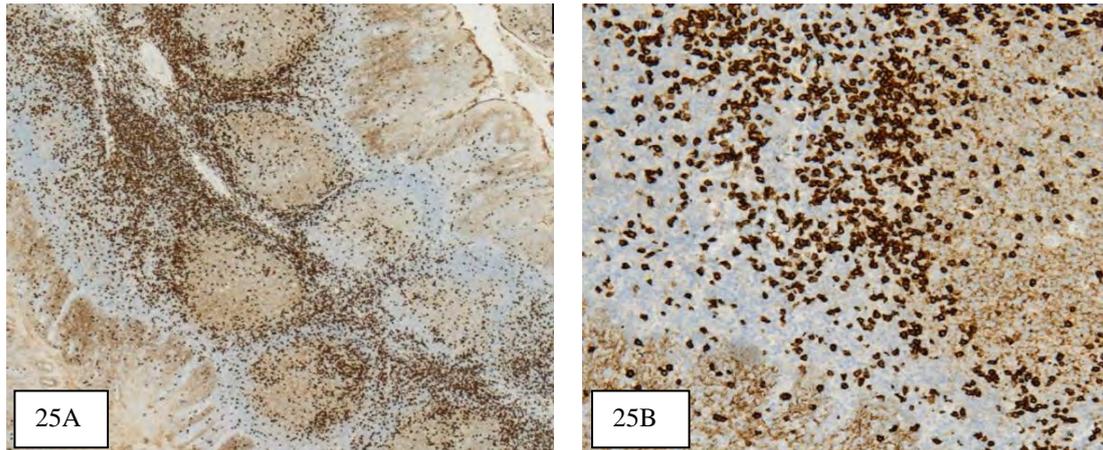


Figure 25 A-B : Marquage des lymphocytes T CD8 de l'amygdale.

7.5 Témoin PD1 (Ventana)

Comme pour le CD8, l'anticorps PD1 clone NAT105 est régulièrement utilisé au laboratoire. Aucune mise au point n'a été nécessaire. Un test a été réalisé pour évaluer le marquage des lymphocytes portant le récepteur PD1 au sein de l'amygdale (Fig.26).

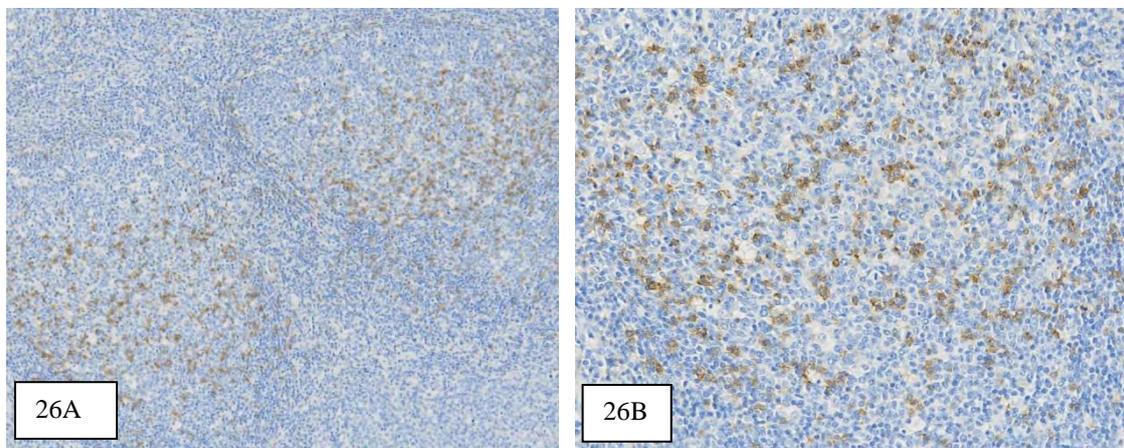


Figure 26 A-B : marquage de lymphocytes au niveau des centres germinatifs avec PD1

8. ANALYSES STATISTIQUES

L'objectif premier est d'évaluer l'expression du marquage PDL1 dans les thymomes de type B3 et dans les carcinomes thymiques ainsi que de voir les cohérences entre les différents anticorps disponibles pour PDL1.

Pour permettre une analyse plus fine, prenant en compte tous les critères de lecture, nous avons utilisés le H score.

Nous avons comparé les différents marquages immunohistochimiques entre les thymomes B3 et les carcinomes thymiques par le test exact de Fisher.

Dans un second temps, nous avons essayé d'évaluer la corrélation PDL1 / PD1 / CD8.

L'évaluation de la corrélation entre les différents marquages et la survie globale ou la survie sans progression a été effectuée par le test du Log Rank donnant une courbe de Kaplan Meier.

Les résultats de ces tests statistiques n'auront probablement qu'une valeur indicative du fait du faible nombre de patients inclus et du petit nombre d'évènements.

IV. RESULTATS

1. CARACTERISTIQUES DES PATIENTS

Nous avons étudié 29 patients ayant eu un prélèvement concernant soit un thymome B3 soit un carcinome thymique sur la période de 2004 à 2015.

Parmi nos 29 patients, 14 étaient des femmes et 15 étaient des hommes.

Il y avait un équilibre des groupes avec 14 thymomes B3 et 15 carcinomes thymiques.

Nous avons utilisé 40 prélèvements correspondant à 16 biopsies et 24 pièces opératoires. Il pouvait s'agir de la biopsie initiale ou de la pièce opératoire (thymectomie, exérèse d'une récurrence locale ou d'une métastase). Un seul échantillon était disponible pour 17 patients, 2 pour 10 autres patients et 3 pour un seul patient.

Pour cinq patients, nous n'avions ni la biopsie ni la pièce initiale mais juste une métastase à distance ou une récurrence locale.

L'âge moyen au moment du diagnostic était de 59 ans avec une tranche d'âge allant de 24 ans pour le plus jeune à 81 ans pour le plus âgé. A noter que l'âge moyen des thymomes était de 52 ans contre 63 ans pour les carcinomes thymiques.

Les patients ont été suivis régulièrement. A ce jour, dix-neuf sont vivants (soit 47,5%), sept sont décédés (soit 17,5%) et trois ont été perdus de vue.

Le décès le plus rapide est intervenu au bout de 13 mois de suivi, et le suivi le plus long avant décès était de 71 mois.

Ces caractéristiques sont résumées dans le tableau 11.

Tableau 11 : Caractéristiques générales des patients

| | Caractéristiques | Nombre | Pourcentage |
|-------------------------------------|-------------------------|---------------|--------------------|
| Sexe | Femmes | 14 | 48 % |
| | Hommes | 15 | 52 % |
| Age | Moyen général | 59 (24-81) | |
| | Thymomes B3 | 52 | |
| | Carcinomes thymiques | 63 | |
| Prélèvements | Biopsies | 16 | 40 % |
| | Pièces opératoires | 24 | 60 % |
| Diagnostic | Thymomes B3 | 14 | 48 % |
| | Carcinomes thymiques | 15 | 52 % |
| Localisation prélèvement | Thymus | 31 | 77,5 % |
| | Plèvre | 5 | 12,5 % |
| | Hépatique | 1 | 2,5 % |
| | Surrénale | 2 | 5 % |
| | Pariétal (cotes) | 1 | 2,5 % |
| Evènements à distance | Récidive locale | 3 | 10,3 % |
| | Métastase | 16 | 55,2 % |
| Status | Vivant | 19 | 47,5 % |
| | Décès | 7 | 17,5 % |
| | Perdu de vue | 3 | 7,5 % |

2. MARQUAGES OBTENUS SUR LES THYOMES B3

2.1 PDL1

Une majorité de thymomes B3 présente un marquage intense en cadre sur la majorité des cellules épithéliales tumorales avec PDL1 alors que les cellules inflammatoires sont le plus souvent négatives (tableaux 12-13).

Ces aspects sont retrouvés quel que soit l'anticorps utilisé (Fig.27, 28, 29).

2.1.1 PDL1 Roche

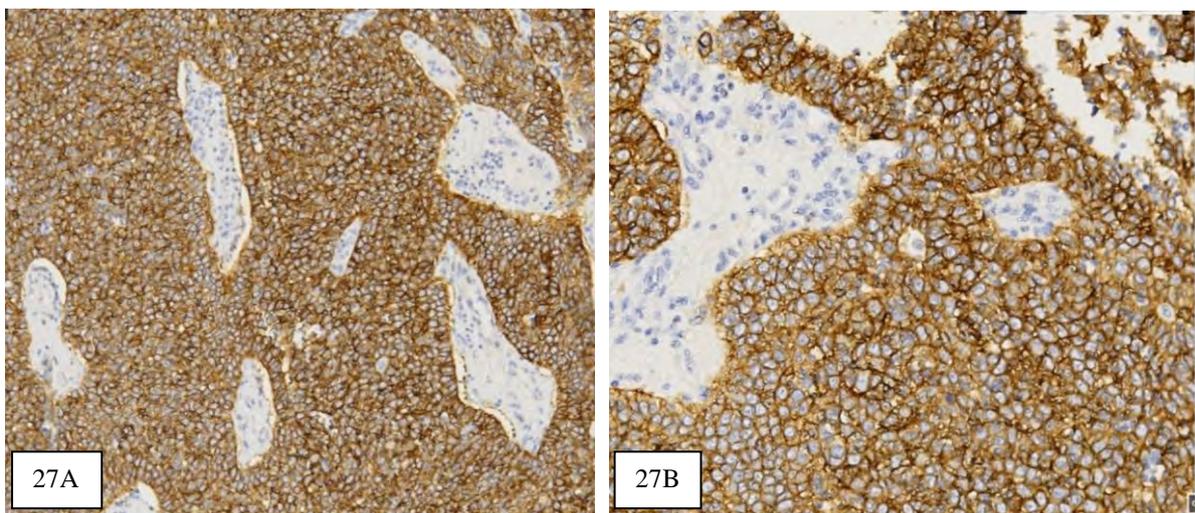


Figure 27 A-B : Marquage intense (3+) des cellules tumorales et absence de marquage des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 Roche (clone SP142).

2.2 2 PDL1 CST

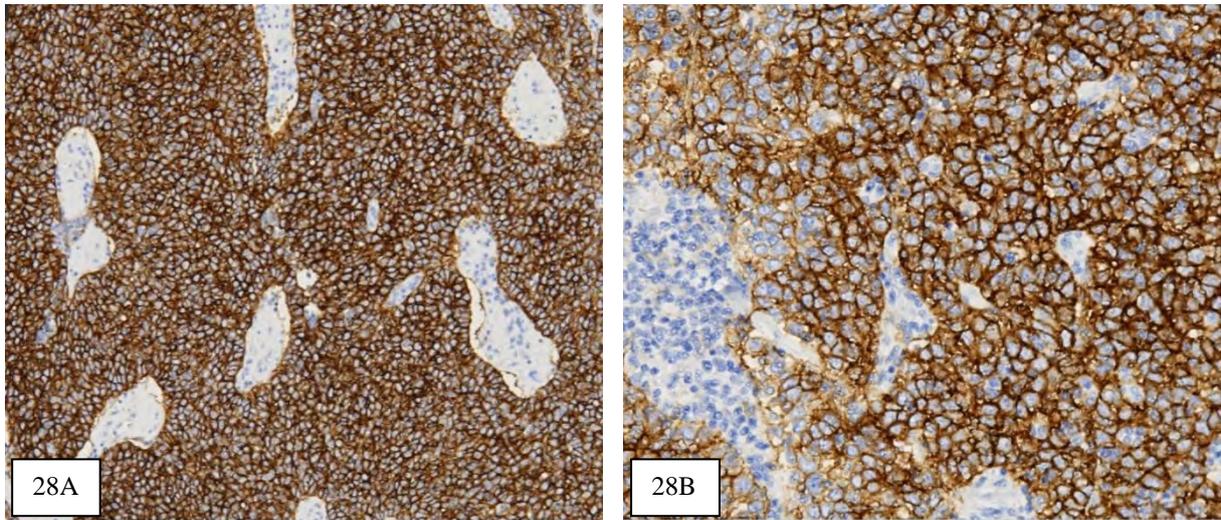


Figure 28 A-B : Marquage intense (3+) des cellules tumorales et absence de marquage des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 CST (clone E1L3N).

2.2 3 PDL1 Dako

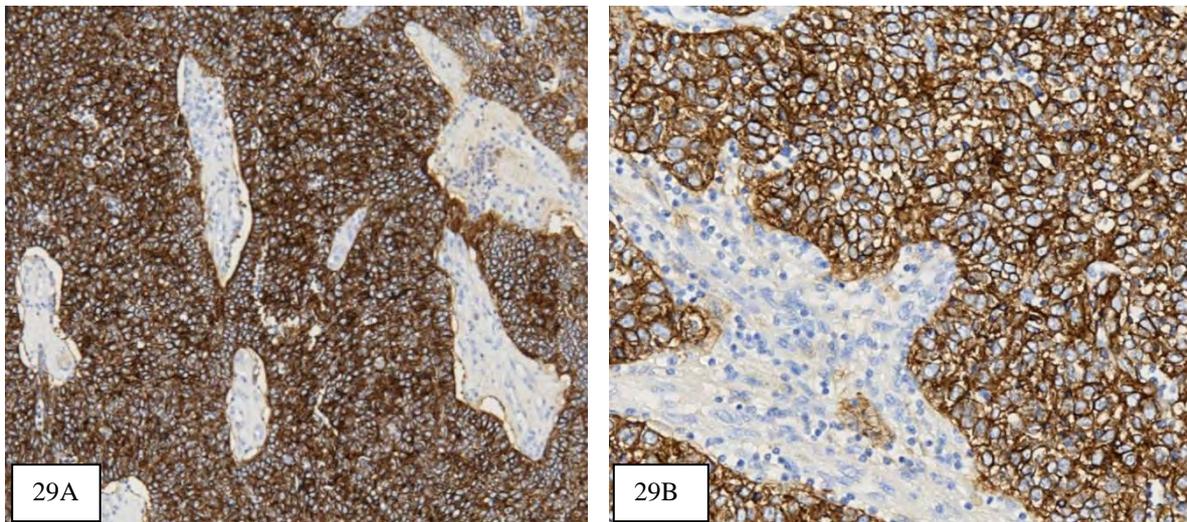


Figure 29 A-B : Marquage intense (3+) des cellules tumorales et absence de marquage des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 Dako (clone 22C3).

2.2 PD1

Les cellules épithéliales ne sont jamais marquées.

Les lymphocytes présentant un marquage avec PD1 sont peu nombreux. On les retrouve parfois en situation juxta tumorale, ou plus intriqués avec les cellules épithéliales (Fig.30). A noter que l'on retrouve parfois des centres germinatifs marqués (Fig.31).

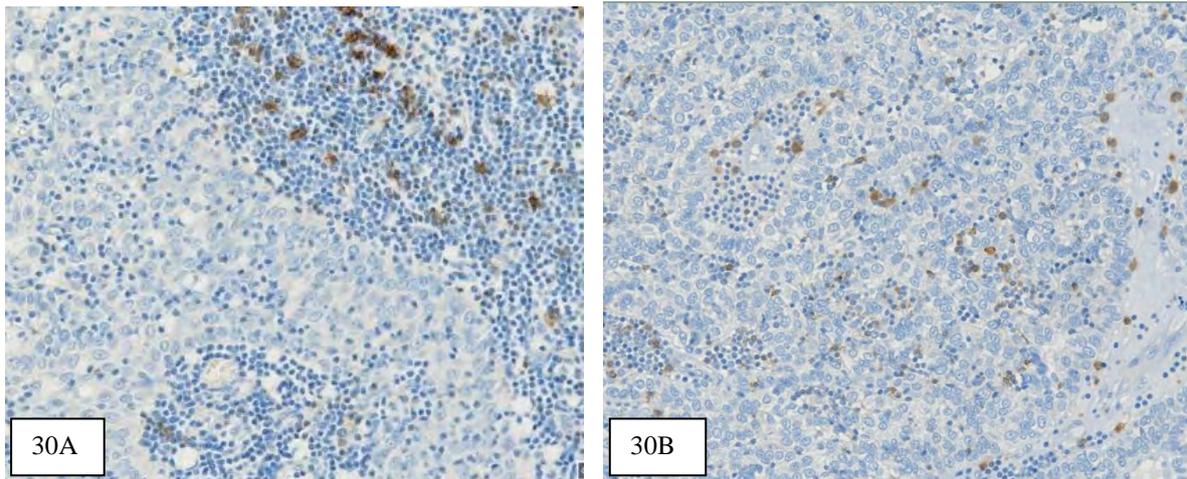


Figure 30 A : marquage des lymphocytes avec PD1 au sein d'un infiltrat péri tumoral.

Figure 30 B : marquage des lymphocytes avec PD1 au sein même des massifs tumoraux.

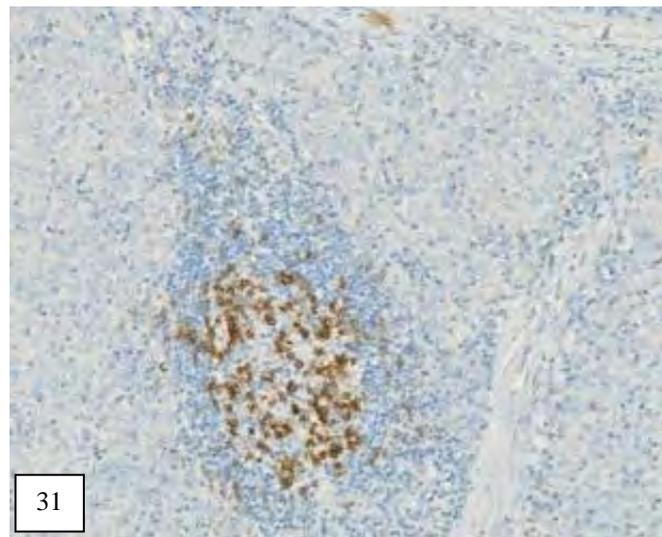


Figure 31 : exemple de marquage d'un centre germinatif servant de témoin positif interne.

2.3 CD8

L'anticorps anti-CD8 montre un marquage intense des lymphocytes T CD8 (Fig.32A-B).

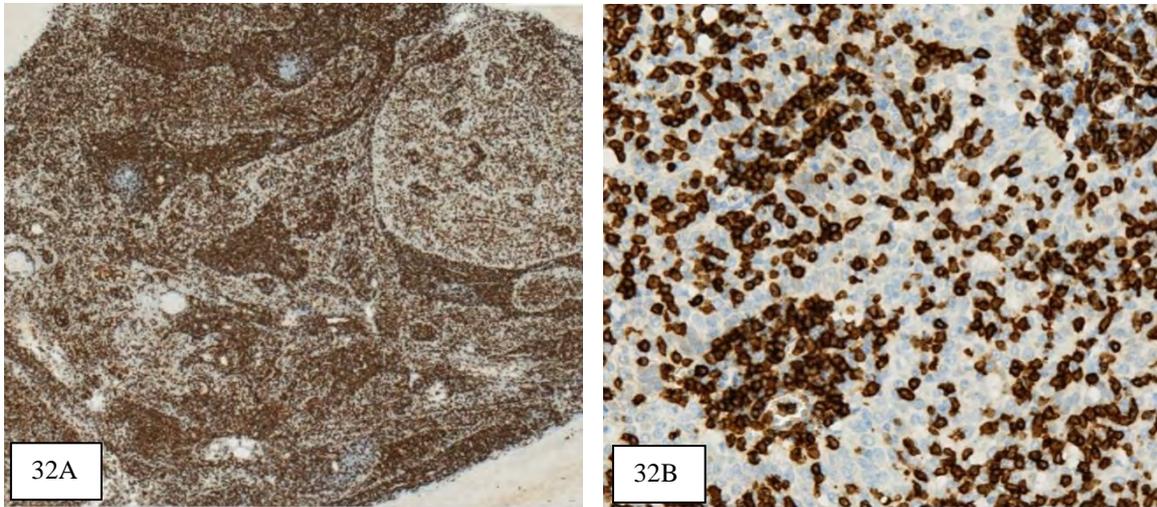


Figure 32A-B : marquage intense des lymphocytes au sein de la prolifération avec CD8

On note également parfois un marquage membranaire en cadre d'intensité variable des cellules épithéliales (Fig.32C-D).

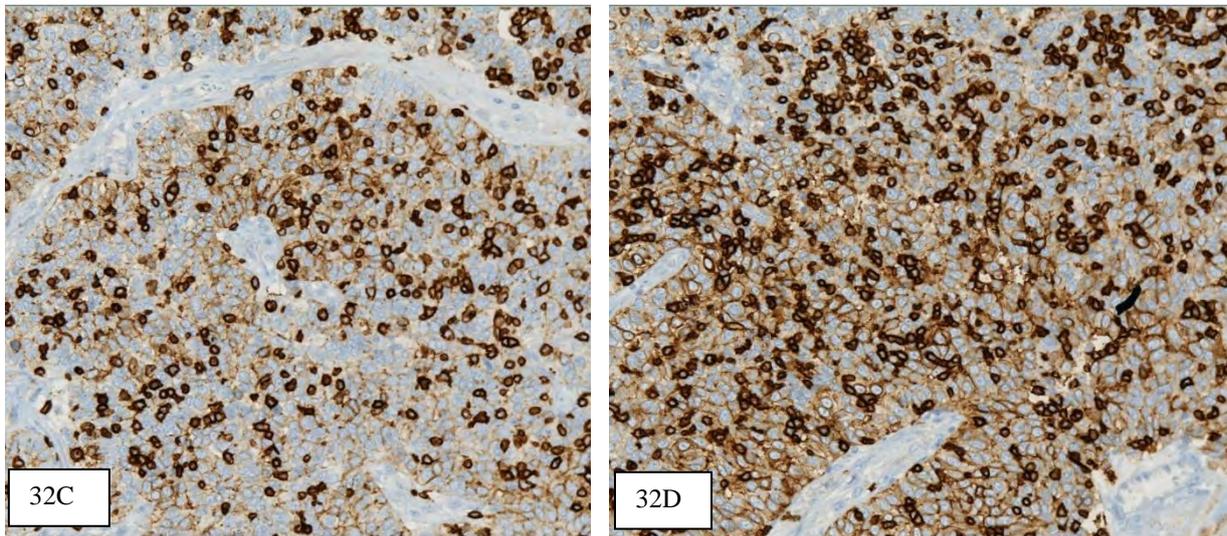


Figure 32 C-D : marquage intense en cadre des cellules tumorales et des lymphocytes T présents avec CD8.

3. MARQUAGES SUR LES CARCINOMES THYMIQUES

Nous avons constaté avec les trois anticorps utilisés un marquage absent ou faible des cellules tumorales sur la majorité des carcinomes thymiques (tableaux 12-13). Il existait dans un certain nombre de cas un marquage net des lymphocytes (Fig.33-35).

3.1. PDL1

3.1.1 PDL1 Roche

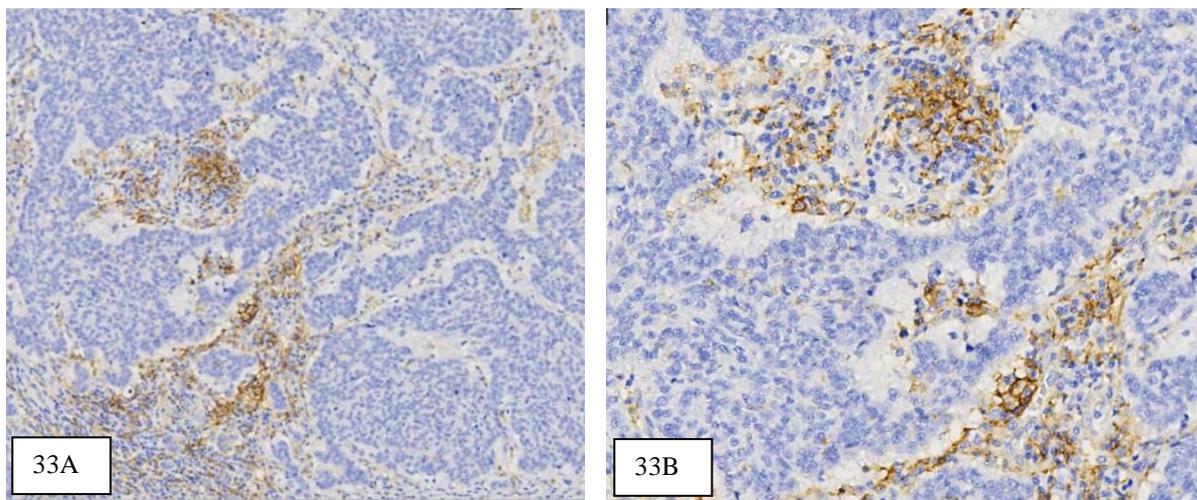


Figure 33 A-B : Absence de marquage des cellules tumorales et marquage d'intensité moyenne à forte des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 Roche Ventana (clone SP142).

3.1.2 PDL1 CST

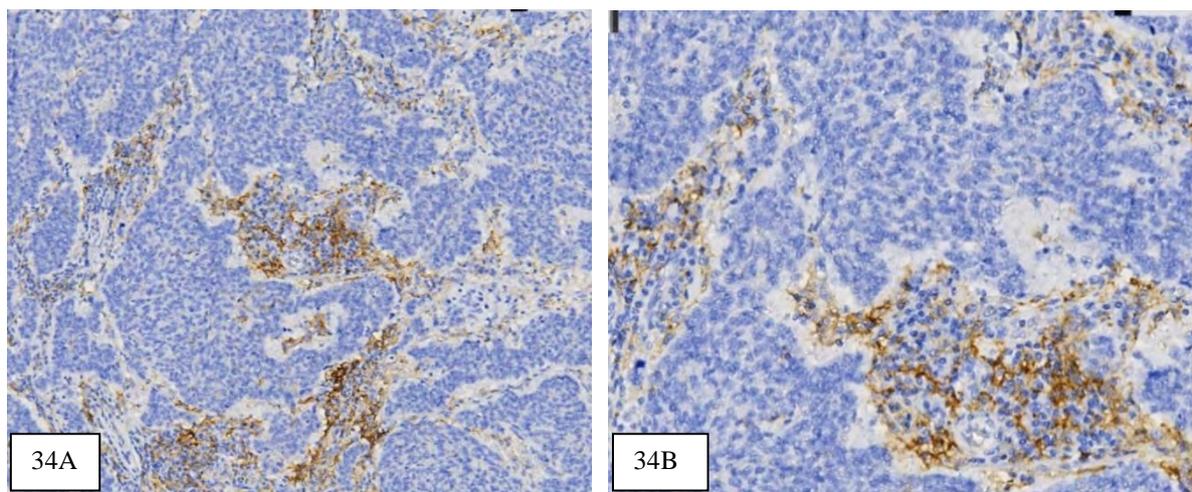


Figure 34 A-B : Absence de marquage des cellules tumorales et marquage d'intensité moyenne à forte des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 CST (clone E1L3N).

3.1.3 PDL1 Dako

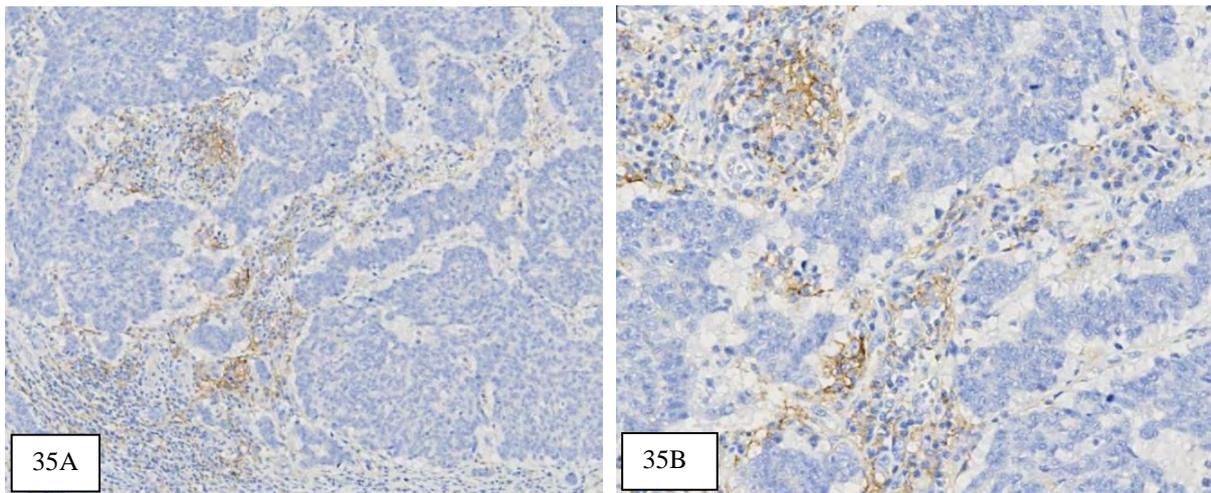


Figure 35 A-B : Absence de marquage des cellules tumorales et marquage d'intensité moyenne à forte des lymphocytes avec l'anticorps anti-PDL1 Dako (clone 22C3).

3.2. CD8

Nous avons retrouvé comme pour les thymomes B3 un marquage des lymphocytes mais aussi de quelques cellules tumorales avec CD8. L'intensité de ce marquage était parfois hétérogène comme l'illustre les figures 36A et 36B.

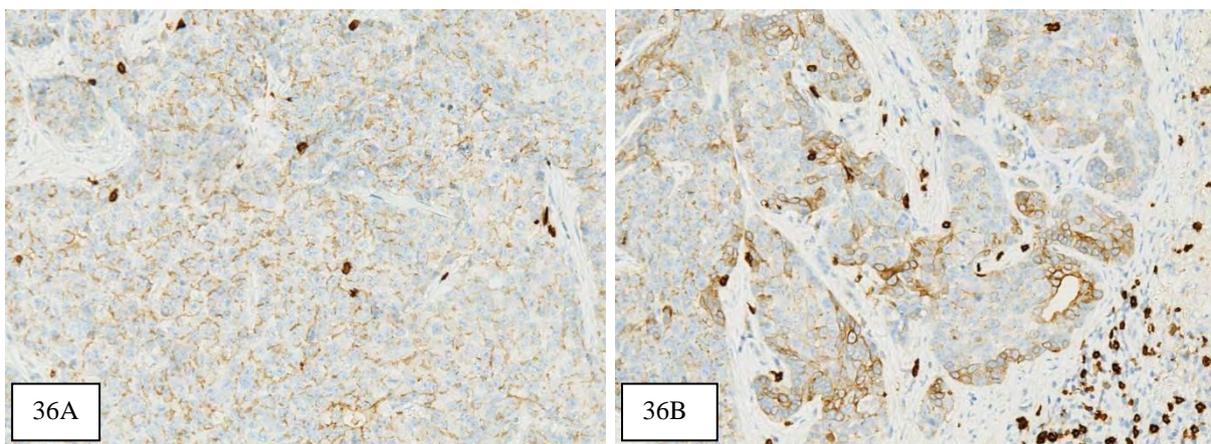


Figure 36 A-B : marquage à la fois du contingent tumoral et des lymphocytes et hétérogénéité de marquage des cellules tumorales avec CD8.

3.3. PD1

Comme pour les thymomes B3, les lymphocytes présentant un marquage PD1 sont peu nombreux et plutôt en situation juxta tumorale (Fig37).

Il n'a pas été trouvé de corrélation systématique avec le marquage CD8.

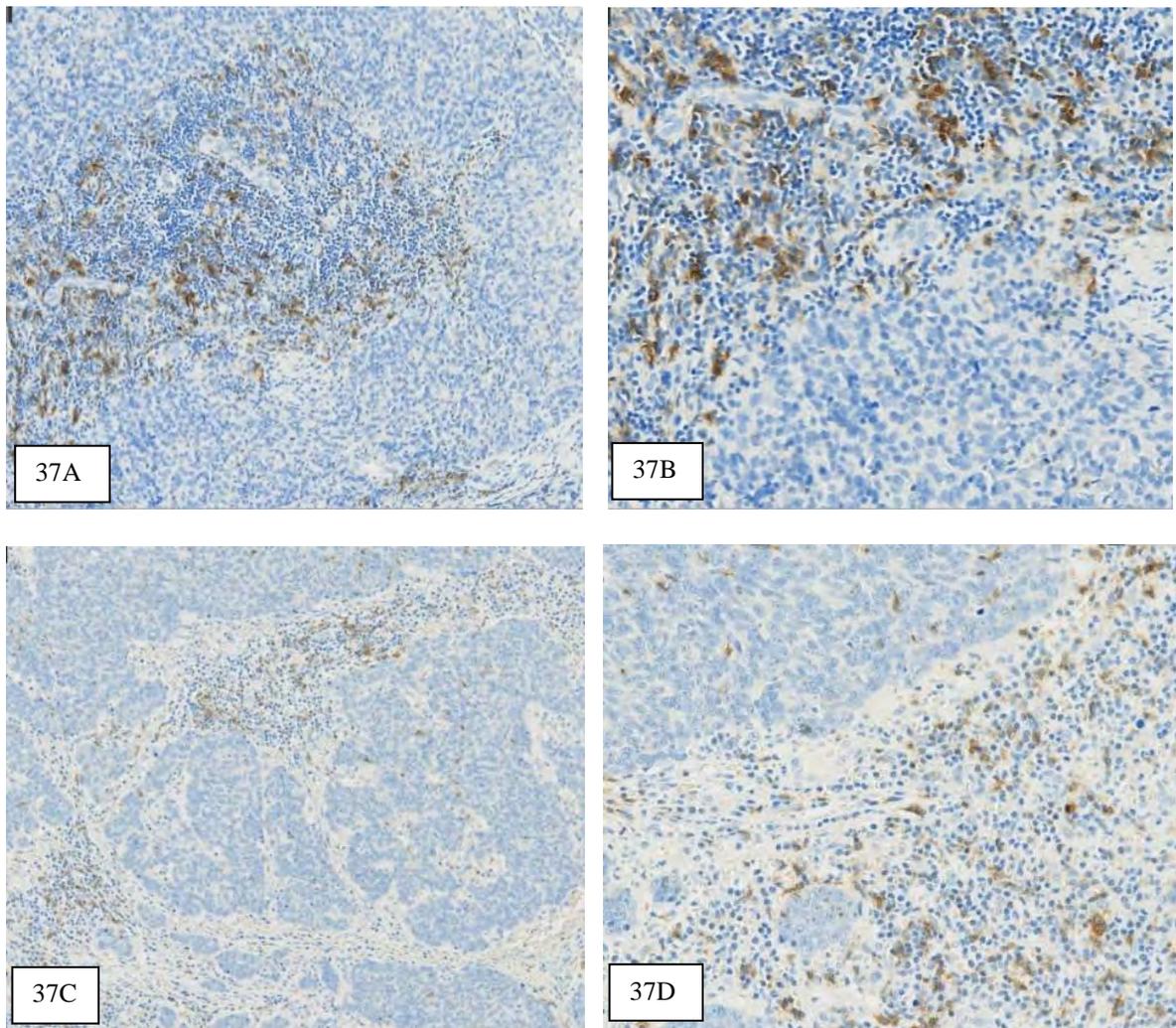


Figure 37 A-D : exemple de marquage des lymphocytes intra tumoraux avec PD1.

4. COMPARAISON DU MARQUAGE DES DIFFERENTS CLONES

Expression respective des clones anti-PDL1 de Dako, de CST et de Roche/Ventana (Fig38).

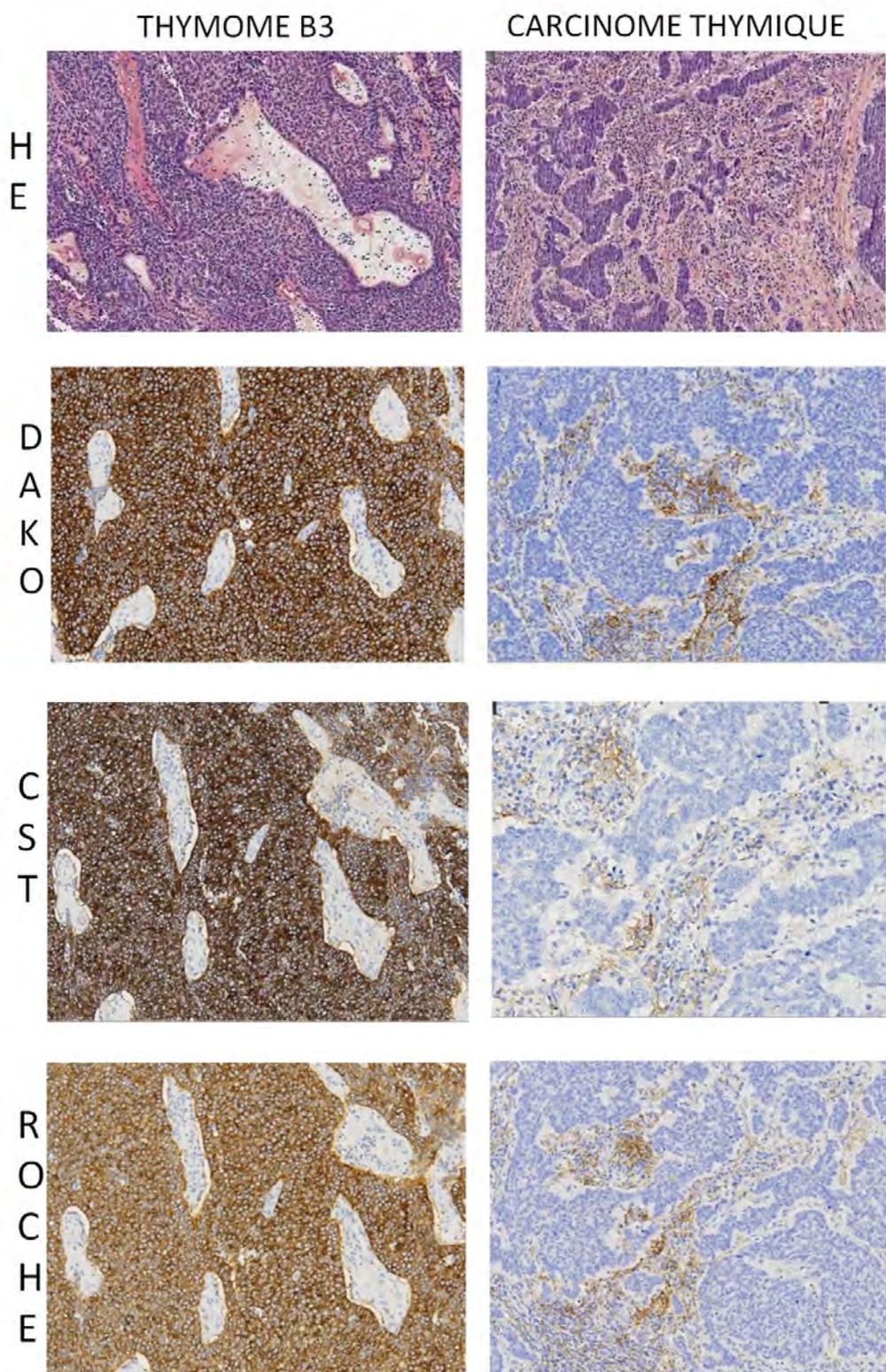


Figure 38 : comparaison des marquages en fonction des différents clones de PDL1.

5. PRESENTATION DES RESULTATS

5.1 Marquage PDL1 selon le pourcentage de cellules tumorales

Pour interpréter les résultats nous avons fixé un seuil de pourcentage de cellules marquées, au-delà duquel les tumeurs sont considérées comme positives, quelle que soit l'intensité du marquage.

Pour choisir ce seuil nous nous sommes calqués sur les essais cliniques CHECKMATE et KEYNOTE 001.

Deux seuils ont été utilisés dans ces essais : un seuil de 1% et un seuil de 50%.

Dans notre étude, le seuil de 50% montre une différence significative pour les trois anticorps entre les thymomes B3 fortement marqués et les carcinomes thymiques faiblement et plus rarement marqués.

Les tableaux 12 illustrent ces résultats pour chaque clone.

Tableau 12A : comparaison du pourcentage de marquage PDL1 Roche

| PDL1 Roche | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <50% | 33,3% (6) | 90,9% (20) |
| Marquage ≥50% | 66,7% (12) | 9,1% (2) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,0002

Tableau 12B : comparaison du pourcentage de marquage PDL1 CST

| PDL1 CST | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <50% | 27,8% (5) | 81,8% (18) |
| Marquage ≥50% | 72,2% (13) | 18,2% (4) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,001

Tableau 12C : comparaison du pourcentage de marquage PDL1 Dako

| PDL1 Dako | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <50% | 33,3% (6) | 86,4% (19) |
| Marquage ≥50% | 66,7% (12) | 13,6% (3) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,0009

5.2 Marquage PDL1 selon le H-Score

En utilisant le H-Score le seuil le plus discriminant se situait à 40 quel que soit l'anticorps utilisé, les thymomes B3 présentant un H-score en règle >40.

Au vu des résultats, le H score ne permet pas de faire apparaître une différence significative par rapport à l'analyse du pourcentage de cellules marquées, les différences d'intensité du marquage n'ont donc pas d'impact sur les résultats.

Les tableaux ci-dessous illustrent ces résultats en fonction de chaque clone.

Tableau 13A : comparaison du H-Score de marquage PDL1 Roche

| PDL1 Roche | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-----------------------|------------|--------------------|
| H-Score <40 | 22,2% (4) | 77,2% (17) |
| H-Score ≥40 | 77,8% (14) | 22,7% (5) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,001

Tableau 13B : comparaison du H-Score de marquage PDL1 CST

| PDL1 CST | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-----------------------|------------|--------------------|
| H-Score <40 | 27,8% (5) | 77,2% (17) |
| H-Score ≥40 | 72,2% (13) | 22,8% (5) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,004

Tableau 13C : comparaison du H-Score de marquage PDL1 Dako

| PDL1 Dako | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|-----------------------|------------|--------------------|
| H-Score <40 | 22,2% (4) | 77,2% (17) |
| H-Score ≥40 | 77,8% (14) | 22,8% (5) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,001

5.3 Corrélation de marquage de PDL1 entre les différents prélèvements d'un même patient

4.3.1. Entre biopsie initiale et exérèse chirurgicale

Seul quatre patients avaient à la fois la biopsie initiale diagnostique et un prélèvement chirurgical opératoire parfois obtenu après chimiothérapie.

Nous avons constaté une corrélation du score d'intensité et du H score pour trois d'entre eux.

Pour le dernier patient il existait une grosse discordance avec une forte positivité sur la métastase et une absence d'expression sur la pièce initiale.

Ces données ne sont pas interprétables en raison du petit nombre de patients concernés. Il serait intéressant de pouvoir les étudier sur une plus grande série.

4.3.2 Entre les différents prélèvements

Sur les dix patients qui ont eu plusieurs prélèvements, la reproductibilité du marquage varie en fonction du seuil de positivité fixé. Là encore aucune information statistiquement exploitable ne peut être dégagée et l'étude devra être étendue à d'autres patients.

5.4 Marquage de PDL1 sur les lymphocytes intra tumoraux

En ce qui concerne le marquage des lymphocytes avec PDL1 nous avons fixé un seuil de positivité à 1%. Le tableau 14 illustre ces résultats en fonction de chaque clone.

Tableau 14A : comparaison du marquage PDL1 Roche sur les lymphocytes

| PDL1 Roche | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <1% | 72,2% (13) | 50% (11) |
| Marquage ≥1% | 27,8% (5) | 50% (11) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,202 (non significatif)

Tableau 14B : comparaison du marquage PDL1 CST sur les lymphocytes

| PDL1 CST | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <1% | 72,2% (13) | 50% (11) |
| Marquage ≥1% | 27,8% (5) | 50% (11) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0,202 (non significatif)

Tableau 14C : comparaison du marquage PDL1 Dako sur les lymphocytes

| PDL1 Dako | Thymome B3 | Carcinome thymique |
|------------------------|------------|--------------------|
| Marquage <1% | 61,1% (11) | 45,4% (10) |
| Marquage ≥1% | 38,9% (7) | 54,5% (12) |
| Total | 100% (18) | 100% (22) |

Fisher : p : 0.359 (non significatif)

Une tendance semble se dégager et elle met en évidence un marquage moins fréquent des lymphocytes dans les thymomes que dans les carcinomes.

5.5 Marquage de CD8 sur les cellules tumorales

Un marquage membranaire au moins focal des cellules tumorales a été observé dans presque la moitié des cas, sans différence significative entre thymomes B3 et carcinomes thymiques.

L'anticorps est connu pour marquer des éléments autres que les lymphocytes. La fiche technique met en garde contre ce genre de marquage non spécifique. Cependant ce marquage des cellules tumorales est retrouvé de façon concordante pour trois des onze patients ayant plusieurs prélèvements de leur carcinome thymique.

5.6 Marquage de CD8 sur les lymphocytes

La quasi-totalité des prélèvements présente un marquage des lymphocytes avec CD8 sans différence significative même si dans les carcinomes thymiques le pourcentage de lymphocytes marqués semble plus faible que dans les thymomes B3.

5.7 Marquage de PD1 sur les cellules tumorales

Nous n'avons retrouvé aucun marquage des cellules tumorales avec PD1.

5.8 Marquage de PD1 sur les lymphocytes

Le marquage des lymphocytes par PD1 est retrouvé dans plus de la moitié des prélèvements. On note moins de lymphocytes marqués qu'avec l'anticorps anti-CD8.

5.9 Corrélation des résultats immunohistochimiques

Nous avons aussi recherché des corrélations de marquages entre les différents anticorps utilisés.

Ces corrélations sont synthétisées dans le tableau 15.

Abréviations utilisées :

Ct : Carcinome thymique

B3 : thymome B3

CD8+ L : marquage des lymphocytes par CD8

CD8- L : absence de marquage des lymphocytes par CD8

CD8+ CT : marquage des cellules tumorales par CD8

CD8- CT : absence de marquage des cellules tumorales par CD8

PD1+ : marquage des lymphocytes par PD1

PD1- : absence de marquage des lymphocytes par PD1

PDL1+ L : marquage des lymphocytes par PDL1

PDL1- L : absence de marquage des lymphocytes par PDL1

PDL1+ CT : marquage des cellules tumorales par PDL1

PDL1- CT : absence de marquage des cellules tumorales par PDL1

D : Dako

C : Cell Signaling

R : Roche

| B3 \ Ct | CD8 + L | CD8- L | CD8 + CT | CD8 - CT | PD1 + | PD1 - | PDL1 + L | PDL1 - L | PDL1 + CT | PDL1 - CT |
|-----------|--|----------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|--|---|--|--|
| CD8 + L | 100%/90% (9/18) | x | 45% (10) | 45% (10) | 59% (13) | 32% (7) | D 45% (10) C 41% (9) R 45% (10) | D 45% (10) C 50% (11) R 45% (10) | D 27% (6) C 18% (4) R 14% (3) | D 64% (14) C 73% (16) R 77% (17) |
| CD8- L | x | 0%/9% (0/2) | 0% (0) | 9% (2) | 5% (1) | 5% (1) | D 9% (2) C 9% (2) R 9% (1) | D 0% (0) C 0% (0) R 5% (0) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 9% (2) C 9% (2) R 9% (2) |
| CD8 + CT | 50% (9) | 0% (0) | 50%/45% (9/10) | x | 32% (7) | 14% (3) | D 32% (7) C 23% (5) R 23% (5) | D 14% (3) C 23% (5) R 23% (5) | D 14% (3) C 18% (4) R 9% (2) | D 32% (7) C 27% (6) R 36% (8) |
| CD8 - CT | 50% (9) | 0% (0) | x | 41%/55% (9/12) | 32% (7) | 23% (5) | D 23% (5) C 27% (6) R 27% (6) | D 32% (7) C 27% (6) R 27% (7) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 54% (12) C 54% (12) R 54% (12) |
| PD1 + | 56% (10) | 0% (0) | 39% (7) | 17% (3) | 56%/64% (10/14) | x | D 41% (9) C 36% (8) R 36% (8) | D 23% (5) C 27% (6) R 27% (6) | D 9% (2) C 14% (3) R 9% (2) | D 54% (12) C 50% (11) R 54% (12) |
| PD1 - | 44% (8) | 0% (0) | 11% (2) | 33% (6) | x | 44%/36% (8/8) | D 14% (3) C 14% (3) R 14% (3) | D 23% (5) C 23% (5) R 23% (5) | D 5% (1) C 5% (1) R 0% (0) | D 32% (7) C 32% (7) R 36% (8) |
| PDL1 + L | D 39% (7) C 28% (5) R 22% (4) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 33% (6) C 17% (3) R 17% (3) | D 6% (1) C 11% (2) R 6% (1) | D 39% (7) C 22% (4) R 22% (4) | D 0% (0) C 6% (1) R 0% (0) | D 39%/53% (7/12) C 28%/50% (5/11) R 22%/50% (4/11) | x | D 9% (2) C 5% (1) R 5% (1) | D 45% (10) C 45% (10) R 45% (10) |
| PDL1 - L | D 61% (11) C 72% (13) R 78% (14) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 17% (3) C 33% (6) R 33% (6) | D 44% C 39% R 44% | D 17% (3) C 33% (6) R 33% (6) | D 44% (8) C 39% (7) R 44% (8) | x | D 50%/45% (11/10) C 59%/50% (13/11) R 64%/50% (14/11) | D 5% (1) C 17% (3) R 5% (1) | D 41% (9) C 36% (8) R 50% (11) |
| PDL1 + CT | D 67% (12) C 72% (13) R 72% (13) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 39% (7) C 44% (8) R 39% (7) | D 28% C 28% R 28% | D 50% (9) C 50% (9) R 44% (8) | D 17% (3) C 22% (4) R 22% (4) | D 33% (6) C 22% (4) R 17% (3) | D 33% (6) C 50% (9) R 50% (9) | D 67%/14% (12/3) C 72%/18% (13/4) R 67%/11% (12/2) | x |
| PDL1 - CT | D 33% (6) C 28% (5) R 33% (6) | D 0% (0) C 0% (0) R 0% (0) | D 11% (2) C 6% (1) R 11% (2) | D 22% C 22% R 22% | D 6% (1) C 6% (1) R 11% (2) | D 28% (5) C 22% (4) R 22% (4) | D 6% (1) C 6% (1) R 6% (1) | D 28% (5) C 22% (4) R 28% (5) | x | D 33%/86% (6/19) C 23%/82% (5/18) R 33%/90% (6/20) |

Tableau 15 : synthèse et corrélation des marquages immunohistochimiques.

5.10 Analyse de la survie globale selon le marquage PDL1

La survie globale est meilleure lorsque le marquage PDL1 est supérieur à 50% des cellules tumorales, quelle que soit l'intensité de ce marquage et quel que soit l'anticorps utilisé (Fig39).

5.9.1 Selon les résultats clone 22C3 Dako

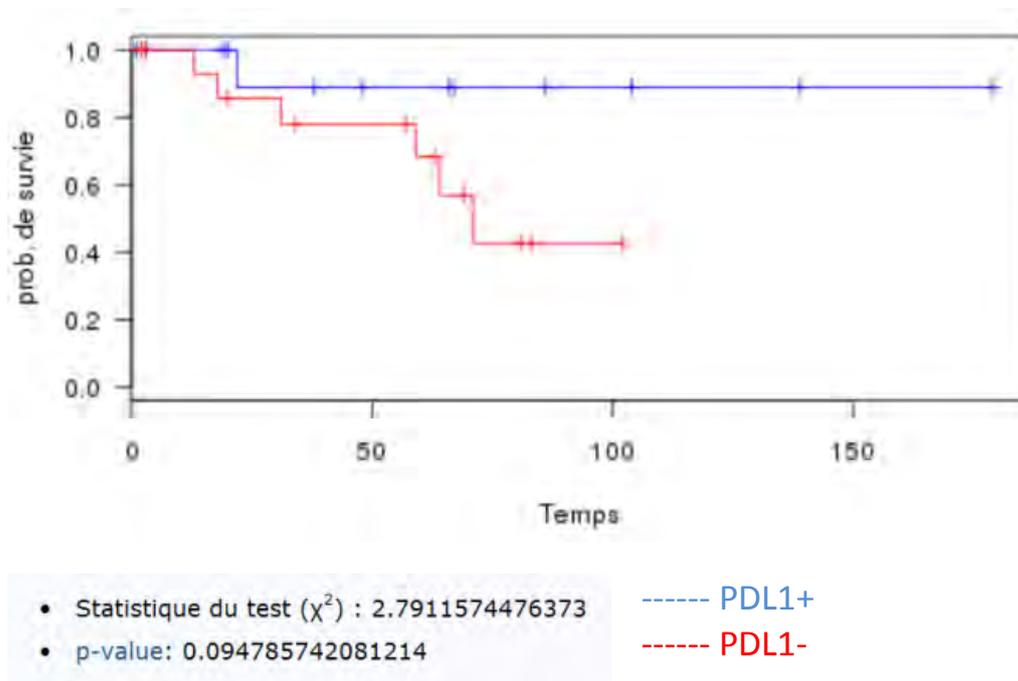


Figure 39A : Courbe de survie globale selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%. (clone22C3)

On visualise en bleu la courbe de survie globale des patients ayant un marquage de PDL1 sur $\geq 50\%$ des cellules tumorales et en rouge la courbe de survie globale des patients ayant un marquage de $< 50\%$ des cellules tumorales.

L'utilisation d'autres seuils (inférieur à 50%) n'a pas montré de tendance ou de différence significative.

5.9.2 Selon les résultats clone E1L3N CST

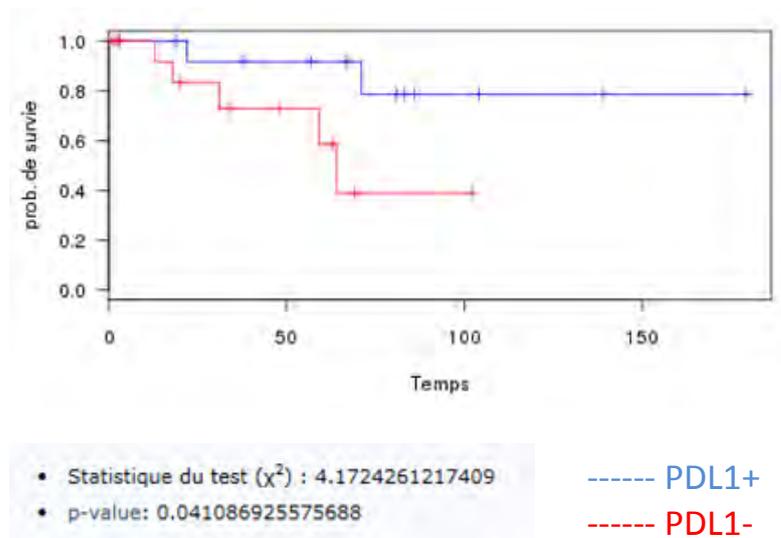


Figure 39B : Courbe de survie globale selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%.(cloneE1L3N).

5.9.3 Selon les résultats clone SP142 Roche

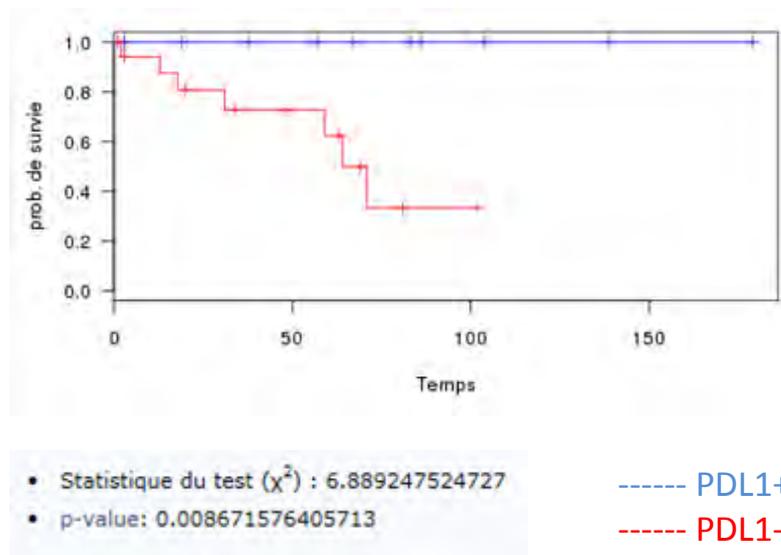
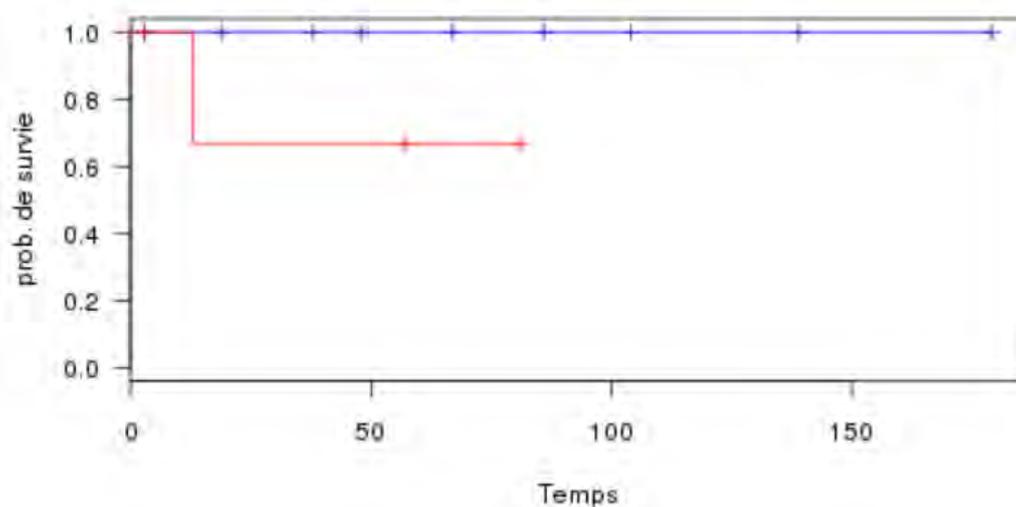


Figure 39C : Courbe de survie globale selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50% (clone SP142).

5.11 Analyse de la survie globale pour les thymomes B3

Les thymomes B3 sont plus marqués par PDL1 que les carcinomes thymiques mais ils sont aussi de meilleur pronostic. Il n'est donc pas surprenant de retrouver une survie globale supérieure pour les tumeurs marquées. Nous avons voulu ici essayer de comparer la survie globale des seuls patients atteints de thymomes B3. Comme le met en évidence la Figure 40, le petit nombre de patients et d'évènements nous donne seulement une tendance en faveur d'une meilleure survie pour les thymomes B3 marqués sans que cela soit statistiquement significatif.



p : 0,083 (tendance)

- Statistique du test (χ^2) : 3
- p-value: 0.083264516663551

----- PDL1+
----- PDL1-

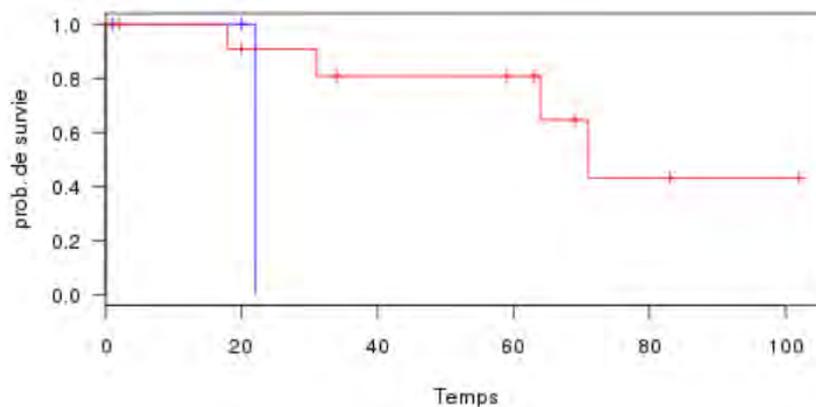
Figure 40 : Courbe de survie globale pour les thymomes B3 selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%.

On visualise en bleu la courbe de survie globale des patients ayant un marquage de PDL1 sur $\geq 50\%$ des cellules tumorales et en rouge la courbe de survie globale des patients ayant un marquage de $< 50\%$ des cellules tumorales.

5.12 Analyse de la survie globale pour les carcinomes thymiques

De la même manière que pour les thymomes B3 nous avons essayé de comparer la survie globale des patients atteints de carcinome thymique en fonction du marquage par PDL1.

Cette fois-ci nous avons une tendance où la survie globale des carcinomes serait supérieure lorsque le marquage est absent mais il existe trop peu d'événements pour en tirer une conclusion fiable (Fig.41).



p : 0,112 (tendance)

- Statistique du test (χ^2) : 2.5286213383499
 - p-value: 0.11179785765571
- PDL1+
----- PDL1-

Figure 41: Courbe de survie globale pour les carcinomes thymiques selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%.

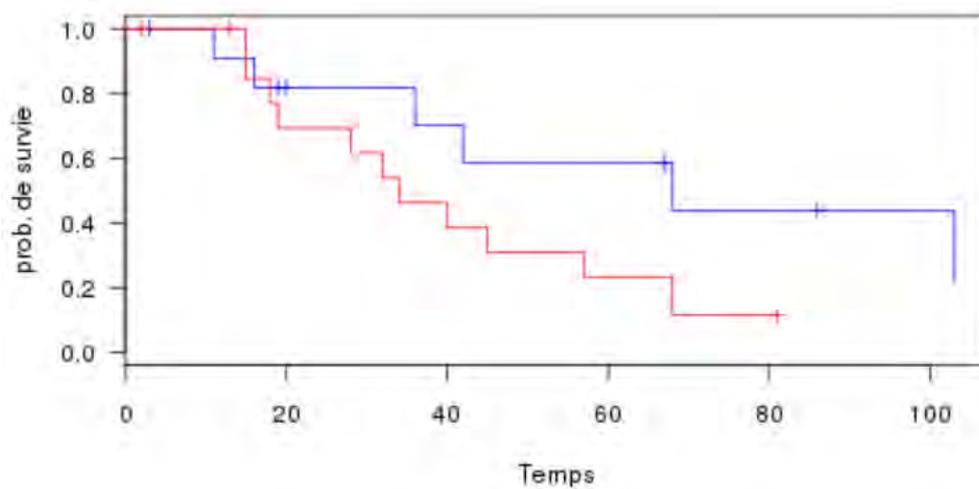
Bleu : survenue des évènements dans le groupe avec marquage >50% des cellules tumorales

Rouge : survenue des évènements dans le groupe avec marquage <50% des cellules tumorales

5.13 Analyse de la survie sans progression

La survie sans progression semble meilleure lorsque le marquage PDL1 est supérieur à 50% des cellules tumorales. Nous dégageons une tendance avec les marquages obtenus avec l'anticorps 22C3 de Dako alors qu'il n'est pas mis en évidence de différence avec les clones E1L3N et SP142 mais cela est sans doute dû au petit nombre de patients et d'événements (Fig.42).

5.13.1 Selon les résultats clone 22C3 Dako



p : 0,114 (tendance)

- Statistique du test (χ^2) : 2.503070891445
- p-value: 0.11362454486728

----- PDL1+
----- PDL1-

Figure 42A: Courbe de survie sans progression selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%. (clone 22C3 Dako)

Bleu : survenue des évènements dans le groupe avec marquage >50% des cellules tumorales

Rouge : survenue des évènements dans le groupe avec marquage <50% des cellules tumorales

5.13.2 Selon les résultats clone E1L3N CST

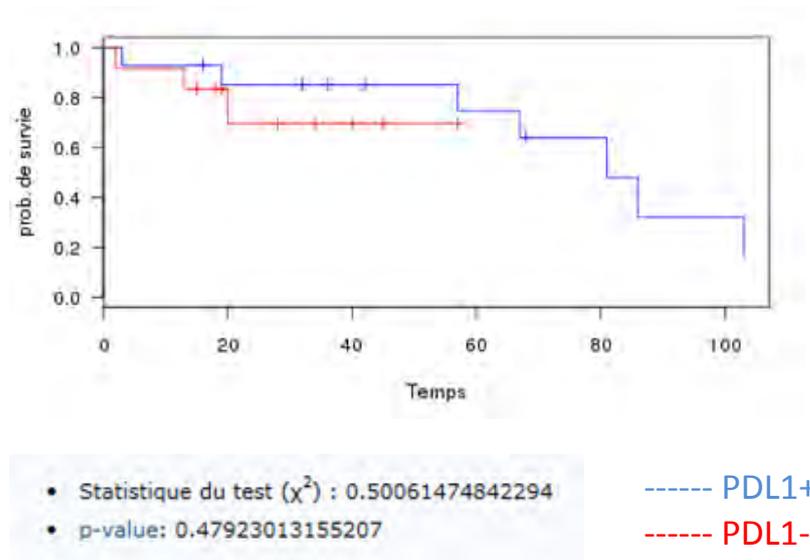


Figure 42B: Courbe de survie sans progression selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%. (clone E1L3N CST)

5.13.3 Selon les résultats clone SP142 Roche

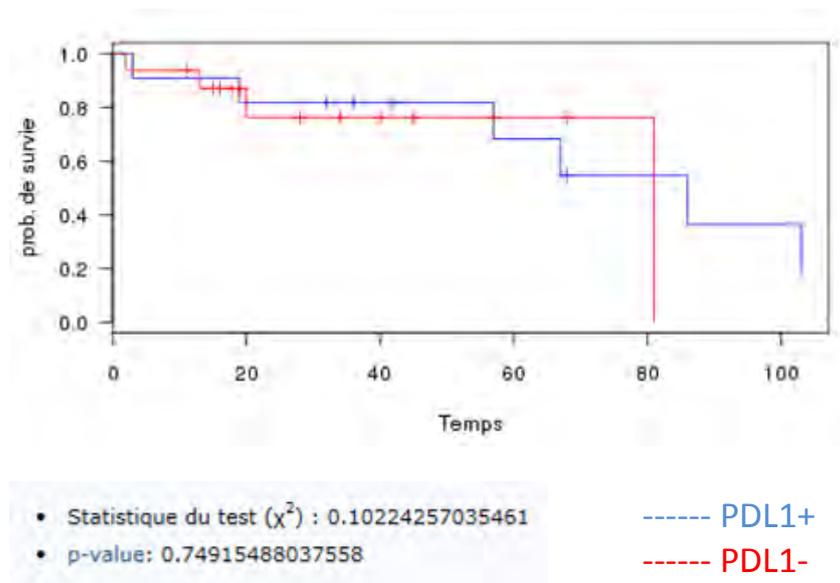


Figure 42C : Courbe de survie sans progression selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%. (clone SP142 Roche).

5.14 Analyse de la survie sans progression des thymomes B3

On n'observe pas de différence significative pour la survie sans progression au sein des thymomes B3 (Fig.43).

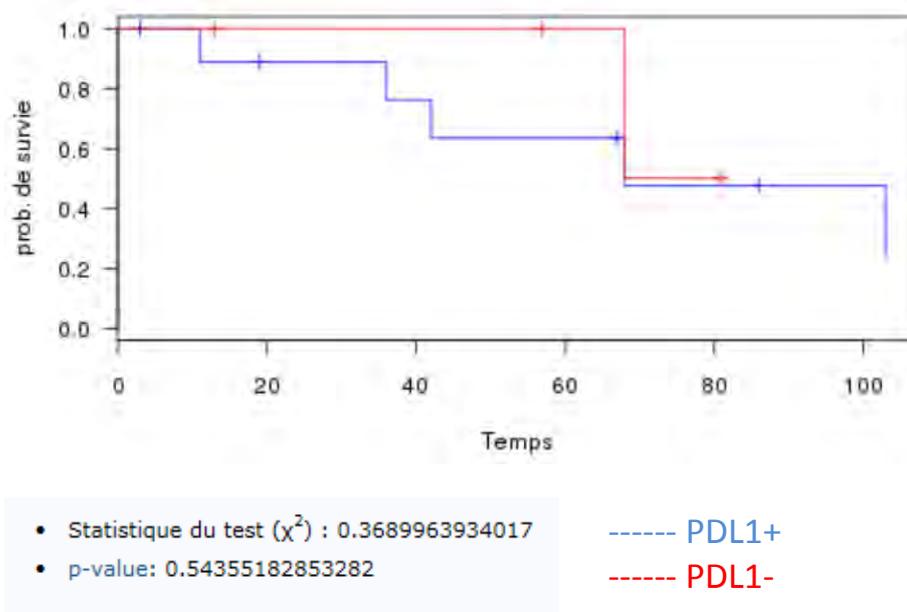


Figure 43 : Courbe de survie sans progression pour les thymomes B3 selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%.

Bleu : survenue des évènements dans le groupe avec marquage >50% des cellules tumorales

Rouge : survenue des évènements dans le groupe avec marquage <50% des cellules tumorales

5.15 Analyse de la survie sans progression des carcinomes thymiques

On n'observe pas de différence significative pour la survie sans progression au sein des carcinomes thymiques (Fig.44).

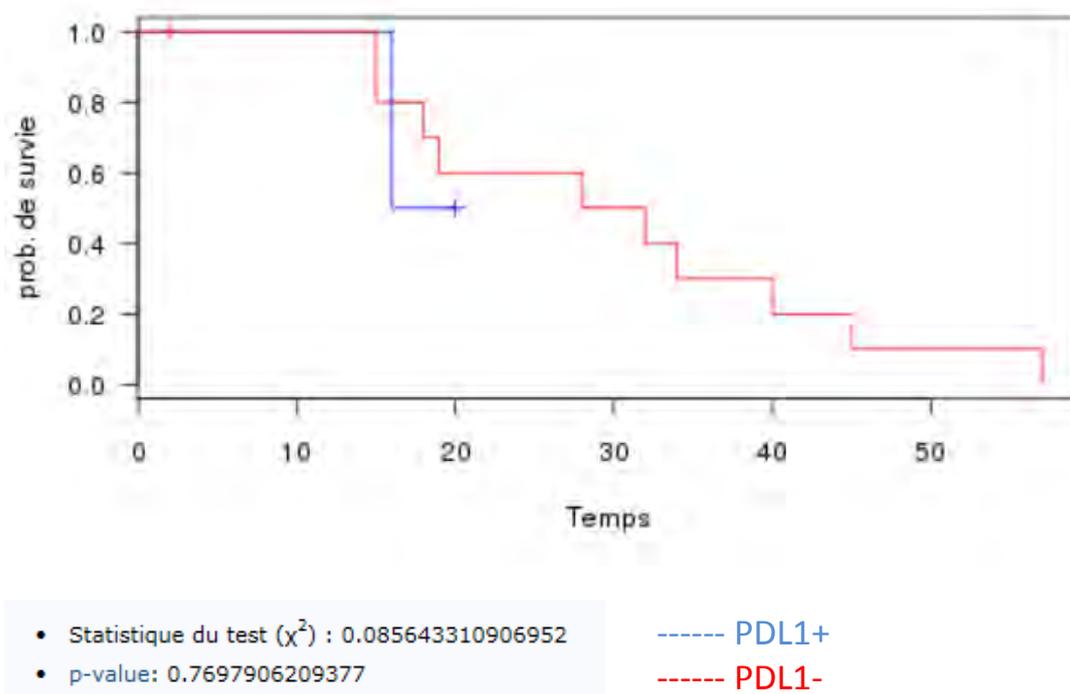


Figure 44: Courbe de survie sans progression pour les thymomes B3 selon Kaplan-Meier avec un seuil à 50%.

Bleu : survenue des évènements dans le groupe avec marquage >50% des cellules tumorales

Rouge : survenue des évènements dans le groupe avec marquage <50% des cellules tumorales

V. DISCUSSION

Notre travail est la première étude comparative de l'expression de différents clones de PDL1 sur une série de thymomes B3 et de carcinomes thymiques associée à une corrélation anatomo-clinique complète avec suivi évolutif des patients.

Les rares séries publiées à ce jour ont été effectuées sur des tissu arrays, sur tout type de thymome, en général avec un seul anticorps, souvent non disponible dans le commerce, et sans corrélation au suivi.

Notre travail s'est appuyé sur une relecture systématique par deux pathologistes dont un pathologiste expert du groupe de relecture national Rythmic. Nous nous sommes limités aux thymomes B3 et aux carcinomes thymiques qui sont les tumeurs qui pourraient le plus tirer un bénéfice de l'immunothérapie en raison de leur caractère souvent inopérable. Ce sont aussi les formes les plus riches en cellules épithéliales tumorales.

Au-delà de la problématique des tumeurs thymiques, il s'agit de la première étude comparative entre différents clones d'anticorps anti-PDL1. Si on prend l'exemple du cancer bronchique, dans les essais cliniques, un seul anticorps est utilisé à chaque fois, différent selon la molécule et le laboratoire concerné avec des seuils de positivité qui varient dans le temps. Les études réalisées en dehors des essais cliniques ont souvent utilisé un seul anticorps non commercial. Les études comparatives sont exceptionnelles et se limitent à deux anticorps dont le 5H1 non commercialisé.

Notre travail a permis d'affiner la mise au point technique de trois clones différents dont deux sont commercialisés, le troisième en voie de commercialisation ayant été utilisé dans un gros essai clinique récent.

Nous avons utilisé, un anticorps de type test compagnon fermé (22C3 Dako) pour lequel aucune adaptation technique n'est possible, un anticorps nécessitant une mise au point (E1L3N Cell Signaling) et un anticorps pressenti pour un test compagnon sur un automate mais qui a dû faire l'objet d'adaptations techniques (SP142 Roche Ventana).

Nos résultats montrent que ces trois anticorps peuvent être utilisés avec des résultats superposables en respectant certaines contraintes techniques.

Une étude menée en 2011 sur les mélanomes avait suggéré un impact important du préanalytique sur les performances des anticorps anti-PDL1 mais elle avait testé des anticorps non commercialisés ou polyclonaux qui n'ont pas été retenus dans les études ultérieures et le marquage décrit était d'ailleurs décrit comme cytoplasmique, avec un important bruit de fond, très différent du marquage membranaire net observé dans notre travail et dans les dernières publications (65).

Les mises au point qui ont été nécessaires sur un des clones confirment que la phase du démasquage antigénique reste le point critique comme pour de nombreux anticorps mais l'homogénéité des résultats laisse penser que les trois clones concernent des épitopes antigéniques proches, et sont des anticorps robustes dans l'ensemble moins sensibles que d'autres aux variations du préanalytique.

Ces variations sont réelles dans notre série qui s'étendait de 2004 à 2015 avec des prises en charge qui ont pu varier dans le temps.

Nous ne connaissons pas les durées exactes de fixation : les biopsies étaient généralement fixées dans le formol dans un délai de six à douze heures mais la qualité de fixation des pièces opératoires est plus difficile à évaluer en fonction du délai d'acheminement et du délai de fixation.

Enfin les prélèvements le plus anciens ont pu souffrir de leurs conditions de stockage.

Nous avons cependant écarté systématiquement les prélèvements non fixés au formol et les prélèvements provenaient tous d'un même centre ce qui limite les écarts liés à un recrutement plus étendu.

Notre étude a montré une bonne reproductibilité entre les différents anticorps anti-PDL1 pour le marquage des cellules tumorales épithéliales et des lymphocytes.

L'expression de PDL1 se traduit en règle par un marquage membranaire circonférentiel net des cellules tumorales épithéliales avec les trois clones utilisés. Le marquage des éléments lymphocytaires intriqués ou au contact de la tumeur est plus anecdotique. Il semble plus fréquent et plus intense dans les carcinomes thymiques qui ne renferment pas de thymocytes immatures. Il est corrélé avec le marquage par PD1 et CD8.

Il n'a pas été observé de marquage intense à la fois sur le contingent tumoral et sur le contingent immunitaire d'accompagnement. Le plus souvent les prélèvements fortement

marqués sur les cellules tumorales ne l'étaient pas sur le contingent lymphocytaire et inversement.

Nous avons été surpris de constater un marquage membranaire non exceptionnel des cellules épithéliales par CD8, reproductible d'un prélèvement à l'autre pour un même patient. Sa signification éventuelle reste à déterminer. Il n'est pas corrélé pourcentage et en intensité avec le marquage PDL1.

La différence de marquage des cellules épithéliales par PDL1 entre les thymomes B3 et les carcinomes est nette et significative dans notre petite série et semble montrer que les thymomes B3 pourraient tirer un plus grand bénéfice de l'immunothérapie si la forte expression de PDL1 était corrélée à l'efficacité du traitement.

Certains essais cliniques menés dans le cancer bronchique suggèrent que le marquage de la population immune d'accompagnement des cellules épithéliales tumorales pourrait aussi conditionner l'efficacité de certaines molécules anti PD1. Dans notre série le pourcentage de cellules marquées reste faible dans les deux types tumoraux mais dans quelques cas de carcinome, le marquage est fréquent et intense sur une population lymphocytaire par nature peu abondante dans ces tumeurs.

Notre travail a montré que plus de la moitié de nos pièces opératoires avaient un marquage hétérogène dans l'espace et que deux biopsies réalisées sur la même métastase pouvaient présenter des marquages différents. Nous ne disposons pas en revanche de suffisamment de couples biopsies/pièce opératoires pour apprécier la différence éventuelle de score entre les deux prélèvements

Dans le domaine du cancer bronchique où les diagnostics ont le plus souvent portés sur du matériel biopsique, le problème de la représentativité de l'immunohistochimie sur ce matériel se pose régulièrement. Le marquage observé sur la biopsie reflète-t-il l'expression de l'ensemble de la tumeur ?

Dans la littérature, l'hétérogénéité du marquage par PDL1 des cancers bronchiques est souligné dans plusieurs publications et le fait que des patients sans expression de PDL1 sur leur biopsie puissent présenter des réponses au traitement pourrait peut-être s'expliquer par cette hétérogénéité (66)(67).

Dans notre série seul le seuil de 50% de cellules marquées montre des différences d'expression significatives entre les thymomes B3 et les carcinomes thymiques.

Dans les essais cliniques publiés à ce jour concernant les tumeurs solides, la notion de seuil de positivité est souvent réduite à une limite supérieure ou inférieure à 1% de cellules marquées qui ne permet pas de réellement dégager des sous-groupes.

L'essai de phase 1 KEYNOTE 001 sur le pembrolizumab dans le cancer bronchique a essayé de stratifier la population en deux groupes l'un « avec forte expression > 50% de cellules marquées » l'autre avec « faible expression (1 à 50%) » et a ainsi permis de montrer que les tumeurs avec une forte expression bénéficiaient le plus de la thérapeutique (66).

Même si les AMM actuelles dans le poumon et le mélanome ne tiennent pas compte de l'immunohistochimie pour fournir la molécule, on ne fera pas l'économie de s'intéresser à l'avenir à l'établissement d'un score en raison du coût de ces molécules et de leurs effets secondaires.

Le H-Score qui prend en compte à la fois le pourcentage et l'intensité n'a pas amené de complément d'information dans notre étude ce qui montre que l'intensité du marquage n'est pas un élément discriminant.

Notre étude n'a pas pu mettre en évidence de différence statistiquement significative de survie en fonction du marquage :

La présence d'un marquage des cellules tumorales par PDL1 était bien corrélée à une meilleure survie globale mais cela reflète sans doute le fait que les thymomes B3 qui sont de meilleur pronostic que les carcinomes expriment plus l'anticorps. Au sein du groupe des thymomes B3, il semble se dessiner une tendance à une meilleure survie en cas de forte expression mais le nombre de cas est insuffisant pour en tirer des conclusions.

Nous n'avons pas pu évaluer dans cette étude la corrélation marquage par PDL1 réponse au traitement.

VI. PERSPECTIVES

L'ensemble des résultats obtenus dans notre étude restent à confirmer sur une grosse série de ces tumeurs rares : cette série a d'ores et déjà été constituée avec le concours du groupe français RYTHMIC qui centralise les tumeurs discutées en RCP nationale et implique un groupe de pathologistes relecteurs. Les marquages sont terminés et l'analyse statistique est en cours.

Si cette étude confirme l'intérêt de l'immunomarquage par PDL1 il restera à convaincre les industriels d'organiser un essai clinique dans des tumeurs rares peu chimiosensibles pour lesquelles on ne dispose d'aucune thérapeutique ciblée à ce jour.

Le travail de mise au point et de comparaison des anticorps anti-PDL1 peut alimenter la réflexion du groupe de travail sur PDL1 constitué de pathologistes qui vient de se structurer sous l'égide de l'INCa et doit avec l'aide de l'AFAQAP construire une grille de lecture adaptée aux différentes tumeurs solides. Le travail devra évaluer plusieurs anticorps qui sont aujourd'hui testés par différentes techniques utilisées sur différents automates et pour lesquels aucun critère de positivité n'est aujourd'hui disponible.

Ces techniques sont coûteuses mais le principal effet secondaire de ces nouveaux traitements est aussi leur toxicité économique. L'immunothérapie pour tous n'est pas envisageable et il faudra bien un jour sélectionner les patients qui pourront au mieux bénéficier de ces thérapeutiques.

La place des technologies de biologie moléculaire mérite d'être abordée. Plusieurs laboratoires travaillent sur des signatures moléculaires et l'un d'eux propose d'ores et déjà une puce destinée à évaluer l'immunobiologie de la tumeur par le biais de signatures RNA. Un autre élabore en partenariat avec la technologie nanostring un panel d'expression de gènes liés à l'immunité et qui pourrait affiner les critères de réponse au traitement.

D'autres notions comme la charge mutationnelle et la charge antigénique sont les pistes de demain. Au cours de l'évolution tumorale de nombreuses mutations surviennent et peuvent aboutir à des protéines différentes pouvant comporter des épitopes fortement immunogènes. C'est ce que l'on appelle les « néo antigènes ». L'immunogénicité dépendrait

du nombre et des caractéristiques des mutations. Certaines études sont menées dans le but d'effectuer un séquençage des tumeurs pour déterminer celles qui ont le plus fort potentiel immunogène. Les mutations impliquant BRCA et les polymérase induisant un déficit de la réparation de l'ADN seraient en particulier impliquées. Etablir une signature moléculaire des altérations de la réparation de l'ADN pourrait permettre de prédire l'efficacité de l'immunothérapie et de mieux adapter son utilisation.

VII. BIBLIOGRAPHIE

1. De Montpréville VT. [Thymomas and thymic carcinomas]. *Rev Mal Respir*. 2010 Dec;27(10):1281–7.
2. Detterbeck FC, Stratton K, Giroux D, Asamura H, Crowley J, Falkson C, et al., Staging and Prognostic Factors Committee, Members of the Advisory Boards, Participating Institutions of the Thymic Domain. The IASLC/ITMIG Thymic Epithelial Tumors Staging Project: proposal for an evidence-based stage classification system for the forthcoming (8th) edition of the TNM classification of malignant tumors. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2014 Sep;9(9 Suppl 2):S65–72.
3. Ruffini E, Detterbeck F, Van Raemdonck D, Rocco G, Thomas P, Weder W, et al., European Association of Thoracic Surgeons (ESTS) Thymic Working Group. Tumours of the thymus: a cohort study of prognostic factors from the European Society of Thoracic Surgeons database. *Eur J Cardio-Thorac Surg Off J Eur Assoc Cardio-Thorac Surg*. 2014 Sep;46(3):361–8.
4. WB Travis, A Brambilla, HK Muller-Hermelinck, CC Haris. World Health Organization, WHO histological classification of tumours of lung. IARC Press. Lyon, France;
5. Jain RK, Mehta RJ, Henley JD, Kesler KA, Loehrer PJ, Badve S. WHO types A and AB thymomas: not always benign. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc*. 2010 Dec;23(12):1641–9.
6. Moran CA, Kalhor N, Suster S. Invasive spindle cell thymomas (WHO Type A): a clinicopathologic correlation of 41 cases. *Am J Clin Pathol*. 2010 Nov;134(5):793–8.
7. Marx A, Ströbel P, Badve SS, Chalabreysse L, Chan JKC, Chen G, et al. ITMIG consensus statement on the use of the WHO histological classification of thymoma and thymic carcinoma: refined definitions, histological criteria, and reporting. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2014 May;9(5):596–611.
8. Marom EM, Rosado-de-Christenson ML, Bruzzi JF, Hara M, Sonett JR, Ketai L. Standard report terms for chest computed tomography reports of anterior mediastinal masses suspicious for thymoma. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011 Jul;6(7 Suppl 3):S1717–23.
9. Davenport E, Malthaner RA. The role of surgery in the management of thymoma: a systematic review. *Ann Thorac Surg*. 2008 Aug;86(2):673–84.
10. Attaran S, Acharya M, Anderson JR, Punjabi PP. Does surgical debulking for advanced stages of thymoma improve survival? *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2012 Sep;15(3):494–7.

11. Girard N, Lal R, Wakelee H, Riely GJ, Loehrer PJ. Chemotherapy definitions and policies for thymic malignancies. *J Thorac Oncol Off Publ Int Assoc Study Lung Cancer*. 2011 Jul;6(7 Suppl 3):S1749–55.
12. Loehrer PJ, Kim K, Aisner SC, Livingston R, Einhorn LH, Johnson D, et al. Cisplatin plus doxorubicin plus cyclophosphamide in metastatic or recurrent thymoma: final results of an intergroup trial. The Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1994 Jun;12(6):1164–8.
13. Pagano M, Sierra NMA, Panebianco M, Rossi G, Gnoni R, Bisagni G, et al. Sorafenib efficacy in thymic carcinomas seems not to require c-KIT or PDGFR-alpha mutations. *Anticancer Res*. 2014 Sep;34(9):5105–10.
14. Pharam P. The immune system. Taylor Francis. 2009.
15. Chapel H, Haeney M, Misbach S, Snowden N. Immunologie clinique : de la théorie à la pratique avec cas cliniques. De Boeck Supérieur. 2004.
16. Shimizu J, Yamazaki S, Sakaguchi S. Induction of tumor immunity by removing CD25+CD4+ T cells: a common basis between tumor immunity and autoimmunity. *J Immunol Baltim Md 1950*. 1999 Nov 15;163(10):5211–8.
17. Onizuka S, Tawara I, Shimizu J, Sakaguchi S, Fujita T, Nakayama E. Tumor rejection by in vivo administration of anti-CD25 (interleukin-2 receptor alpha) monoclonal antibody. *Cancer Res*. 1999 Jul 1;59(13):3128–33.
18. Jäger E, Ringhoffer M, Arand M, Karbach J, Jäger D, Ilsemann C, et al. Cytolytic T cell reactivity against melanoma-associated differentiation antigens in peripheral blood of melanoma patients and healthy individuals. *Melanoma Res*. 1996 Dec;6(6):419–25.
19. Matsushita H, Vesely MD, Koboldt DC, Rickert CG, Uppaluri R, Magrini VJ, et al. Cancer exome analysis reveals a T-cell-dependent mechanism of cancer immunoediting. *Nature*. 2012 Feb 16;482(7385):400–4.
20. Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature*. 2002 Oct 17;419(6908):734–8.
21. Finn OJ. Cancer immunology. *N Engl J Med*. 2008 Jun 19;358(25):2704–15.
22. Zou W. Regulatory T cells, tumour immunity and immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. 2006 Apr;6(4):295–307.
23. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr;12(4):252–64.
24. Karachaliou N, Cao MG, Teixidó C, Viteri S, Morales-Espinosa D, Santarpia M, et al. Understanding the function and dysfunction of the immune system in lung cancer: the role of immune checkpoints. *Cancer Biol Med*. 2015 Jun;12(2):79–86.

25. Krummel MF, Allison JP. CTLA-4 engagement inhibits IL-2 accumulation and cell cycle progression upon activation of resting T cells. *J Exp Med*. 1996 Jun 1;183(6):2533–40.
26. Linsley PS, Brady W, Urnes M, Grosmaire LS, Damle NK, Ledbetter JA. CTLA-4 is a second receptor for the B cell activation antigen B7. *J Exp Med*. 1991 Sep 1;174(3):561–9.
27. Reck M, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line therapy in extensive-disease-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase 2 trial. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. 2013 Jan;24(1):75–83.
28. Lynch TJ, Bondarenko I, Luft A, Serwatowski P, Barlesi F, Chacko R, et al. Ipilimumab in combination with paclitaxel and carboplatin as first-line treatment in stage IIIB/IV non-small-cell lung cancer: results from a randomized, double-blind, multicenter phase II study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2012 Jun 10;30(17):2046–54.
29. Freeman GJ. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Jul 29;105(30):10275–6.
30. Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, Bourque K, Chernova T, Nishimura H, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000 Oct 2;192(7):1027–34.
31. Keir ME, Liang SC, Guleria I, Latchman YE, Qipo A, Albacker LA, et al. Tissue expression of PD-L1 mediates peripheral T cell tolerance. *J Exp Med*. 2006 Apr 17;203(4):883–95.
32. Dong H, Strome SE, Salomao DR, Tamura H, Hirano F, Flies DB, et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*. 2002 Aug;8(8):793–800.
33. Park J-J, Omiya R, Matsumura Y, Sakoda Y, Kuramasu A, Augustine MM, et al. B7-H1/CD80 interaction is required for the induction and maintenance of peripheral T-cell tolerance. *Blood*. 2010 Aug 26;116(8):1291–8.
34. Paterson AM, Brown KE, Keir ME, Vanguri VK, Riella LV, Chandraker A, et al. The programmed death-1 ligand 1:B7-1 pathway restrains diabetogenic effector T cells in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2011 Aug 1;187(3):1097–105.
35. Ishida Y, Agata Y, Shibahara K, Honjo T. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. *EMBO J*. 1992 Nov;11(11):3887–95.
36. Dong H, Zhu G, Tamada K, Chen L. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999 Dec;5(12):1365–9.
37. Latchman Y, Wood CR, Chernova T, Chaudhary D, Borde M, Chernova I, et al. PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*. 2001 Mar;2(3):261–8.
38. Shin DS, Ribas A. The evolution of checkpoint blockade as a cancer therapy: what's here, what's next? *Curr Opin Immunol*. 2015 Apr;33:23–35.

39. Fife BT, Pauken KE, Eagar TN, Obu T, Wu J, Tang Q, et al. Interactions between PD-1 and PD-L1 promote tolerance by blocking the TCR-induced stop signal. *Nat Immunol*. 2009 Nov;10(11):1185–92.
40. Konishi J, Yamazaki K, Azuma M, Kinoshita I, Dosaka-Akita H, Nishimura M. B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Aug 1;10(15):5094–100.
41. Brown JA, Dorfman DM, Ma F-R, Sullivan EL, Munoz O, Wood CR, et al. Blockade of programmed death-1 ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2003 Feb 1;170(3):1257–66.
42. Curiel TJ, Wei S, Dong H, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Blockade of B7-H1 improves myeloid dendritic cell-mediated antitumor immunity. *Nat Med*. 2003 May;9(5):562–7.
43. Parsa AT, Waldron JS, Panner A, Crane CA, Parney IF, Barry JJ, et al. Loss of tumor suppressor PTEN function increases B7-H1 expression and immunoresistance in glioma. *Nat Med*. 2007 Jan;13(1):84–8.
44. Marzec M, Zhang Q, Goradia A, Raghunath PN, Liu X, Paessler M, et al. Oncogenic kinase NPM/ALK induces through STAT3 expression of immunosuppressive protein CD274 (PD-L1, B7-H1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Dec 30;105(52):20852–7.
45. Taube JM, Anders RA, Young GD, Xu H, Sharma R, McMiller TL, et al. Colocalization of inflammatory response with B7-h1 expression in human melanocytic lesions supports an adaptive resistance mechanism of immune escape. *Sci Transl Med*. 2012 Mar 28;4(127):127ra37.
46. Robert C, Long GV, Brady B, Dutriaux C, Maio M, Mortier L, et al. Nivolumab in previously untreated melanoma without BRAF mutation. *N Engl J Med*. 2015 Jan 22;372(4):320–30.
47. Armand P, Nagler A, Weller EA, Devine SM, Avigan DE, Chen Y-B, et al. Disabling immune tolerance by programmed death-1 blockade with pidilizumab after autologous hematopoietic stem-cell transplantation for diffuse large B-cell lymphoma: results of an international phase II trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2013 Nov 20;31(33):4199–206.
48. Berger R, Rotem-Yehudar R, Slama G, Landes S, Kneller A, Leiba M, et al. Phase I safety and pharmacokinetic study of CT-011, a humanized antibody interacting with PD-1, in patients with advanced hematologic malignancies. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2008 May 15;14(10):3044–51.
49. Westin JR, Chu F, Zhang M, Fayad LE, Kwak LW, Fowler N, et al. Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jan;15(1):69–77.

50. Powles T, Eder JP, Fine GD, Braithwaite FS, Loriot Y, Cruz C, et al. MPDL3280A (anti-PD-L1) treatment leads to clinical activity in metastatic bladder cancer. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):558–62.
51. Mkrtychyan M, Najjar YG, Raulfs EC, Liu L, Langerman S, Guittard G, et al. B7-DC-Ig enhances vaccine effect by a novel mechanism dependent on PD-1 expression level on T cell subsets. *J Immunol Baltim Md 1950*. 2012 Sep 1;189(5):2338–47.
52. Hodi FS, O'Day SJ, McDermott DF, Weber RW, Sosman JA, Haanen JB, et al. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2010 Aug 19;363(8):711–23.
53. Le DT, Lutz E, Uram JN, Sugar EA, Onners B, Solt S, et al. Evaluation of ipilimumab in combination with allogeneic pancreatic tumor cells transfected with a GM-CSF gene in previously treated pancreatic cancer. *J Immunother Hagerstown Md 1997*. 2013 Sep;36(7):382–9.
54. Kwon ED, Drake CG, Scher HI, Fizazi K, Bossi A, van den Eertwegh AJM, et al., CA184-043 Investigators. Ipilimumab versus placebo after radiotherapy in patients with metastatic castration-resistant prostate cancer that had progressed after docetaxel chemotherapy (CA184-043): a multicentre, randomised, double-blind, phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Jun;15(7):700–12.
55. Slovin SF, Higano CS, Hamid O, Tejwani S, Harzstark A, Alumkal JJ, et al. Ipilimumab alone or in combination with radiotherapy in metastatic castration-resistant prostate cancer: results from an open-label, multicenter phase I/II study. *Ann Oncol*. 2013 Jul;24(7):1813–21.
56. Calabrò L, Morra A, Fonsatti E, Cutaia O, Amato G, Giannarelli D, et al. Tremelimumab for patients with chemotherapy-resistant advanced malignant mesothelioma: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2013 Oct;14(11):1104–11.
57. Robert C, Thomas L, Bondarenko I, O'Day S, Weber J, Garbe C, et al. Ipilimumab plus dacarbazine for previously untreated metastatic melanoma. *N Engl J Med*. 2011 Jun 30;364(26):2517–26.
58. Postow MA, Chesney J, Pavlick AC, Robert C, Grossmann K, McDermott D, et al. Nivolumab and ipilimumab versus ipilimumab in untreated melanoma. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2006–17.
59. Ileana E, Champiat S, Soria J-C. [Immune-checkpoints: the new anti-cancer immunotherapies]. *Bull Cancer (Paris)*. 2013 Jun;100(6):601–10.
60. Katsuya Y, Fujita Y, Horinouchi H, Ohe Y, Watanabe S-I, Tsuta K. Immunohistochemical status of PD-L1 in thymoma and thymic carcinoma. *Lung Cancer Amst Neth*. 2015 May;88(2):154–9.

61. Topalian SL, Hodi FS, Brahmer JR, Gettinger SN, Smith DC, McDermott DF, et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N Engl J Med*. 2012 Jun 28;366(26):2443–54.
62. Rimm D, Schalper K, Pusztai L. Unvalidated antibodies and misleading results. *Breast Cancer Res Treat*. 2014 Sep;147(2):457–8.
63. Velcheti V, Schalper KA, Carvajal DE, Anagnostou VK, Syrigos KN, Sznol M, et al. Programmed death ligand-1 expression in non-small cell lung cancer. *Lab Investig J Tech Methods Pathol*. 2014 Jan;94(1):107–16.
64. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, et al. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003 May;88(5):2309–17.
65. Gadiot J, Hooijkaas AI, Kaiser ADM, van Tinteren H, van Boven H, Blank C. Overall survival and PD-L1 expression in metastasized malignant melanoma. *Cancer*. 2011 May 15;117(10):2192–201.
66. Garon EB, Rizvi NA, Hui R, Leighl N, Balmanoukian AS, Eder JP, et al. Pembrolizumab for the treatment of non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2015 May 21;372(21):2018–28.
67. Herbst RS, Soria J-C, Kowanetz M, Fine GD, Hamid O, Gordon MS, et al. Predictive correlates of response to the anti-PD-L1 antibody MPDL3280A in cancer patients. *Nature*. 2014 Nov 27;515(7528):563–7.

Etude de l'expression immunohistochimique de PD1, CD8 et de différents clones de PDL1, dans les thymomes B3 et les carcinomes thymiques.

RESUME EN FRANÇAIS :

Les tumeurs thymiques sont rares et leur prise en charge thérapeutique parfois difficile lorsqu'elles sont inopérables et ne répondent pas aux traitements adjuvants. L'immunothérapie en particulier le ciblage de la voie PD1/PDL1 est une piste prometteuse dans de nombreuses tumeurs solides. Son apport éventuel au traitement des tumeurs thymiques n'a pas été évalué

Nous avons décidé de comparer le marquage immunohistochimique de plusieurs clones de PDL1 et d'autres acteurs des checkpoints immunitaires (PD1 et CD8) sur une cohorte de 29 patients atteints de thymome B3 ou de carcinome thymique qui sont les formes histologiques de plus mauvais pronostic.

Nous avons montré une expression fréquente de PDL1 par les cellules tumorales dans les thymomes B3 alors que pour les carcinomes le marquage prédominait au niveau des éléments inflammatoires. Pour les trois clones de PDL1, le marquage des cellules tumorales semble corrélé à une meilleure survie globale et sans progression mais ces résultats ne sont pas statistiquement significatifs en raison du faible nombre de patients

Pour confirmer ces résultats et leur donner une puissance statistique, nous avons étendu notre étude à une cohorte nationale en cours d'analyse.

TITRE EN ANGLAIS : Evaluation of immunochemistry PD1, CD8, and different clones of PDL1 in thymoma B3 and in thymic carcinoma.

DISCIPLINE ADMINISTRATIVE : Médecine spécialisée : Anatomie et cytopathologie

MOTS-CLÉS : thymome B3, carcinome thymique, checkpoint immunitaire, PD1, PDL1, immunohistochimie

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 : Isabelle ROUQUETTE