

Université de Montréal

L'impact de l'infiltration lymphocytaire sur le pronostic de l'adénocarcinome du pancréas

par

Yannic McNicoll

Programme de sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté de médecine
en vue de l'obtention du grade de maîtrise
en sciences biomédicales
option recherche clinique

Juin, 2014

© Yannic McNicoll, 2014

Résumé

L'objectif principal de cette étude est de déterminer la valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire dans l'adénocarcinome du pancréas.

Les densités des lymphocytes T CD3+, CD4+, CD8+, FOXP3+ et CD45RO+ intratumoraux (T) et péri-tumoraux (PT) de 111 spécimens ont été mesurées avec des micromatrices tissulaires. Un Index Lymphocytaire (IL) a été créé basé sur les valeurs des CD4+ T, CD8+ PT et le ratio CD3+ T/PT regroupant les patients selon que les tumeurs présentaient aucune (IL---), 1 à 2 (IL+/-) ou les 3 caractéristiques immunitaires favorables (IL+++). La survie médiane des patients atteints d'un cancer du pancréas est significativement différente selon la catégorie d'index lymphocytaire; elle était de 14 mois pour IL---, de 19 mois pour IL +/- et de 29 mois pour IL+++ (p=0,01). L'IL est un facteur indépendant de survie en analyse multivariée ainsi que la différenciation tumorale et l'utilisation d'un traitement adjuvant.

L'IL est un facteur pronostique de survie des adénocarcinomes du pancréas réséqués et devrait pouvoir permettre une meilleure classification des patients.

Mots-clés : lymphocytes infiltrants, lymphocytes T, cancer du pancréas, marqueur moléculaire, biomarqueur, immunothérapie, facteur pronostique, antigènes tumoraux.

Abstract

The main objective of this project was to determine the prognostic significance of T-lymphocytes densities in pancreatic adenocarcinoma.

Using tissue microarrays, CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+, and FOXP3 T-cells were quantified by immunohistochemistry in the intratumoral (T) and peritumoral (PT) compartments of 111 specimens.

An immune score (IS) based on T CD4+ and PT CD8+ counts and T/PT CD3+ ratio grouped patients into IS---, IS+/- and IS+++ if none, 1 or 2, or all 3 of the favorable immune features were present, respectively. Patients have different overall survival (OS) depending on their IS status. Patients IS--- have a median OS of 14 months and of 19 months and 29 months for those IS+/- and IS+++ respectively (log-rank $p=0.01$). By multivariate analysis, IS was independently associated with survival as were the histological grade and adjuvant therapy.

An immune score that combines specific T-cell location and density may have prognostic value in patients with resected pancreatic adenocarcinoma, independently from current pathologic features.

Keywords : Tumour-infiltrating lymphocytes, T-lymphocytes, pancreatic neoplasms, biomarker, immunotherapy, immune score, prognosis, tumor antigen

Table des matières

| | |
|------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Résumé | i |
| Abstract | ii |
| Table des matières..... | iii |
| Liste des tableaux..... | v |
| Liste des figures | vi |
| Liste des sigles et des abréviations | vii |
| Remerciements | x |
| Introduction..... | 1 |
| Cancer du pancréas | 1 |
| Facteurs pronostiques actuels..... | 1 |
| Recherche de nouveaux facteurs pronostiques | 3 |
| Réponse antitumorale des lymphocytes T et développements thérapeutiques..... | 3 |
| Valeur pronostique des lymphocytes T infiltrant la tumeur..... | 8 |
| Lymphocytes T et le cancer du pancréas | 11 |
| Micromatrices de tissus | 12 |
| Objectifs du projet de maîtrise | 13 |
| Méthodes..... | 14 |
| Patients..... | 14 |
| Construction des micromatrices..... | 15 |
| Immunohistochimie | 18 |
| Analyse d'image et quantification | 19 |
| Analyse statistique..... | 20 |
| Résultats | 21 |
| Caractéristiques des patients..... | 22 |
| Chirurgies | 23 |
| Complications | 24 |
| Pathologie | 25 |

| | |
|----------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Micromatrices | 27 |
| Densités des sous-populations de lymphocytes | 30 |
| Validation du décompte automatique | 32 |
| Suivi et survie | 35 |
| Analyse de la survie selon les critères cliniques et pathologiques | 37 |
| Analyse de la survie selon la densité des lymphocytes T | 41 |
| Analyse en valeur continue | 41 |
| Analyse en valeur dichotomisée | 41 |
| Index lymphocytaire (IL)..... | 44 |
| Analyse multivariée..... | 49 |
| Discussion, perspectives et conclusions | 50 |
| Analyse des données cliniques et pathologiques | 51 |
| Micromatrices et immunohistochimie : validité de la méthode..... | 54 |
| Validité des décomptes lymphocytaires..... | 55 |
| Valeur pronostique des densités de lymphocytes T tumoraux et péri-tumoraux..... | 56 |
| Comparaisons avec les études précédentes | 58 |
| Perspectives et conclusions | 60 |
| L'index lymphocytaire comme score immunitaire | 60 |
| Gradient lymphocytaire tumoral sur péri-tumoral | 60 |
| L'index lymphocytaire comme facteur prédictif..... | 62 |
| Conclusions générales | 65 |
| Bibliographie..... | 67 |

Liste des tableaux

INTRODUCTION

MÉTHODES

RÉSULTATS

| | | |
|--------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau I | Classification TNM pour le cancer du pancréas..... | 2 |
| Tableau II | Classification TNM pour le cancer du pancréas – par stades | 2 |
| Tableau III | Données cliniques pré-chirurgicales des patients..... | 22 |
| Tableau IV | Données chirurgicales et de séjour des patients..... | 23 |
| Tableau V | Complications classifiées par sévérité selon la classification de Clavien-Dindo | 24 |
| Tableau VI | Données histopathologiques des spécimens..... | 26 |
| Tableau VII | Nombre de cas analysables par marqueurs et zones..... | 27 |
| Tableau VIII | Comparaison des densités lymphocytaires par marqueurs et zones..... | 34 |
| Tableau IX | Analyse de survie univariée des facteurs cliniques, démographiques, chirurgicaux et adjuvants..... | 38 |
| Tableau X | Analyse de survie univariée des données histopathologiques..... | 39 |
| Tableau XI | Association entre la survie et les densités lymphocytaires comme variables continues..... | 42 |
| Tableau XII | Densités lymphocytaires en fonction de la survie..... | 43 |
| Tableau XIII | Index Lymphocytaire et survie..... | 45 |
| Tableau XIV | Index Lymphocytaire et survie avec stratification des patients N1..... | 45 |
| Tableau XV | Interaction entre l'Index Lymphocytaire et les traitements adjuvants..... | 45 |
| Tableau XVI | Analyse multivariée par régression de Cox..... | 49 |

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Liste des figures

INTRODUCTION

MÉTHODES

| | | |
|----------|----------------------------------|----|
| Figure 1 | Mappe de la micromatrice #7..... | 17 |
|----------|----------------------------------|----|

RÉSULTATS

| | | |
|-----------|------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 2 | Sélection de la cohorte des patients..... | 21 |
| Figure 3 | Micromatrice #7 en colorations HPS..... | 28 |
| Figure 4 | Exemples de biopsies en zones tumorales et péri-tumorales..... | 29 |
| Figure 5 | Exemples de marquage immunohistochimique avec CD3, CD4 et CD8..... | 30 |
| Figure 6 | Exemples de marquage immunohistochimique avec CD45RO et FOXP3..... | 31 |
| Figure 7 | Processus de quantification automatisée..... | 32 |
| Figure 8 | Corrélation entre le décompte manuel et automatique..... | 33 |
| Figure 9 | Comparaison des densités lymphocytaires par zones..... | 35 |
| Figure 10 | Courbes de survies globale et sans récurrence de la cohorte..... | 36 |
| Figure 11 | Courbes de survie selon le nombre de ganglions positifs..... | 40 |
| Figure 12 | Courbes de survie selon l'Index Lymphocytaire..... | 46 |
| Figure 13 | Courbes de survie selon le statut N et l'Index Lymphocytaire..... | 47 |
| Figure 14 | Courbes de survie selon la réception de traitements adjuvants et l'Index Lymphocytaire..... | 48 |

DISCUSSION, PERSPECTIVES ET CONCLUSIONS

Liste des sigles et des abréviations

ACE, Antigène carcino-embryonnaire

AJCC, American Joint Committee on Cancer

APC, Antigen Presenting Cell

ASA, American Society of Anesthesiologists

CA 19-9, Carbohydrate Antigen 19-9

CA 242, Carbohydrate Antigen 242

CD, Cluster of Differentiation

CHUM, Centre hospitalier de l'Université de Montréal

EDTA, Ethylenediaminetetracetic acid

et al, et autres

EUA, États-Unis d'Amérique

FOXP3, forkhead box P3

HPS, hématoxyline, phloxine et safran

HR, Hazard ratio

IMC, Indice de masse corporelle

IFN- γ , interféron- γ

IL-2, interleukine-2

K-ras, v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

N, ganglions lymphatiques régionaux

N0, absence d'atteinte métastatique des ganglions lymphatiques régionaux

N1, présence d'atteinte métastatique des ganglions lymphatiques régionaux

M, Métastase à distance

M0, absence de métastase à distance

M1, présence de métastase à distance

R, marges chirurgicales

R0, marges chirurgicales microscopiquement négatives

R1, marges chirurgicales microscopiquement positives

R2, marges chirurgicales macroscopiquement positives

R^2 , coefficient de détermination

SSR, survie sans récurrence

TNM, Tumor Node Metastasis

TMA, Tissu Microarray

T_R , lymphocyte T régulateur

T_H , lymphocyte T « helper »

T_C , lymphocyte T cytotoxique

*Je serai toujours reconnaissant à Inge Meijer
qui a finalement posé le bon diagnostic. En plus
d'être une compagne remarquable, elle est une
clinicienne et chercheuse extraordinaire*

Remerciements

Je tiens à remercier mes directeurs de recherche, le Dr Réal Lapointe et le Dr Franck Vandembroucke-Menu. Le Dr Lapointe a rendu ce projet possible alors que le Dr Vandembroucke-Menu m'a aidé tout au long de mon parcours à trouver des solutions pour faire progresser ce projet et le mener à terme.

Je tiens à remercier le Dr Simon Turcotte qui a su m'aider malgré la distance et les exigences de sa formation post-doctorale et à qui je souhaite une brillante carrière.

Je remercie également le Dr Louis Gaboury et le personnel de la plateforme d'histologie de l'Institut de recherche en immunologie et en oncologie (IRIC) de l'Université de Montréal d'avoir rendu possible les expériences sur les micromatrices.

Je tiens à remercier le personnel du Fichier des tumeurs du Québec qui m'ont permis d'obtenir des données cliniques complètes sur les patients composant la cohorte de cette étude.

Je tiens également à remercier Anne-Marie Gagnon et Danielle Grimard pour leur support et leur aide dans des domaines qui m'étaient peu familiers.

J'aimerais remercier le Dr Geneviève Soucy qui m'a enseigné patiemment tout ce que je sais aujourd'hui de la pathologie et de l'immunohistochimie, et ce malgré une charge de travail qui ne cessait de s'accroître. Ce projet n'aurait pu être réalisé sans ses compétences, son enthousiasme et son énergie.

Introduction

Cancer du pancréas

Au Canada comme dans la plupart des pays industrialisés, le cancer du pancréas est la quatrième cause de mortalité due au cancer (Statistiques Canada) (1). Alors que la mortalité de cancers tels que celui du sein et du colon a diminué graduellement au cours des dernières décennies, un déclin similaire n'a pas été observé dans le cancer du pancréas. Le pronostic lors du diagnostic demeure sombre avec un taux global de survie à 5 ans de 6% (2). Parmi les patients qui bénéficient d'une chirurgie à but curatif, le taux de survie à 5 et 10 ans demeure faible : 15-20% et 10-15% respectivement (3-6). En effet, le taux de récurrence demeure très élevé même pour les patients ayant eu une chirurgie curative et avec des caractéristiques tumorales pourtant favorables (7,8). L'ajout de traitement adjuvant permet de prolonger de quelques mois la survie mais n'a malheureusement pas changé radicalement le pronostic de ce cancer (9-11).

Facteurs pronostiques actuels

Le système TNM (*Tumor, Node, Metastasis*) de l'*American Joint Committee on Cancer* (AJCC) représente la base à partir de laquelle la majorité des cancers d'organes solides sont classifiés, incluant le cancer du pancréas. Ce système s'appuie sur l'étendue de la tumeur primaire (T), la présence de cellules cancéreuses dans les ganglions (N) ou dans un autre organe (M). Le cancer du pancréas est classifié selon sa taille et son infiltration (T1 à T4), l'absence ou la présence de métastases ganglionnaires (N0 ou N1) et l'absence ou la présence de métastases à distance (M0 ou M1) (tableau I p. 2). Les différentes combinaisons de T, N et M sont ensuite regroupées en stades (tableau II p. 2). Les cliniciens se basent sur ce *staging* pour établir le pronostic et le plan de traitement. Cependant, ce système présente certaines lacunes. En effet, les patients ayant eu une résection d'un adénocarcinome du pancréas se retrouvent en majorité (entre 49-84%) dans le stade IIB (5,8,12). Ce stade IIB regroupe les

patients avec métastases ganglionnaires mais sans métastase à distance. Les études montrent de grande variation de survie au sein de ce groupe. Ceci s'explique en partie par une limitation du TNM qui ne prend en compte que l'anatomie de la tumeur comme facteur.

Tableau I – Classification TNM pour le cancer du pancréas selon l'AJCC, 7^e édition

| | |
|--------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Tumeur primaire (T) | |
| Tis | Carcinome <i>in situ</i> |
| T1 | Tumeur limitée à 2 cm ou moins dans sa plus grande dimension |
| T2 | Tumeur de plus de 2 cm et limitée au pancréas |
| T3 | Tumeur avec infiltration extra-pancréatique |
| T4 | Tumeur infiltrant le tronc coeliaque ou l'artère mésentérique supérieure |
| Ganglions lymphatiques régionaux (N) | |
| N0 | Absence de métastase ganglionnaire |
| N1 | Présence de métastase ganglionnaire |
| Métastases à distance (M) | |
| M0 | Absence de métastase à distance |
| M1 | Présence de métastase à distance |

D'autres facteurs ont été étudiés dans le cancer du pancréas. Ceux-ci peuvent être classifiés en

Tableau II – Regroupement par stades selon l'AJCC, 7^e édition

| Stade | T | N | M |
|-------|--------|--------|----|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| IA | T1 | N0 | M0 |
| IB | T2 | N0 | M0 |
| IIA | T3 | N0 | M0 |
| IIB | T1 | N1 | M0 |
| | T2 | N1 | M0 |
| | T3 | N1 | M0 |
| III | T4 | Tout N | M0 |
| IV | Tout T | Tout N | M1 |

anatomiques et non-anatomiques (13). Idéalement, ces facteurs, pourraient compléter le TNM en apportant des précisions sur ses hétérogénéités inhérentes. Par exemple, un grand nombre de ganglions positifs (≥ 4) est un facteur associée à la survie de manière plus significative que le « N0 vs N1 » traditionnel du TNM (8,14). L'ajout du degré de différenciation pourrait permettre également d'améliorer le staging TNM (15,16).

Recherche de nouveaux facteurs pronostiques

Alors que l'ajout de caractéristiques histologiques et pathologiques permet de préciser le TNM, ce processus ne considère que la tumeur. Des caractéristiques reliées à l'hôte jouent possiblement un rôle pour contenir et ralentir ou au contraire favoriser la croissance des tumeurs. L'interrelation entre le système immunitaire et les cancers, notamment la reconnaissance tumorale par les lymphocytes T, a fait l'objet d'avancées scientifiques majeures durant la dernière décennie (17,18). D'une part ces nouvelles connaissances ont mené à l'élaboration de traitements d'immunothérapies dans certains cancers et, d'autre part, le développement de méthode de quantification de la réponse immunitaire anti-tumorale des patients a permis d'étudier la valeur pronostique de biomarqueurs immunitaires.

Réponse antitumorale des lymphocytes T et développements thérapeutiques

Au sein du microenvironnement tumoral, des relations complexes entre les cellules immunitaires, stromales et néoplasiques semblent influencer le développement des cancers et leur progression (19-24). Les lymphocytes T, par lesquels la réponse immunitaire adaptative cellulaire est médiée, avec leur potentiel de reconnaissance d'antigènes endogènes potentiellement exprimés par les cellules tumorales, sont au cœur des études menées en immunologie du cancer. L'infiltration de la tumeur par les lymphocytes T a été mise de l'avant comme un facteur important du contrôle immunitaire des tumeurs. Le modèle conceptuel le plus répandu, basé sur les résultats d'études de tumeurs plus ou moins immunogéniques transplantées chez la souris, suggère l'existence d'une réponse immunitaire anti-tumorale

constante à laquelle échappent les clones de cellules tumorales les moins immunogéniques. Ce modèle est appelé *immunoediting* (17,25), et propose trois types spontanés d'interaction entre le système immunitaire et les tumeurs : élimination tumorale (*immunosurveillance*), équilibre, évasion tumorale (*tumor escape*). Chez l'humain, plusieurs antigènes tumoraux présents à la surface des cellules cancéreuses de mélanome et reconnus spontanément par les lymphocytes T ont été identifiés (14,26-28). Finalement, l'immunothérapie du cancer par transfert adoptif de lymphocytes T anti-tumoraux, dont l'étude et l'usage se sont accélérés depuis quelques années, démontre la puissance de ces cellules comme modalité de destruction tumorale *in vivo* (15,17). De ces études cliniques, il apparaît de plus en plus clair que la quantité et la qualité, le type des lymphocytes T anti-tumoraux infusés aux patients, de même que le contexte immunologique de l'hôte recevant ce produit cellulaire, représentent des déterminants majeurs de l'efficacité de cette nouvelle forme de thérapie contre le cancer.

La capacité du système immunitaire à développer une réponse anti-tumorale dirigée dépend de plusieurs facteurs. Les lymphocytes T CD8⁺ sont des cellules cytotoxiques pouvant éliminer directement des cellules tumorales par la sécrétion de granzymes et de perforine. Pour y parvenir, les CD8⁺ reconnaissent les antigènes tumoraux (AT) à la surface des cellules cancéreuse lorsque ceux-ci sont présentés sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I). Une fois activée, les CD8⁺ sont en mesure d'effectuer leur fonction cytolytique. Les lymphocytes T « helper » CD4⁺ (T_H) quant à eux reconnaissent les AT qui leurs sont présentés sur les complexes majeurs d'histocompatibilité de classe II (CMH-II) par les cellules spécialisées (Antigen Presenting Cells ou APC) comme les cellules dendritiques (17,29). Les cellules CD4⁺ sécrètent différentes cytokines selon qu'elles soient de type T_{H1} ou T_{H2}. Les T_{H1} sécrètent de l'interleukine-2 (IL-2) et de l'interféron- γ (IFN- γ) supportant l'immunité cellulaire, incluant les CD8⁺. Les T_{H2} produisent les interleukine-4 (IL-4), interleukine-5 (IL-5) et interleukine-13 (IL-13) ce qui favorise l'immunité humorale. Les CD8⁺ peuvent également d'être stimulés par les APC dans les circonstances appropriées. Les lymphocytes T mémoires CD45RO⁺ sont des lymphocytes qui ont déjà été exposés à un antigène et qui sont en mesure de répondre rapidement lors d'une nouvelle exposition. D'autres lymphocytes ont plutôt un potentiel immunosuppresseur. Les lymphocytes T régulateurs (T_R) sont entre autre définis par leur capacité d'inhiber la réponse immunitaire en

interagissant avec d'autres cellules (19,30). Les lymphocytes T_R, en modérant les lymphocytes effecteurs, participent à la tolérance par le système immunitaire des cellules tumorales (17,31). Les T_R jouent également un rôle dans la suppression des réactions auto-immunes (26,32).

L'immunothérapie tente par divers moyens de manipuler le processus de reconnaissance et d'interactions cellulaires afin de stimuler la réponse anti-tumorale. Plusieurs stratégies ont été développées dans le cancer du pancréas. Elles vont de l'utilisation d'anticorps ciblant les cellules tumorales ou les lymphocytes T à la création de vaccins complexes qui sont composés de divers épitopes ou de cellules dendritiques stimulées par l'exposition à des AT. Les AT sont déjà présents sur les cellules tumorales mais ne suffisent généralement pas à stimuler une réponse immunitaire suffisante pour mener à l'élimination du cancer. Ce phénomène de tolérance est un obstacle majeur à l'élimination des tumeurs par le système immunitaire (17,33).

Différents traitements basés sur l'immunothérapie ont fait l'objet d'essais dans le cancer du pancréas. Les cellules pancréatiques tumorales expriment plusieurs protéines, souvent dans des proportions élevées, qui les distinguent des autres cellules: le « Carbohydre Antigen 19-9 » (CA 19-9) (90%), le « Carbohydre Antigen 242 » (CA 242) (90%) et l'antigène carcinoembryonnaire (ACE) (85-90%). Les protéines des gènes mutés *K-ras* et p53 sont d'autres candidats (29,34). Le *K-ras* est un proto-oncogène muté dans 75% à 100% des cancers pancréatiques. Dès 1995, une étude clinique a misé sur la présence de *K-ras* muté sur les cellules tumorales. Un vaccin a été produit en prélevant des APC de patients atteints de cancer du pancréas, en les exposant au *K-ras* avant de les réinjecter à ces mêmes patients. Une brève prolifération de lymphocytes T spécifiques pour *K-ras* a été noté chez 2 patients, sans toutefois se traduire par une réponse clinique (30,35). Un autre type de vaccin a été utilisé comme traitement adjuvant chez 5 patients. La protéine du *K-ras* mutée a été combinée avec des composantes bactériennes avant d'être injectée en sous-cutanée. Tous les patients ont démontré une certaine réponse immunitaire positive. Malgré que cette réponse n'était pas associée à un bénéfice de survie, la protéine du *K-ras* mutée demeure d'actualité comme cible potentielle d'immunothérapie. Récemment, son rôle dans le développement du cancer du

pancréas par son inhibition indirecte des lymphocytes T a été mis en lumière dans un modèle murin (31,36).

L'ACE est souvent exprimé par des cellules dans le cancer du pancréas et dans plusieurs cancers, notamment colorectal, pulmonaire et ovarien. Comme avec *K-ras*, la stimulation des lymphocytes a été tentée chez des patients atteints de cancers avancés par l'exposition de leurs cellules dendritiques à l'ACE. Alors que l'injection s'est avérée sécuritaire, une seule brève réponse clinique a été observée (29,32). Des études plus récentes ont souligné à quel point prendre pour cible l'ACE demeure un défi en démontrant que le système immunitaire de patients atteints de cancer du pancréas développent une tolérance sélective pour l'ACE (33,36).

La protéine mucin-1, ou MUC-1, est un autre AT contenant plusieurs sites de glycosylation et a été identifiée comme une cible potentielle dans le cancer du pancréas. Dans les cellules pancréatiques tumorales plusieurs de ces sites ne sont pas glycosylés et exposent ainsi de nouveaux épitopes. Le MUC-1 a été utilisé pour stimuler des cellules dendritiques utilisées ensuite comme vaccin. Là encore, la vaccination a été bien tolérée mais d'autres études sont nécessaires pour en déterminer l'efficacité (15,34). Une alternative à la vaccination consiste à développer des anticorps qui ciblent les AT. Une fois liés, ces anticorps identifient les cellules tumorales qui peuvent alors devenir la cible des cellules du système inné. Des anticorps ciblant le MUC-1 ont été testés dans des études précliniques et ont démontrés une réponse dans un modèle murin (35,37). L'utilisation d'un anticorps ciblant le récepteur *Her-2/neu* s'est également avérée intéressante dans un modèle murin de cancer du pancréas (36,38,39).

Les anticorps peuvent aussi être utilisés comme véhicule pour transporter des molécules toxiques qui endommageront les cellules tumorales. Des anticorps monoclonaux anti-ACE ont été associés à des molécules d'iode radioactif et injecté chez des patients atteints de cancer du pancréas. Leur utilisation s'est avérée sécuritaire sans toutefois entraîner de réponse clinique notable (29,40). Le mésothélin est une protéine que l'on retrouve normalement sur les cellules mésothéliales du péricarde, de la plèvre et qui est exprimées par l'adénocarcinome du pancréas

dans 90-100% des cas. Des études utilisant des anticorps fusionnée avec l'exotoxine du *Pseudomonas* ciblant la mésothelin sont présentement en cours (36,41).

La stimulation non-spécifique du système immunitaire est une autre approche étudiée dans la lutte contre le cancer (15,26). Il est possible de diminuer la tolérance des cellules tumorales en stimulant directement les cellules dendritiques par l'injection d'un anticorps complètement humanisé contre le CD40 (37,42,43). Le CD40 est un récepteur qui, une fois activé, pousse les cellules dendritiques à exprimer plus de molécules MHC-II à leur surface et à sécréter des cytokines pro-inflammatoires. Dans une étude, 21 patients atteints de cancer du pancréas ont reçu des injections d'anti-CD40 et 4 ont démontré une réponse partielle (38,39,44).

Les cellules effectrices peuvent également être la cible d'un anticorps. L'ipilimumab (MDX-010, Medarex Inc, Bloomsbury, NJ) est un anticorps humanisé qui cible le récepteur CTLA-4. Le CTLA-4 est un récepteur exprimé de manière transitoire sur les lymphocytes activés. La liaison de ce récepteur à son ligand peut provoquer l'apoptose du lymphocyte. L'ipilimumab bloque cette interaction. Dans une étude phase II, 1 patient a démontré, à retardement, une réponse significative suite à l'injection de l'ipilimumab (40,45).

D'autres groupes ont misé sur les mécanismes immunitaires responsable des réactions de rejet hyperaiguë des xénogreffes pour stimuler la réponse anti-tumorale. Dans un essai clinique de phase 2, des patients atteints de cancer du pancréas avancés sous traitement adjuvant conventionnel ont démontré une survie à un an de 86%, supérieure à celle de cohorte historique (55-65%), avec l'ajout d'injections de l'Algenpantucel-L (NewLink Genetics Corporation, Ames, IA) (41,46). L'Algenpantucel-L est un vaccin pancréatique composé de deux lignées cellulaires de cancer du pancréas qui ont été manipulé pour exprimer les épitopes responsable des rejets des xénogreffes. Ces données sont toutefois préliminaires.

Valeur pronostique des lymphocytes T infiltrant la tumeur

De manière cohérente avec les progrès réalisés en immunothérapie et les découvertes sur la reconnaissance tumorale par les lymphocytes T, une des avenues les plus prometteuses dans le développement de nouveaux outils pronostiques a été l'étude des lymphocytes T infiltrant les tumeurs (26,47). L'infiltration des lymphocytes T a été associée au pronostic de la majorité des cancers solides.

À cet effet, le type de tumeurs le plus étudié à ce jour est le cancer colorectal, avec plus de 29 publications depuis 1986. Les études de Pagès et Galon en 2005 et 2006 sur des cohortes d'environ 450 patients ont suggéré que des densités élevées de lymphocytes CD3⁺ et CD45RO⁺ au sein des tumeurs et de leurs marges infiltratives étaient associées à une meilleure survie sans récurrence (42,43,48,49). Alors que la molécule de surface CD3 est un marqueur constitutif général des lymphocytes T, CD45RO est généralement exprimé à la surface de lymphocytes passés du stade naïf au stade mémoire après reconnaissance d'antigènes connus. Les mêmes auteurs proposaient en 2009 un « score immunitaire » combinant les densités des lymphocytes CD8⁺ et CD45RO⁺, dans les deux zones, qui permettrait d'évaluer le risque de récurrence chez les patients atteints de cancer colorectal opérés à un stade précoce (26,44). Contrairement au marqueur lymphocytaire CD4, CD8 représente un sous-type de lymphocytes effecteurs potentiellement cytolytiques. La valeur pronostique des lymphocytes CD45RO⁺ a récemment été suggérée par une revue de la littérature et l'étude d'une cohorte de 768 patients par Nosho *et al.* Leur étude suggère qu'une haute densité de CD45RO⁺ demeure un facteur pronostique indépendant, et ce, en contrôlant pour les mécanismes moléculaires associés avec le pronostic et l'infiltrat lymphocytaire : « microsatellite instability », « CpG island methylation » et les mutations de K-*ras* (45,50). Une autre étude laisse entrevoir que ces résultats sont également valides pour la maladie métastatique dans le cancer colorectal : un ratio CD8⁺ sur CD4⁺ élevé était associé à une meilleure survie chez les patients ayant subi une métastectomie hépatique (46,49).

Dans le cancer colorectal et d'autres types de cancer, plusieurs groupes se sont attardés à la valeur pronostique des lymphocytes T_R. Les lymphocytes T_R sont souvent absents des tissus normaux mais représentent une proportion non-négligeable des lymphocytes infiltrant la tumeur. Une étude chez des patientes atteintes de cancer de l'ovaire a démontré que leur proportion augmentait dans les stades plus avancés (47,51). À ce jour, l'identification et la quantification précise des T_R demeurent des défis. Les T_R ont été identifiées au départ comme des lymphocytes CD4⁺ qui co-exprimaient le marqueur CD25. Puis, il a été noté, entre autres dans le cancer de l'ovaire, que la majorité des T_R identifiées exprimaient le facteur de transcription FOXP3. L'étude par double immunohistochimie des lymphocytes T infiltrant le cancer du pancréas a démontré que la totalité des cellules FOXP3⁺ étaient CD3⁺, presque toutes CD4⁺ et en majorité CD25⁺. Seule une minorité de CD8⁺, <1%, étaient FOXP3⁺ tant dans le cancer du pancréas que du colon (48,49,52).

Depuis, plusieurs sous-populations de T_R ont été décrites. Il existe des cellules CD25⁺FOXP3⁺ effectrices alors que des lymphocytes FOXP3⁻ jouent un rôle plutôt suppressif. Il apparaît de plus en plus clair qu'aucun marqueur ou groupe de marqueurs (FOXP3⁺, CD4⁺CD25⁺) ne sont exclusivement exprimé par les T_R (26,53).

Des essais fonctionnels supportent la notion que les lymphocytes CD4⁺ FOXP3⁺ infiltrant les tumeurs se comporteraient comme des T_R. En effet, des lymphocytes CD4⁺ FOXP3⁺ extraits de spécimen de mélanomes réséqués étaient incapables de produire des cytokines tel l'IL-2 suite à une stimulation *in vitro* (50,54). Le profil de cytokines produits par les lymphocytes FOXP3⁺ extraits de patients atteints de différents types de cancer a été comparé à celui de lymphocytes CD4⁺ induits *in vitro* à exprimer le marqueur FOXP3. Seulement 6 % de ceux prélevés étaient en mesure de sécréter l'IL-2 et l'IFN- γ alors que 80% de ceux induits y parvenaient. De plus, lorsque les lymphocytes FOXP3⁺ prélevés étaient placés en culture en compagnie d'autres lymphocytes T, la prolifération de ces derniers a été inhibée (49,55). Récemment, des études de cytométrie en flux dans le cancer du pancréas ont démontré une corrélation significative entre le nombre de lymphocytes CD4⁺CD25⁺ et le nombre de ceux FOXP3⁺ (51,56).

La valeur pronostique des lymphocytes T_R (FOXP3+) demeure un sujet de recherche. Leur densité élevée dans les cancers primaires a été associée avec une survie plus ou moins favorable selon le type de tumeurs étudiées. Dans une étude sur le cancer colorectal, une haute densité a été associée à une meilleure survie (52,57). Toutefois, dans le cancer colorectal métastatique, une sous-représentation de lymphocytes FOXP3+ était associée à une meilleure survie (53,58). Dans le cancer de l'ovaire, la capacité des cellules néoplasiques ovariennes à créer des métastases semblait liée à une haute densité de lymphocytes FOXP3+ (54,59). Il semble donc que leur rôle puisse varier selon le type de tumeur et le microenvironnement qui les entourent. La difficulté à les identifier pourrait partiellement expliquer certaines différences.

Quoiqu'imparfait, le marqueur FOXP3 demeure utile pour identifier les cellules T_R et, chez les patients atteints d'un cancer du pancréas, semble refléter adéquatement la proportion de même que l'activité des cellules T_R. FOXP3 pourrait donc être utilisé pour évaluer la valeur pronostic des T_R infiltrant les adénocarcinomes du pancréas.

Il existe des corrélations entre l'infiltration lymphocytaire et le pronostic d'autres types de cancer. Suite à la résection de métastases hépatiques de tumeurs neuroendocrines, il a été noté que la présence d'un infiltrat dense en CD3+ était associée avec une meilleure survie sans récurrence chez les patients atteints de tumeur de grade intermédiaire (55,60). Dans le cancer de l'ovaire, la présence de lymphocytes CD3+ au sein de la tumeur a été associée avec une meilleure survie et une diminution de la récurrence (56). Chez des patients traités avec une greffe hépatique pour un cancer hépatocellulaire, ceux qui avaient une haute densité de lymphocytes mémoire CD45RO+ intratumorale avaient une survie sans récurrence significativement plus longue (57,61-63). Dans le cancer de l'estomac, des densités élevées de lymphocytes CD3+, CD8+ et CD45RO+ étaient indépendamment associées avec une meilleure survie et une diminution du risque de métastases ganglionnaires (43,45,58,63-65). Dans le cancer de l'endomètre, une survie augmentée était notée chez les patientes dont la tumeur présentait une haute densité de CD8+ et ce pour tous les stades (59,66-68). Dans le cancer du poumons non à petites cellules, un nombre plus grand de CD8+ en intratumoral, plutôt que dans le stroma, était associé avec une meilleure survie (60,62). Les lymphocytes T CD3+, CD4+, CD8+,

CD45RO+ et FOXP3+ semblent associés au pronostic de plusieurs cancers et il serait utile de les évaluer tous dans le cancer du pancréas.

Lymphocytes T et le cancer du pancréas

Dans l'adénocarcinome du pancréas, seulement deux études japonaises ont étudié la valeur pronostique des lymphocytes T infiltrants (1,48,69). L'étude de Fukunaga a évalué l'impact des lymphocytes T CD4+ et CD8+ dans 80 adénocarcinomes du pancréas. L'hypothèse était qu'un grand nombre de CD4+ combiné à un grand nombre de CD8+ était associé à une meilleure survie. Dans les analyses de survies, le groupe CD8+ élevé avait un meilleur taux de survie à 5 ans par rapport au groupe CD8+ faible (42,2% vs 7,0% $p=0,0228$). Une tendance similaire était retrouvée pour CD4+ élevé sans toutefois être significative. Cependant, le groupe CD4+ élevé et CD8+ élevé (13 patients) avaient le meilleur taux de survie à 5 ans (48%), avec une différence très significative par rapport aux autres groupes ($p=0,0098$). Cette association CD4+ et CD8+ restait significative avec le statut N, la taille de la tumeur, les marges chirurgicales lors de l'analyse multivariée. L'étude d'Hiraoka analysait l'association entre le nombre de lymphocytes T FOXP3+ (T_R) et la survie chez 198 patients, leur hypothèse étant que la présence de T_R mène à une suppression de l'activité anti-tumorale. La proportion des lymphocytes T_R était plus élevée dans le stroma tumoral ainsi que le stroma inflammatoire et était associée avec une tumeur peu différenciée, un stage plus élevé et la présence de métastases. D'ailleurs, la survie moyenne était significativement augmentée dans le groupe avec une faible proportion de FOXP3+ (26,2 mois vs 13,4 mois, $p<0,0001$). La prévalence élevée de lymphocytes T_R demeurait un facteur pronostique en analyse multivariée ainsi que les métastases ganglionnaires ou à distance et les marges chirurgicales. Ces études montrent que l'étude des infiltrats lymphocytaires dans le cancer du pancréas reste encore limitée mais semble prometteuse.

Micromatrices de tissus

Les études qui ont permis de démontrer la valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire dans les tumeurs solides ont nécessité la quantification d'un grand nombre d'échantillons. Elles auraient été difficilement réalisables avant l'arrivée des micromatrices de tissu, ou « Tissu Micro Array » (TMA). En effet, réalisées à partir des blocs de paraffine des spécimens, les TMAs permettent de créer un nouveau bloc en paraffine contenant des centaines d'échantillons qui, une fois, coupés et montés sur une lame pourront être analysés. Les TMA sont donc très économes en tissu et permettent d'analyser simultanément des centaines, voire des milliers d'échantillons de tissus provenant d'autant de spécimens. Les micromatrices permettent de tester de manière efficace plusieurs marqueurs biologiques dans la recherche sur le cancer (61-63,66). Les micromatrices sont idéales pour l'étude d'association. De plus, l'utilisation de groupes d'échantillons d'un même spécimen de façon simultanée permet de minimiser l'impact de l'hétérogénéité des tumeurs et de mettre en avant des associations robustes pour une population (43,45,63-65).

Objectifs du projet de maîtrise

L'objectif de ce projet de maîtrise est de développer un nouvel outil pronostique qui pourrait palier aux limitations de la classification TNM actuelle du cancer du pancréas.

Nous soulevons l'hypothèse que la densité et la distribution des sous-types de lymphocytes T dans le tissu tumoral et péri-tumoral pourraient avoir une valeur pronostique associée à la survie et à la récurrence des patients et pourrait potentiellement permettre de stratifier les patients par pronostic de manière complémentaire au système TNM.

Pour valider cette hypothèse,

- Nous établirons les facteurs pronostiques d'une cohorte de patients opérés d'un adénocarcinome du pancréas et les comparerons avec ceux de la littérature
- Nous construirons des micromatrices à partir des adénocarcinomes pancréatiques et du pancréas péri-tumoral de ces patients
- Nous quantifierons les lymphocytes T avec le décompte des cellules CD3+, les sous-types "helpers" CD4+ (T_H) , cytotoxiques CD8+ (T_C) , effecteurs mémoires CD45RO+ (T_M) et régulateurs avec FOXP3+ (T_R).
- Nous analyserons en mode univarié et multivarié les associations entre durée de survie/récurrence et la densité des sous-types lymphocytaires, en les comparant aux variables clinicopathologiques.

Méthodes

Patients

Cette étude rétrospective a été approuvée par le comité d'éthique du CHUM. Les dossiers de tous les patients opérés consécutivement dans un but curatif à l'hôpital Saint-Luc du CHUM entre janvier 2000 et décembre 2008 pour un adénocarcinome du pancréas ont été étudiés. Les données démographiques (la durée des symptômes, les comorbidités, les résultats d'imagerie, le dosage de marqueurs et tests biochimiques de routine pré et post-opératoires d'électrolytes, de créatinine, d'hémoglobine, de leucocytes, de plaquettes, de bilirubine, d'albumine, de transaminases, de phosphatases alcalines, d'amylase et de lipase) ont été extraites des dossiers et inscrits dans une base de données sécurisée. Les données opératoires incluant le type de résection, le type d'anastomose, la durée de la chirurgie, les pertes sanguines, le nombre de transfusion sanguine et l'exécution de résection veineuse ont été notées. Les suites post-opératoire incluant la durée du séjour, les complications compilées selon la classification de Clavien et Dindo (18,26,42-45,52,66-68,70). De même que les traitements adjuvants, les récurrences et les décès ont été retrouvés à partir des dossiers de notre hôpital, de ceux des centres périphériques et du Registre québécois du cancer. Les patients ont été suivis jusqu'à leur décès ou jusqu'à la fin de l'étude, le 31 décembre 2009.

Les données histopathologiques ont été recueillies et ont été classifiées selon la 7^e édition de l'« American Joint Committee on Cancer and Union for International Cancer Control Guidelines ». Une pathologiste spécialisée en maladie gastro-intestinale a analysé à l'insu des données cliniques et de survie, les lames d'hématoxyline, phloxine et safran (HPS) des spécimens dont les données pathologiques étaient incomplètes afin de pouvoir conserver les patients dans l'étude.

Les patients décédés de complications dans les quatre-vingt-dix jours post-opératoires ont été exclus, de même que ceux ayant des cystadénocarcinomes ou seulement des foyers microscopiques d'adénocarcinomes découverts suite à une chirurgie pour une tumeur intra-

papillaire mucineuse du pancréas afin de garder une population d'étude homogène et pouvoir étudier la survie.

Construction des micromatrices

Pour la construction des micromatrices tissulaires, les biopsies pour les analyses de densités lymphocytaires ont été prélevées dans deux régions: la région tumorale (T) et péri-tumorale (PT). La région péri-tumorale a été définie comme suit :

- située de 2 mm à 10 mm de la région tumorale
- présence de parenchyme pancréatique d'apparence normale
- absence d'infiltration de cellules néoplasiques.

Les zones de tissus avec prédominance des vaisseaux sanguins, de tissus adipeux, nerveux ou fibreux ont été exclues. Les tumeurs de chaque patient ont été étudiées sur lames HPS. Pour chaque tumeur, une présélection des régions les plus représentatives de l'interface T et PT a été effectuée. Une lame par patient a été sélectionnée par la pathologiste qui a ensuite délimité à faible grossissement les zones de biopsies : trois tumorales et quatre péri-tumorales. Les blocs de paraffine correspondant aux lames marquées ont servi à construire les micromatrices avec un appareil manuel (« Manual Tissue Arrayer MTA-1 », Beecher Instruments, Sun Prairie, WI, EUA). Cet instrument prélève des cylindres uniformes dans des blocs de paraffine grâce un tube d'acier à paroi mince. Les cylindres, ou biopsies, sont transférés dans des blocs de paraffine receveurs. Des cylindres de 1 mm de diamètre ont été choisis pour maximiser la quantité de tissu (3,5,12,62). Les biopsies ont été déposées dans un espace prédéterminé dans le bloc donneur selon une grille créée au préalable de 9 rangées par 14 colonnes.

Des contrôles de tissus humains positifs (amygdales) et négatifs (utérus, cervelet, pancréas sain) valables pour les cinq anticorps ont été placés en copies multiples (de 3 à 4) sur chacune des micromatrices (figure 1, p. 17). Au total, sept micromatrices ont été nécessaires pour contenir les 777 biopsies des 111 cas (111 x (3+4)). Une biopsie tumorale était jugée non-

utilisable si moins de 25% de la surface comprenait du tissu tumoral (ou péricancéreux) de qualité suffisante pour une analyse immunohistochimique. Pour être inclus dans l'analyse un cas nécessitait qu'au moins une biopsie sur trois soit intacte en tissu tumoral ainsi qu'une sur quatre en tissu péricancéreux. Afin de ne pas perdre de patients lors de l'analyse, une 8^e micromatrice a été créée avec de nouvelles biopsies provenant des cas qui n'avaient pas initialement rencontrés ces critères.

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| A | CAS1-G | CAS7-B | CAS12-D | CAS13-D | CAS8-C | CAS5-B | CAS15-F | CAS13-B | CAS9-D | CAS13-E | POS | CAS16-F | CAS3-A | NEG |
| B | CAS2-A | CAS6-D | CAS10-F | CAS7-E | PAR-1 | CAS8-A | CAS9-B | PAR-2 | CAS12-B | CAS5-G | CAS9-C | CAS16-D | CAS14-B | CAS16-A |
| C | CAS3-G | COL | CAS2-F | CAS3-C | CAS11-G | CAS15-C | CAS4-D | CAS7-F | CAS3-B | CAS16-C | CAS10-G | CAS11-C | CAS5-F | CAS5-E |
| D | CAS4-B | CAS4-F | CAS6-B | CAS10-E | CAS4-E | CAS2-G | POS | CAS1-B | CAS8-B | CAS11-A | CAS13-G | CAS9-G | CAS13-A | CAS8-D |
| E | CAS3-E | CAS8-E | CAS13-F | CAS13-C | CAS10-A | CAS2-B | CAS15-E | CAS2-D | CAS15-D | CAS12-F | CAS16-E | CAS2-C | CAS7-D | COL |
| F | CAS5-D | CAS7-A | CAS14-A | CAS16-B | CAS11-F | CAS15-A | CAS1-C | CAS3-D | CAS11-B | CAS10-D | CAS8-G | CAS16-G | CAS3-F | CAS14-C |
| G | CAS6-E | CAS9-E | POS | CAS5-A | CAS15-B | CAS6-A | CAS7-C | CAS12-E | CAS4-A | CAS5-C | CAS12-G | CAS9-F | NEG | PAR-3 |
| H | NEG | CAS10-B | CAS6-C | CAS1-E | CAS8-F | CAS6-G | CAS1-F | CAS10-C | CAS7-G | CAS4-C | CAS6-F | | | |
| I | CAS1-D | CAS11-D | CAS15-G | CAS12-A | CAS9-A | CAS2-E | CAS12-C | CAS1-A | CAS4-G | COL | CAS11-E | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 |

Figure 1 - Mappe de la micromatrice #7. Chaque cas comptait 3 biopsies en zone tumorale, notées cas-A, -B et -C, et 4 biopsies en zone péri-tumorale, notées cas-D, -E, -F, et -G. Les échantillons sont disposés de manière aléatoire sur une grille de 9 rangées par 14 colonnes. Les contrôles sont positionnés dans les 4 quadrants (CER-cervelet, COL-col utérin, AMY- amygdale, PAR- parenchyme normal)

Immunohistochimie

Les micromatrices ont été coupées en sections de 3 µm d'épaisseur. Les sections ont été montées sur des lames et déparaffinées à l'aide de la solution « Ezprep » (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona, EUA). Les manipulations immunohistochimiques ont été réalisées par Danielle Grimard de l'équipe du laboratoire de pathologie du CHUM-HSL. L'activité de la peroxydase endogène a été bloquée par l'application de la solution inhibitrice du même manufacturier. Le démasquage a été réalisé à 95°C dans la solution tampon d'EDTA pH 8.0 pendant 30 minutes pour les anticorps CD3, CD8, CD45RO et 64 minutes pour l'anticorps CD4.

La détection d'antigène à partir des anticorps primaires a été réalisée dans la solution « Ventana Cell Conditioning One Solution ».

Les lames ont été incubées avec les anticorps selon les conditions suivantes :

- anti-CD3 (clone SP7, Novacastra, Quorum Technologies, Guelph, ON, Canada) dilué 1:100 à 37°C pour 32 minutes.
- anti-CD4 (clone 1F6, Novacastra) pré-dilué à 37°C pour 12 minutes avec un amplificateur
- anti-CD8 (clone C8/144B, Dako, Burlington, ON, Canada) dilué 1 :150 à 37°C pour 32 minutes.
- anti-CD45RO (clone UCHL1, Dako) dilué 1 :4000 à 37°C pour 32 minutes.

Les lames ont été rincées avec le tampon phosphate pH 7.0 avant une incubation dans la solution « Horseradish Peroxidase UltraView Multimer » (Ventana Cell Conditioning One Solution). La révélation a été réalisée avec de la diaminobenzine et amplifiée à l'aide de cuivre. Les lames ont été contre-colorées dans la solution Harris d'hématoxyline et avec de l'acide acétique. Les noyaux ont été colorés au bleu de méthylène. L'incubation avec l'anticorps anti-FOXP3 (Abcam, Toronto, Canada) a été réalisée sur la machine Discovery XT (Ventana Medical System, Tucson, Arizona, EUA). Les lames ont été incubées avec l'anticorps de lapin polyclonal dilué 1 :500. Le kit de détection DABmap (Ventana Medical System, Tucson, AZ, EUA) a ensuite été appliqué pour la révélation des anticorps.

Analyse d'image et quantification

La spécificité des marquages lymphocytaires a été évaluée par deux pathologistes de façon indépendante. Le marquage des lymphocytes a été comparé à celui des marqueurs positifs et négatifs. Lorsque le ratio signal sur bruit de fond a été jugé optimal, nous avons procédé à la quantification.

Les lames ont été numérisées en haute résolution à l'aide de la plateforme et du logiciel d'Hamamatsu (Olympus, Toronto, Canada). La résolution correspondait à un grossissement de 400x au microscope. Les lames ont été analysées à l'aide d'un algorithme de décompte cellulaire développé sur le logiciel de quantification de Visiopharm Histoinformatics Software (Visiopharm Histoinformatics Software, Olympus, Richmond Hill, Canada). La valeur des décomptes automatisés a été comparée avec celles des décomptes manuels effectués par échantillonnage. Lorsque la corrélation entre les décomptes automatisés et manuels était insuffisante ($R^2 < 0,75$), les décomptes manuels ont été refaits sur tous les échantillons. Ces valeurs ont alors été utilisées pour l'analyse finale. Les surfaces de chacune des biopsies ont été mesurées avec le logiciel de Hamamatsu afin d'obtenir une densité cellulaire en nombre de cellules par mm^2 .

Analyse statistique

La variable clinique principale, la durée de survie globale, a été mesurée à partir du moment de la chirurgie. Les décès survenant jusqu'au 31 décembre 2009 ont été inclus dans l'analyse. La variable secondaire, la survie sans récurrence, était mesurée du moment de la chirurgie jusqu'au dernier suivi ou la date de récurrence documentée par imagerie.

La méthode de Kaplan-Meier et le test de log-rank ont été utilisés pour estimer et comparer les survies selon le statut dans le cas de variables clinicopathologiques catégorielles. Les distributions des densités lymphocytaires ont été comparées selon la procédure de Mann Whitney. Les densités lymphocytaires ont été dichotomisées par rapport à leur médiane pour permettre la création d'un index lymphocytaire. Les analyses univariées pour déterminer la signification statistique d'associations entre les variables clinicopathologiques continues et la survie des patients ont été fait par régression de Cox. Les densités lymphocytaires ont été analysées d'abord comme variables continues puis catégorielles.

Pour tester l'indépendance des variables associées à la survie par analyse univariée, l'analyse multivariée a été exécutée selon le modèle de régression de Cox (modèle à risques proportionnels). Toutes les variables statistiquement significatives en analyse univariée ont été incluses dans les analyses multivariées ($p < 0,05$). Pour l'ensemble des tests statistiques, une valeur de $p < 0,05$ était considérée comme significative. L'analyse a été réalisée sur le logiciel SPSS (version 20.0) (SPSS Inc., Chicago, Illinois, États-Unis). Les analyses de survie ont été réalisées avec la survie globale et la survie sans récurrence. À moins de précision contraire, la survie globale seule est rapportée.

Résultats

Cent trente-huit (138) patients ont eu une résection à but curatif de leurs tumeurs du pancréas entre janvier 2000 et décembre 2008 (figure 2, p. 21). Cent vingt-deux (122) d'entre eux avaient des adénocarcinomes canaux pancréatiques. Cinq patients décédés au cours de la période post opératoire de 90 jours et six patients dont les tumeurs n'avaient pas une quantité suffisante de tissus préservés en paraffine ont été exclus.

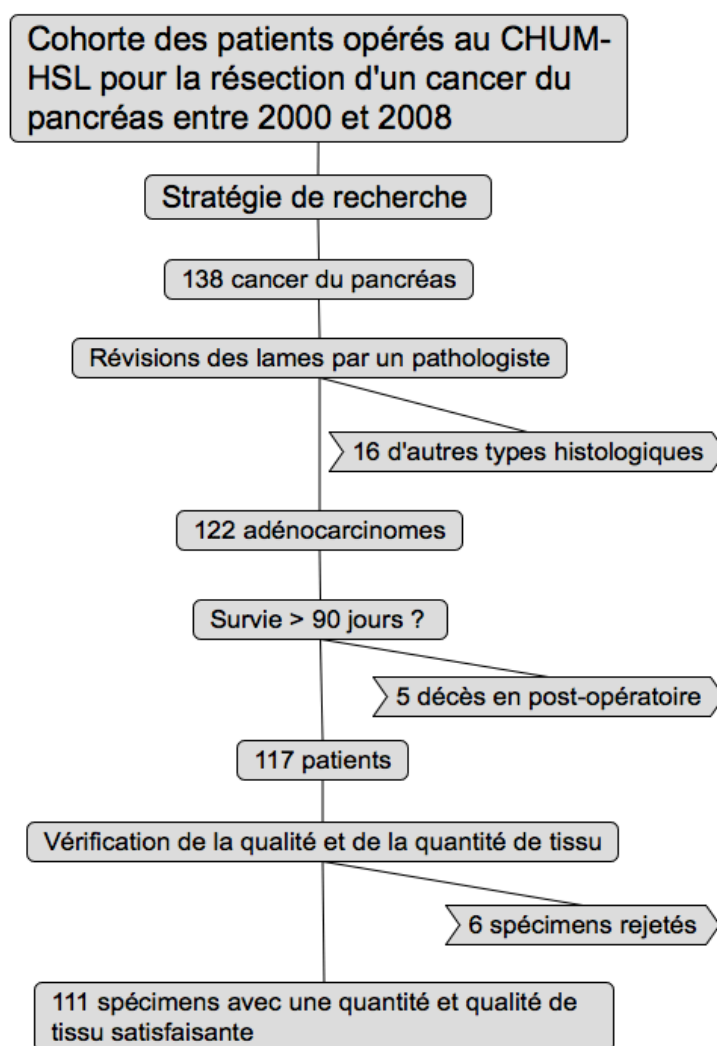


Figure 2 - Cohorte des patients opérés pour un adénocarcinome du pancréas à l'hôpital Saint-Luc du CHUM.

Caractéristiques des patients

La population étudiée était âgée en moyenne de 61,7 ans. L'âge médian était de 63 ans, pour un intervalle allant de 40 à 80 ans (tableau III p. 22).

Tableau III– Données cliniques pré-chirurgicales

| | | n (%) |
|-----------------------|--------------------------|------------|
| Âge (médiane) | ≤ 63 ans | 59 (53,1%) |
| | > 63 ans | 52 (46,9%) |
| Sexe | Homme | 64 (57,7%) |
| | Femme | 47 (42,3%) |
| ASA | I ou II | 68 (61,3%) |
| | III ou IV | 43 (38,7%) |
| IMC | ≤ 25 kg / m ² | 55 (49,5%) |
| | > 25 kg / m ² | 56 (50,5%) |
| Endoprothèse | Oui | 62 (55,9%) |
| | Non | 48 (43,2%) |
| Diabète | Oui | 14 (12,6%) |
| | Non | 97 (87,4%) |
| Albumine (médiane) | ≤ 36,5 g / L | 37 (50,0%) |
| | > 36,5 g / L | 37 (50,0%) |
| CA 19-9 | ≤ 200 U / mL | 39 (44,3%) |
| | > 200 U / mL | 49 (55,7%) |

Chirurgies

La résection réalisée était une duodéno pancréatectomie céphalique de Whipple (DPC), avec ou sans préservation pylorique, pour 94 des 117 patients. Une résection avec reconstruction veineuse (veine mésentérique, confluence ou veine porte) a été nécessaire pour quinze patients (tableau IV p. 23).

Les pertes sanguines, moyennes +/- écart type, étaient de 565 cc +/- 403 cc (150 – 3 000 cc).

La durée de la chirurgie moyenne de 412 min +/- 106 (180 – 600 min).

Le séjour médian en post-opératoire était de 24,6 jours +/- 15,3 (7-141 jours).

Tableau IV – données chirurgicales et de séjour des patients

| | | n (%) |
|----------------------------|-----------------|-------------|
| Type de chirurgie | DPC* | 93 (83,7%) |
| | corporéocaudale | 13 (11,7%) |
| | subtotale | 4 (3,6%) |
| | totale | 1 (0,9%) |
| Résection veineuse | oui | 15 (13,5%) |
| | non | 96 (86,5%) |
| Durée (médiane) | ≤ 420 min | 58 (52,3%) |
| | > 420 min | 53 (47,7%) |
| Pertes sanguines (médiane) | ≤ 500 ml | 76 (68,5%) |
| | >500 ml | 33 (29,7%) |
| Transfusion | oui | 9 (8,1%) |
| | non | 102 (91,9%) |
| Séjours (médiane) | ≤ 21 jours | 57 (51,4%) |
| | > 21 jours | 54 (58,6%) |

*DPC : duodéno pancréatectomie céphalique

Complications

Le taux de morbidité était de 55%. Trente-cinq patients ont développé une fistule pancréatique et vingt-neuf une gastroparésie.

Le détail et la gravité des complications selon la classification de Clavien-Dindo (66) sont résumés dans le tableau V page 24.

Six patients ont été ré-opérés pour des complications: déhiscence de plaie (2 patients), débridement de plaie (1 patient), saignement intra-abdominal (1 patient), ischémie du grêle (1 patient), et un patient à deux reprises pour le drainage d'un hématome sous-dural et la création d'une trachéotomie.

Tableau V - Complications classifiées par sévérité selon la classification de Clavien-Dindo

| Grade | Complications | | | | | |
|-------|---------------|-----------|---------|-------|------|------|
| | Inf. | Inf. uri. | GastroP | FistP | CR | NP |
| I | - | - | - | 1 | 11 | 3 |
| II | 21 | 12 | 20 | 23 | 15 | 7 |
| IIIa | 1 | - | 9 | 10 | - | - |
| IIIb | - | - | - | 1 | - | - |
| IVa | - | - | - | - | 2 | 1 |
| IVb | - | - | - | - | - | - |
| V | - | - | - | - | - | - |
| Total | 22 | 12 | 29 | 35 | 27 | 11 |
| (%) | (19,8) | (10,8) | (26,1) | (32) | (24) | (10) |

Inf. : infection, Inf. uri.: infection urinaire, GastroP : gastroparésie, FistP : fistule pancréatique, CR : cardiorespiratoire, NP : neuropsychiatrie

Pathologie

Quatre-vingt-onze patients (82%) ont présenté une maladie qui s'étendait au-delà du pancréas (T3). Quatre-vingt patients (72%) avaient des métastases ganglionnaires (N1). Le nombre de ganglions atteints variait entre 1 et 20. Quatre-vingt-dix patients (81%) ont eu une résection en marge microscopiquement négative (R0) et 21 (19%) en marge microscopiquement positive (R1). Aucun ne présentait de marge macroscopiquement positive (R2).

Les données pathologiques complètes sont présentées dans le tableau VI, page 26.

Tableau VI – Données histopathologiques

| | | n (%) |
|---------------------------|--------------|-----------|
| Stage | T1-T2 | 20 (18,0) |
| | T3 | 91 (82,0) |
| N | N0 | 31 (27,9) |
| | N1 | 80 (72,1) |
| Nombre de ganglions | 0 | 31 (27,9) |
| | 1-3 | 29 (26,1) |
| | ≥ 4 | 25 (22,5) |
| Degré de différenciation | Bien | 48 (43,2) |
| | Modéré / Peu | 57 (56,8) |
| Envahissement périneural | oui | 93 (83,8) |
| | non | 5 (4,5) |
| Envahissement lymphatique | oui | 82 (73,9) |
| | non | 16 (14,4) |
| Marges | R0 | 90 (81,0) |
| | R1 | 21 (19,0) |

Micromatrices

89,8% des biopsies étaient utilisables. Le détail des biopsies utilisables est développé dans le tableau VII, page 27. Un exemple de micromatrice est démontré sur la figure 3, page 28. Des biopsies représentatives prises en zones tumorales et péri-tumorales sont affichées sur la figure 4 page 29. Les variations de densités des différents types de lymphocytes étaient importantes (figure 5 p. 30 et figure 6 p. 31).

Tableau VII - Nombre de cas analysables par marqueurs et zones

| Marqueurs | % de biopsies utilisables | Cas avec ≥ 1 biopsie utilisable |
|-----------------|---------------------------|--------------------------------------|
| CD3+ T | 87,5% | 110 |
| CD3+ PT | 92,9% | 109 |
| CD4+ T | 86,6% | 111 |
| CD4+ PT | 92,9% | 108 |
| CD8+ T | 84,8% | 110 |
| CD8+ PT | 92,9% | 109 |
| CD45RO+ T | 88,4% | 110 |
| CD45RO+ PT | 89,3% | 108 |
| FOXP3+ T | 90,2% | 111 |
| FOXP3+ PT | 92,0% | 109 |
| Total - Moyenne | 89,8% | 109,5 |

T : zone tumorale PT : zone péri-tumorale

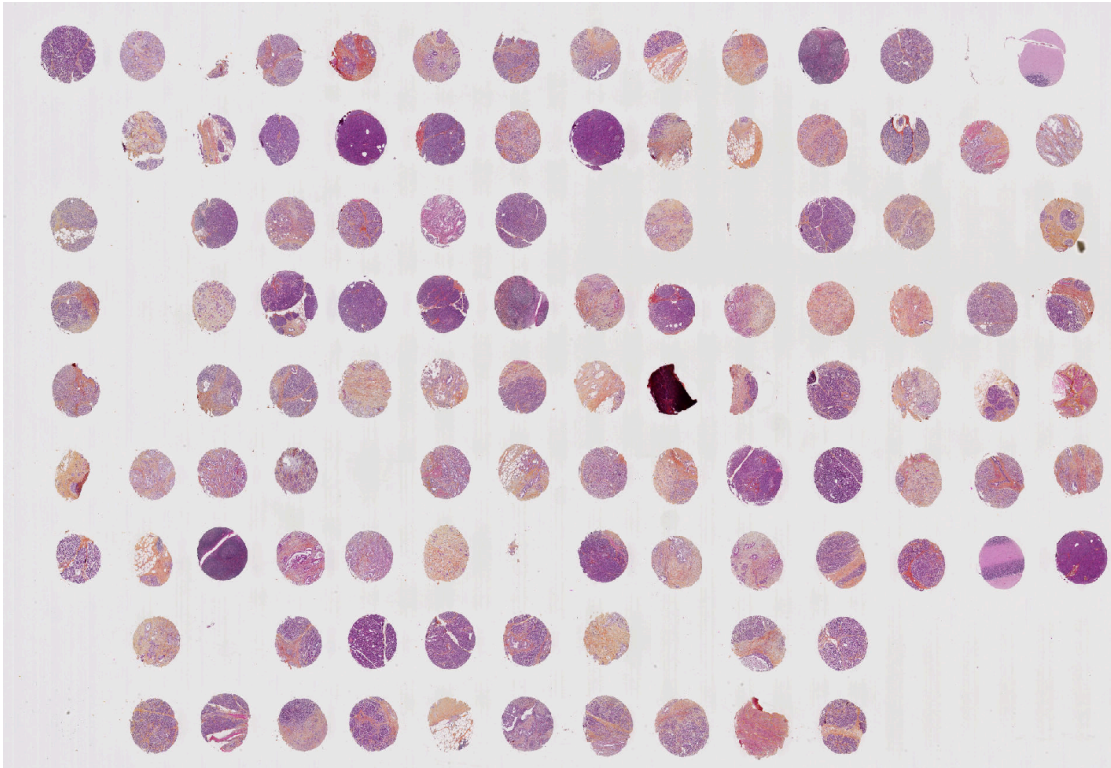


Figure 3 - Micromatrice 7 en colorations HPS

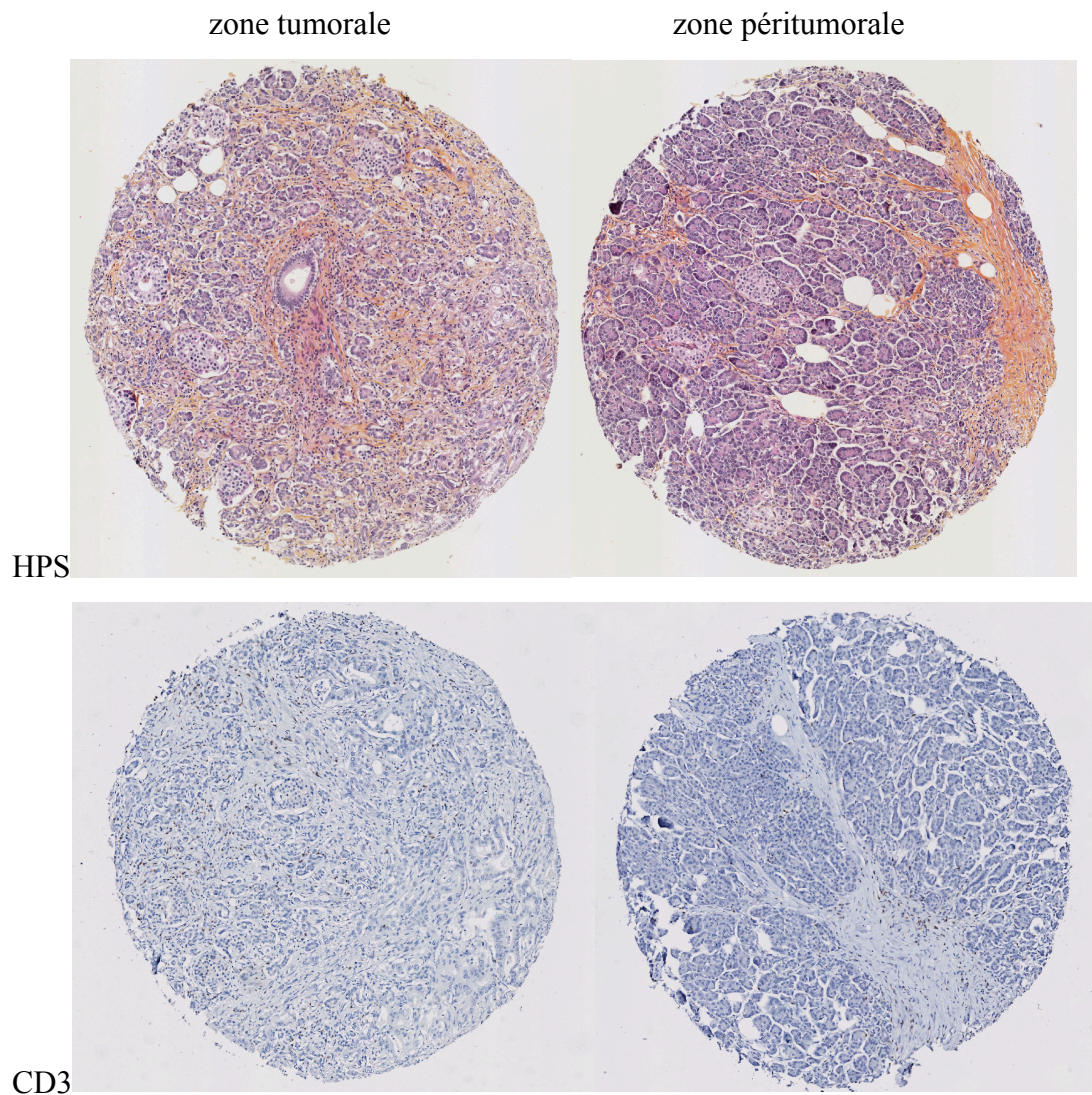


Figure 4 - Biopsies représentatives prises en zone tumorale (colonne de gauche) et en zone péri-tumorale en (colonne de droite). Les biopsies de la rangée supérieure ont été colorées à l'aide d'HPS alors que celles de la rangée inférieure ont été marquées en immunohistochimie pour le CD3.

Densités des sous-populations de lymphocytes

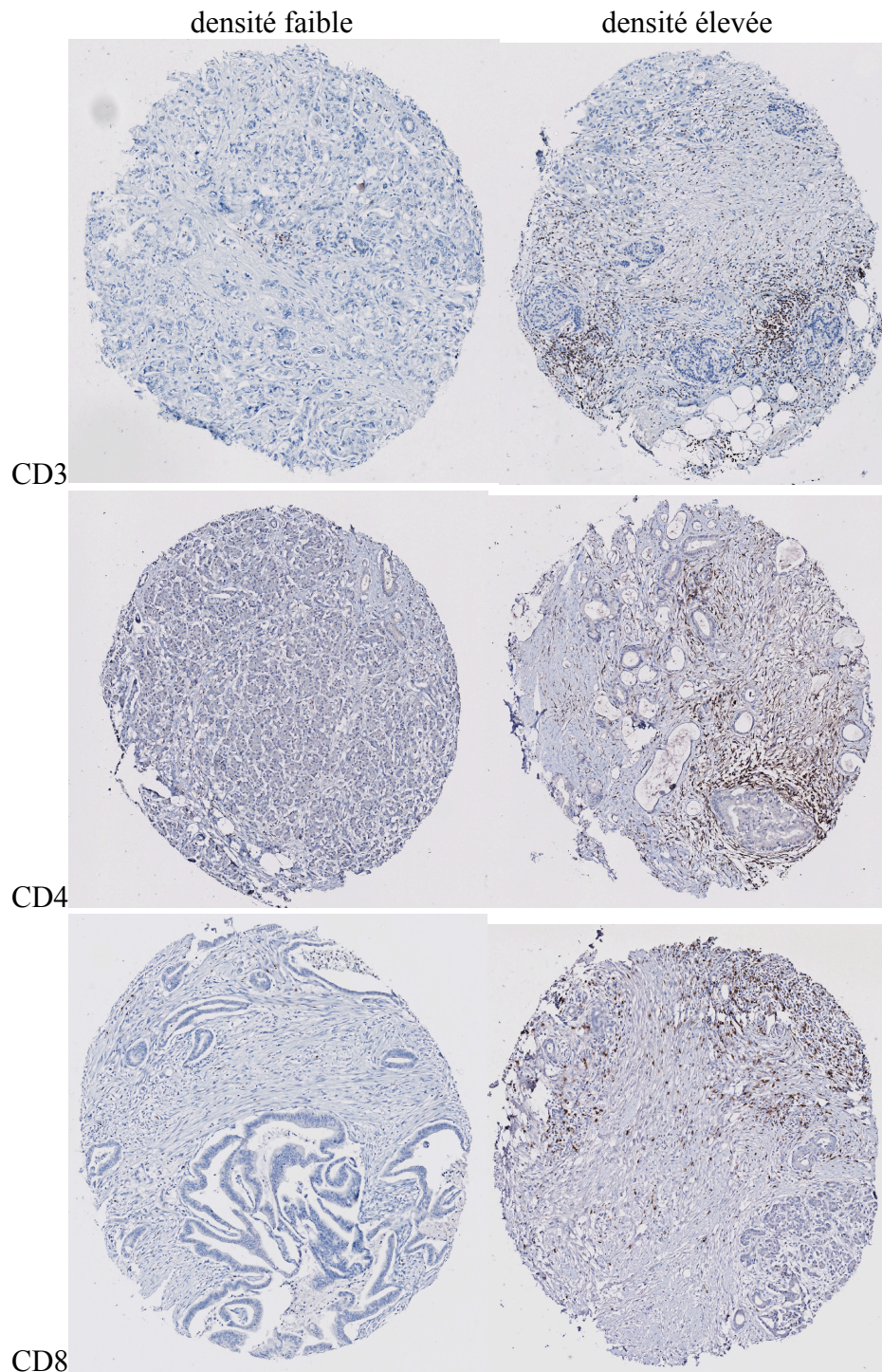


Figure 5 – Biopsies représentatives de tissus avec des densités faibles (colonne de gauche) et élevées (colonne de droite) des marqueurs immunohistochimiques CD3 (1^{ière} rangée), CD4 (2^e rangée) et CD8 (3^e rangée)

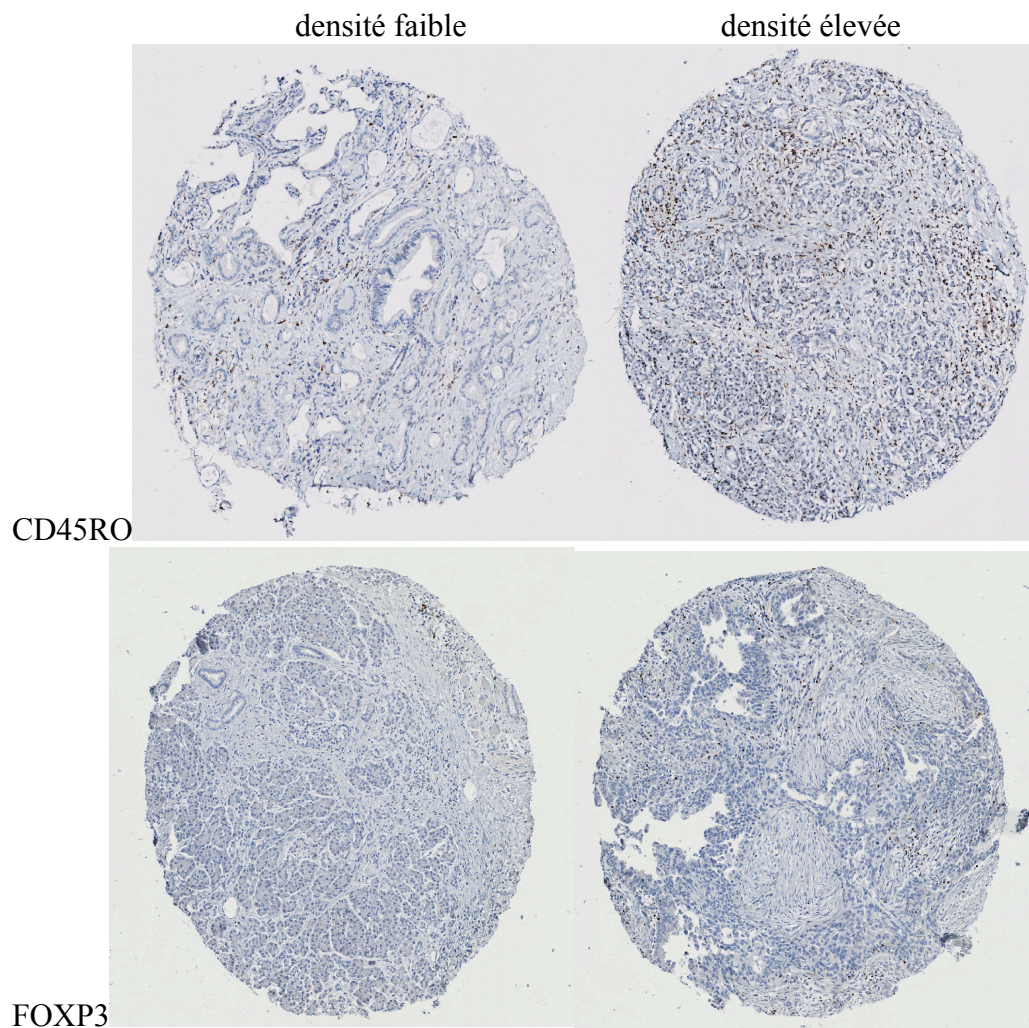


Figure 6 – Biopsies représentatives de tissus avec des densités faibles (colonne de gauche) et élevées (colonne de droite) des marqueurs immunohistochimiques CD45RO (1^{ière} rangée) et FOXP3 (2^e rangée)

Validation du décompte automatique

Le décompte automatique a été réalisé avec le logiciel Visiopharm Histoinformatics Software. Une étude de validation a été réalisée démontrant une corrélation entre les décomptes manuel et automatique pour les cellules CD3+ ($R^2=0,983$; $p<0,0005$) et pour les cellules CD8+ ($R^2 = 0,808$ et $p < 0,0005$) (figure 7 p.32 et figure 8 p. 33)

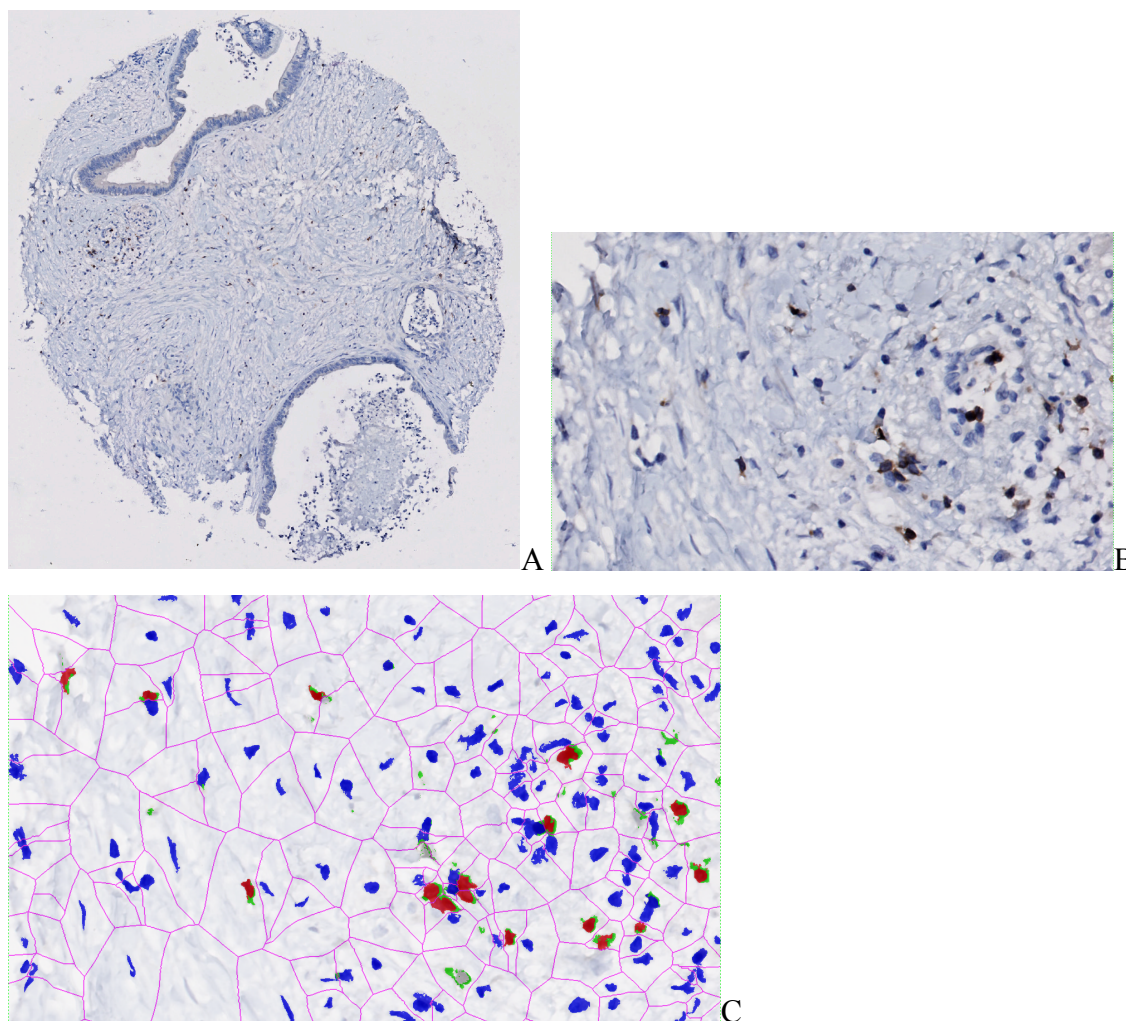
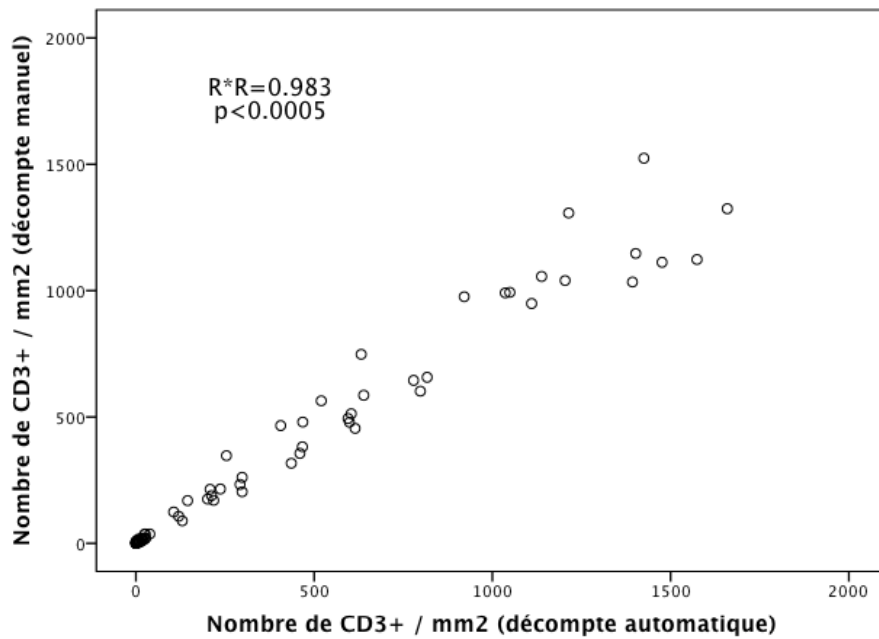
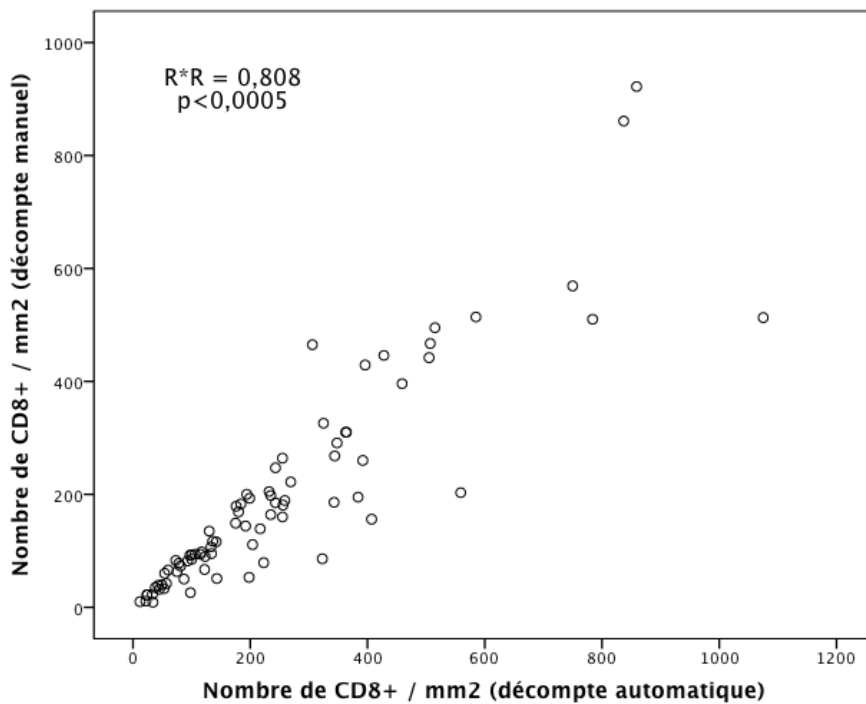


Figure 7 - Processus de quantification automatisée – A : Coloration immunohistochimie avec l'anticorps anti-CD8 d'une biopsie en lésion tumorale. B : Gros plan. C : Quantification à l'aide l'algorithme de Visiopharm Histoinformatics Software.

Légende : bleu = lymphocytes ; vert = marquage immunohistochimique anti-CD8 ; rouge = cellules CD8+ marquées. Les lignes rosées délimitent les cellules lorsque celles-ci sont juxtaposées.



A



B

Figure 8 - A : corrélation entre le décompte manuel et le décompte automatique des lymphocytes CD3+ dans 80 biopsies sélectionnées de manière aléatoire. B : corrélation entre le décompte manuel et le décompte automatique des lymphocytes CD8+ dans 80 biopsies sélectionnées de manière aléatoire.

Tableau VIII – Comparaison des densités lymphocytaires (nombre de cellules / mm²)

| Marqueurs | n | Moyenne | Médiane | Intervalle | p |
|-----------|-----|---------|---------|------------|--------|
| CD3+ T | 110 | 167 | 108 | 1-1014 | 0,964 |
| CD3+ PT | 108 | 171 | 110 | 5-1181 | |
| CD4+ T | 110 | 71 | 53 | 0,5-382 | 0,389 |
| CD4+ PT | 107 | 72 | 40 | 2-653 | |
| CD8+ T | 110 | 144 | 112 | 2-500 | 0,002 |
| CD8+ PT | 108 | 185 | 149 | 31-886 | |
| CD45RO+ T | 109 | 85 | 60 | 2-413 | 0,678 |
| CD45RO+PT | 107 | 90 | 58 | 2-523 | |
| FOXP3+ T | 111 | 13 | 8,8 | 0-92 | <0,001 |
| FOXP3+ PT | 108 | 6 | 3,4 | 0-82 | |

T : zone tumorale PT : zone péri-tumorale

Les densités lymphocytaires dans les zones tumorales (T) et péri-tumorales (PT) sont présentées pour chaque sous-type dans le tableau VIII page 34. Les densités étaient significativement différentes dans les deux zones T et PT pour les lymphocytes CD8+ et FOXP3+ avec respectivement : 144 cellules/mm² en tumoral vs 185 cellules/mm² en péri-tumoral (p = 0,002) et 13 cellules/mm² en tumoral vs 6 cellules/mm² en péri-tumoral (p<0,001). Pour les densités cellulaires moyennes de CD3, le rapport, chez chaque patient, entre les densités en T vs PT permettait de diviser en deux groupes. Ceux dont CD3+ étaient plus denses en intratumoral (49 cas) versus ceux dont les CD3+ étaient plus denses en péri-tumoral (58 cas) (figure 9, p. 35).

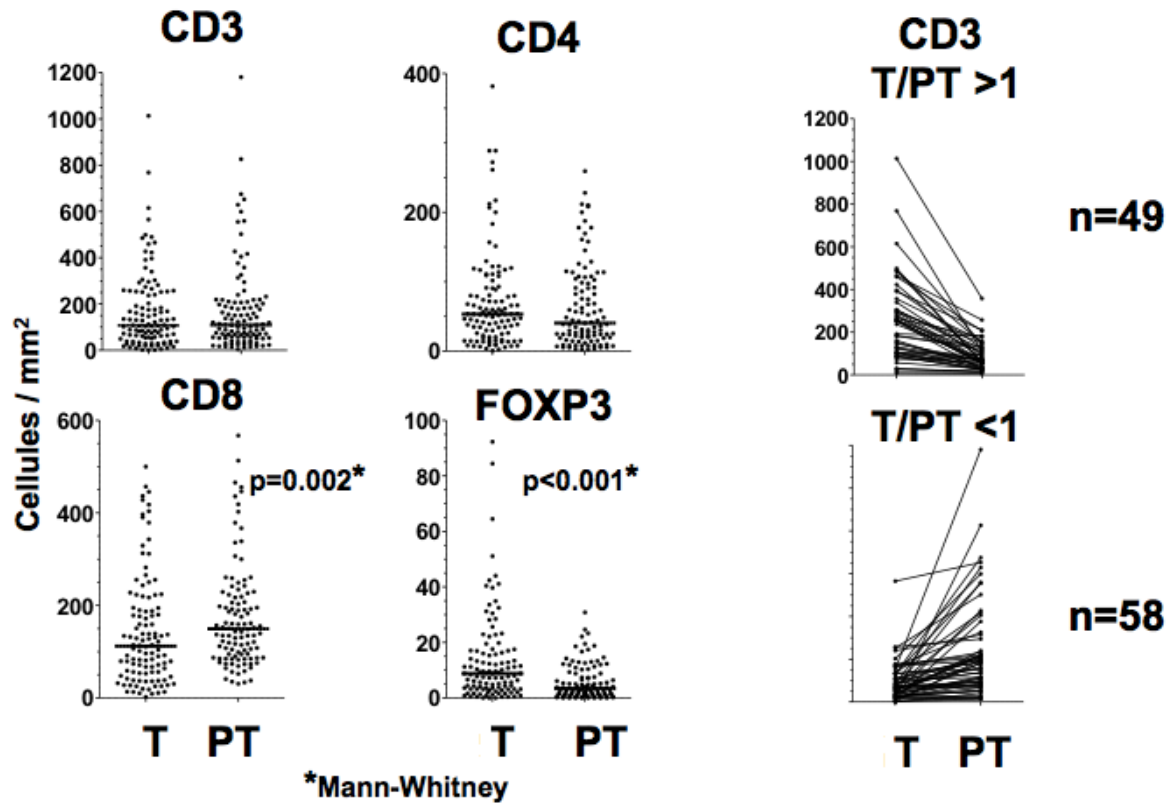
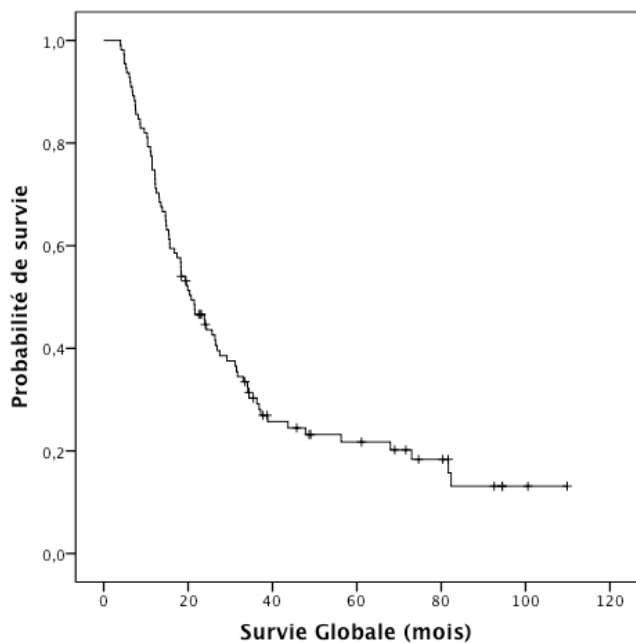


Figure 9 - Comparaisons des densités lymphocytaires dans les zones tumorales (T) vs péri-tumorales (PT) A : distribution des densités lymphocytaires (points) et comparaison des densités moyennes (barres) entre les deux zones pour les lymphocytes CD3+, CD4+, CD8+ et FOXP3+. B : Les densités des CD3+ en zone tumorale (T) et en zone péri-tumorale (PT) étaient comparées pour chacun des patients. 49 patients avaient une densité de CD3+ plus grande en T ($T/PT > 1$) et cinquante-huit patients avec une densité de CD3+ plus grande en PT signifiant ($T/PT < 1$).

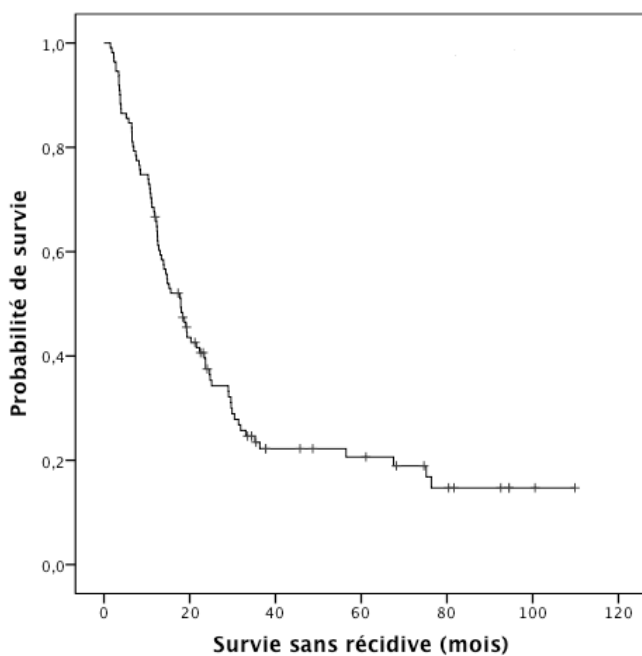
Suivi et survie

Le suivi médian était de 19,9 mois (4-110 mois). La survie médiane globale était de 20,7 mois avec un taux de survie globale à 5 ans de 20,5%. La survie médiane sans récurrence était de 18,8 mois avec un taux de survie sans récurrence à 5 ans de 18,8% (figure 10, p. 36). Un seul patient avait reçu un traitement néo-adjuvant de radiochimiothérapie. Soixante-cinq patients ont reçu

des traitements adjuvants : trente de la chimiothérapie seule (gemcitabine) et trente-cinq de la radiochimiothérapie (5-FU). Les données étaient manquantes pour neuf patients.



A



B

Figure 10 - Courbes de survies. A : Survie globale. B : Survie sans récurrence

Analyse de la survie selon les critères cliniques et pathologiques

La valeur de CA 19-9 était la seule caractéristique clinique préopératoire associée significativement à la survie (tableau IX p. 38). La résection veineuse (RV) était l'unique facteur chirurgical associée à une survie significativement moindre (survie médiane de 11,5 mois vs 23,9 mois, $p=0,023$) (tableau IX p. 38).

Parmi les facteurs histopathologiques, les critères associés à une meilleure survie étaient : une tumeur bien différenciée vs modérément/peu différenciée (survie médiane de 49,2 vs 22,6 mois, $p<0,0005$), une absence de métastase ganglionnaire (survie médiane de 48,3 vs 29,9 mois, $p=0,029$). Un nombre élevé de ganglions positifs était associé à une survie moindre. Les patients n'ayant aucune métastase ganglionnaire avaient une survie médiane de 48,3 mois vs 36,9 mois pour les patients ayant de 1 à 3 ganglions atteints et seulement 14,5 mois pour ceux avec 4 ganglions et plus d'atteints ($p<0,0005$) (tableau X p. 39 et figure 11 p. 40).

L'utilisation de traitement adjuvant était significativement associée à une meilleure survie (survie médiane de 27,5 vs 14,9 mois, $p=0,003$). Il n'y avait pas de différence de survie significative entre les patients recevant de la chimiothérapie vs ceux recevant de la radiochimiothérapie en thérapie adjuvante.

Tableau IX – Analyse de survie univariée des facteurs cliniques, démographiques, chirurgicales et adjuvants

| | | n | Survie médiane (mois) | I.C. 95% | p |
|------------------|--------|----|-----------------------|-----------|-------|
| Âge (années) | ≤ 63 | 59 | 21,5 | 15,6-27,3 | 0,686 |
| | > 63 | 52 | 19,4 | 6,9-31,9 | |
| Sexe | H | 64 | 16,8 | 13,3-20,2 | 0,096 |
| | F | 47 | 29,2 | 18,7-39,8 | |
| ASA | I-II | 68 | 23,9 | 14,7-33,1 | 0,128 |
| | III-IV | 43 | 19,6 | 15,1-24,1 | |
| Chirurgie | DPC | 94 | 19,6 | 16,4-22,8 | 0,367 |
| | Autres | 17 | 26,5 | 14,0-39,0 | |
| RV | oui | 15 | 11,5 | 2,4-20,5 | 0,023 |
| | non | 96 | 23,9 | 18,0-29,7 | |
| Pertes (ml) | ≤ 500 | 76 | 19,4 | 12,1-26,7 | 0,769 |
| | > 500 | 33 | 20,7 | 11,7-29,8 | |
| Adjuvant | oui | 65 | 27,5 | 19,6-35,4 | 0,003 |
| | non | 37 | 14,9 | 11,8-17,9 | |
| Séjour (jours) | ≤ 21 | 57 | 24,3 | 17,3-31,4 | 0,163 |
| | > 21 | 54 | 18,2 | 13,1-23,4 | |
| Albumine (g / L) | ≤ 36,5 | 37 | 14,9 | 8,8-21,0 | 0,601 |
| | > 36,5 | 37 | 21,6 | 15,3-27,8 | |
| CA 19-9 (U / mL) | ≤ 200 | 39 | 26,9 | 24,6-29,3 | 0,014 |
| | > 200 | 49 | 14,7 | 12,2-17,1 | |

DPC : duodéno pancréatectomie céphalique, RV : Résection veineuse

Tableau X – Analyse de survie univariée des données histopathologiques

| | | n | Survie médiane (mois) | Valeur p |
|----------------------|-----------|----|-----------------------|----------|
| Stage | T1-T2 | 20 | 36,9 | 0,361 |
| | T3 | 91 | 34,9 | |
| N | N0 | 31 | 48,3 | 0,029 |
| | N1 | 80 | 29,9 | |
| Nombre ganglions | 0 | 31 | 48,3 | <0,0005 |
| | 1-3 | 29 | 36,9 | |
| | ≥ 4 | 25 | 14,5 | |
| Différentiation | Bien | 48 | 49,2 | <0,0005 |
| | Mod. /Peu | 57 | 22,6 | |
| Invasion périneurale | oui | 93 | 53,73 | 0,090 |
| | non | 5 | 30,3 | |
| Invasion lymphatique | oui | 82 | 34,4 | 0,129 |
| | non | 16 | 45,2 | |
| Marges | R0 | 90 | 37,0 | 0,295 |
| | R1 | 21 | 29,4 | |

N : statut ganglionnaire, Mod. : modérément

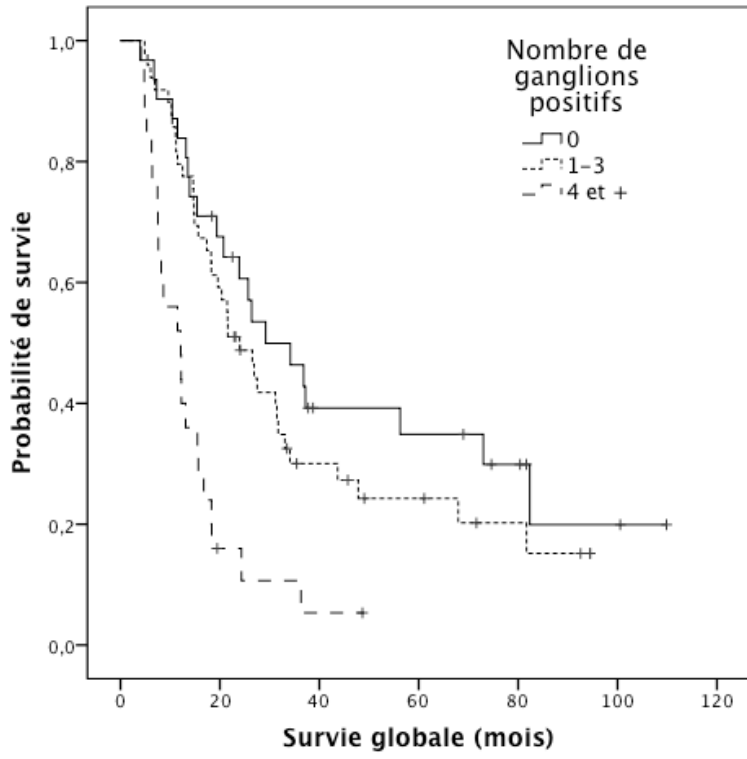


Figure 11 - Courbes de survie selon le nombre de ganglions positifs

Analyse de la survie selon la densité des lymphocytes T

Analyse en valeur continue

En analyse univariée, en utilisant des valeurs continues, une densité élevée de CD4+ en région tumorale ($p=0,047$) et une faible densité de CD8+ en région péri-tumorale ($p=0,014$) étaient associés à une meilleure survie. Les autres populations de lymphocytes n'étaient pas significativement associées à la survie (tableau XI, p. 42).

Une analyse des ratios région tumorale sur région péri-tumorale (T/PT) pour une association à la survie tel qu'un ratio élevé est associé à un meilleur taux de survie a été réalisée. Cette association était significative pour CD3+ et CD8+ ($p=0,02$ et $p=0,028$ respectivement) (tableau XI, p. 42).

Analyse en valeur dichotomisée

Les valeurs de densités ont été dichotomisées selon la médiane pour définir chaque type de lymphocytes en deux groupes :

« high » : \geq à la médiane, noté : ^{hi}

« low » : $<$ la médiane, noté : ^{lo}

Par exemple, le groupe CD4+ tumoral avec une densité supérieure ou égale à la médiane était noté : CD4+ T^{hi}.

Dans cette analyse, CD4+ T^{hi} était le seul marqueur associé significativement à la survie.

Pour chaque type de lymphocytes, le ratio de densité a été dichotomisé de la manière suivante :

« high » pour $T/PT \geq 1$, noté : ^{hi}

« low » pour $T/PT < 1$, noté : ^{lo}

Par exemple, le ratio CD4+ tumoral sur péri-tumoral supérieur à 1 était noté : CD4+ T/PT^{hi}.

Les ratios CD3+ T/PT^{hi} et CD45RO+ T/PT^{hi} étaient significativement associés à une meilleure survie ($p=0,010$ et $p=0,032$) respectivement (tableau XII p. 43).

Tableau XI – Association entre la survie et les densités lymphocytaires comme variables continues

| Populations | n | Moyenne | p | cote |
|---------------------|-----|---------|-------|-------|
| Tumorale | | | | |
| CD3+ | 110 | 167 | 0,224 | 0,999 |
| CD4+ | 110 | 71 | 0,047 | 0,996 |
| CD8+ | 110 | 144 | 0,244 | 0,999 |
| CD45RO+ | 109 | 85 | 0,117 | 0,998 |
| FOXP3+ | 111 | 13 | 0,542 | 0,996 |
| Péritumorale | | | | |
| CD3+ | 108 | 171 | 0,132 | 1,001 |
| CD4+ | 107 | 72 | 0,176 | 1,002 |
| CD8+ | 108 | 185 | 0,016 | 1,002 |
| CD45RO+ | 107 | 90 | 0,135 | 1,001 |
| FOXP3+ | 108 | 6 | 0,137 | 1,016 |
| T/PT | | | | |
| CD3+ | 107 | 1,74 | 0,02 | 0,854 |
| CD4+ | 107 | 3,80 | 0,094 | 0,966 |
| CD8+ | 107 | 1,10 | 0,028 | 0,765 |
| CD45RO+ | 105 | 2,69 | 0,057 | 0,944 |
| FOXP3+ | 101 | 4,76 | 0,843 | 0,996 |

Cote : cote de survie

Tableau XII - densités lymphocytaires en fonction de la survie

| | Populations | n | Survie médiane (mois) | p | SSR Médiane (mois) | p |
|---------------------------|----------------------------|------|-----------------------|-------|--------------------|-------|
| Tumorale | CD3 ^{hi} | 55 | 24,3 | 0,610 | 21,6 | 0,694 |
| | CD3 ^{lo} | 55 | 18,2 | | 17,3 | |
| | CD4 ^{hi} | 55 | 25,7 | 0,05 | 23,7 | 0,154 |
| | CD4 ^{lo} | 55 | 15,4 | | 17,3 | |
| | CD8 ^{hi} | 55 | 23,9 | 0,627 | 18,0 | 0,717 |
| | CD8 ^{lo} | 55 | 19,9 | | 18,7 | |
| | CD45RO ^{hi} | 55 | 21,6 | 0,528 | 19,1 | 0,603 |
| | CD45RO ^{lo} | 54 | 16,8 | | 17,9 | |
| | FOXP3 ^{hi} | 58 | 26,9 | 0,220 | 19,3 | 0,526 |
| | FOXP3 ^{lo} | 53 | 18,4 | | 17,9 | |
| Péritumorale | CD3 ^{hi} | 54 | 18,3 | 0,170 | 17,7 | 0,092 |
| | CD3 ^{lo} | 54 | 21,5 | | 19,3 | |
| | CD4 ^{hi} | 54 | 19,4 | 0,298 | 17,9 | 0,490 |
| | CD4 ^{lo} | 53 | 21,5 | | 19,1 | |
| | CD8 ^{hi} | 54 | 18,3 | 0,143 | 21,6 | 0,164 |
| | CD8 ^{lo} | 54 | 24,0 | | 13,1 | |
| | CD45RO ^{hi} | 54 | 18,3 | 0,062 | 14,0 | 0,086 |
| | CD45RO ^{lo} | 53 | 24,0 | | 22,3 | |
| | FOXP3 ^{hi} | 54 | 19,4 | 0,801 | 18,0 | 0,712 |
| | FOXP3 ^{lo} | 54 | 20,7 | | 18,8 | |
| T / PT | CD3+ T/PT ^{hi} | 49 | 26,4 | 0,010 | 23,7 | 0,012 |
| | CD3+ T/PT ^{lo} | 58 | 14,9 | | 12,8 | |
| | CD4+ T/PT ^{hi} | 55 | 25,7 | 0,051 | 22,3 | 0,094 |
| | CD4+ T/PT ^{lo} | 52 | 18,2 | | 13,1 | |
| | CD8+ T/PT ^{hi} | 42 | 25,7 | 0,063 | 21,2 | 0,259 |
| | CD8+ T/PT ^{lo} | 65 | 18,3 | | 17,3 | |
| | CD45RO+T/PT ^{hi} | 47 | 25,7 | 0,032 | 21,6 | 0,069 |
| | CD45RO+ T/PT ^{lo} | 58 | 14,9 | | 13,1 | |
| | FOXP3+ T/PT ^{hi} | 71 | 20,7 | 0,144 | 18,0 | 0,141 |
| FOXP3+ T/PT ^{lo} | 30 | 13,6 | | 13,1 | | |

Index lymphocytaire (IL)

Les trois variables de densités ayant démontré la plus forte association avec la survie en valeur continue ont été retenues pour la construction d'un index lymphocytaire (IL) soient : CD4+ T, CD8+ PT et le ratio CD3+ T/PT.

Les variables dichotomisées ont été utilisées pour construire cet index soient : CD4+ T^{hi}, CD8+ PT^{lo} et CD3+ T/PT^{hi}. Ces valeurs sont considérées comme un facteur favorablement associé à la survie et donnent donc chacune un point lors de la construction de l'index.

L'index varie entre 0 (aucun facteur favorable) et 3 (trois facteurs favorables). Pour permettre l'analyse, nous avons retenu trois valeurs pour l'IL :

- triple négatif (---) : aucun facteur favorable présent,
- triple positif (+++) : les trois facteurs favorables présents,
- intermédiaire (+/-) : un ou deux facteurs favorables présents.

L'IL était déterminant sur les survies globales et sans récurrence lors de l'analyse par la méthode de Kaplan-Meier (Tableau XIII p. 45). Le taux de survie globale médian était respectivement de 13,6 mois, 19,4 mois et de 29,1 mois pour les patients IL---, IL+/- et IL+++ (p = 0,01) (Figure 12 p. 46). Les résultats étaient similaires pour la survie sans récurrence.

De plus, pour les patients classés N1, l'IL était déterminant de façon significative pour la survie globale avec des médianes de 12,5 mois, 17,4 mois et 31,7 mois respectivement pour les patients N1 avec un IL ---, IL +/- et un IL +++ (p=0,011) (Figure 13 p. 47). Nous obtenons des survies similaires pour les groupes N1 +++ vs N0 (29, 3 mois) (Tableau XIV p. 45).

La survie médiane était augmentée significativement chez ayant reçu des traitements adjuvants. En analyse de sous-groupe, l'ajout de traitements adjuvants était associé à une survie globale augmentée seulement dans le groupe IL +/- . Dans ce groupe, les patients n'ayant pas reçu de traitement adjuvant avait une survie médiane de 13,1 mois vs 26,4 mois pour ceux en ayant reçues (tableau XV p. 45 et Figure 14 p. 48).

Tableau XIII – Index Lymphocytaire et survie

| Index Lymphocytaire | n | Survie médiane (mois) | p | SSR (mois) | p |
|---------------------|----|-----------------------|------|------------|------|
| +++ | 23 | 29,1 | 0,01 | 29,1 | 0,02 |
| +/- | 59 | 19,4 | | 18,8 | |
| --- | 23 | 13,6 | | 11,2 | |

SSR : Survie sans récurrence

Tableau XIV – Index Lymphocytaire et survie avec stratification des patients N1

| Index Lymphocytaire | N | n | Survie médiane (mois) | p |
|---------------------|----|----|-----------------------|-------|
| non-spécifié | N0 | 29 | 29,3 | 0,003 |
| +++ | N1 | 19 | 31,7 | 0,011 |
| +/- | N1 | 40 | 17,4 | |
| --- | N1 | 17 | 12,5 | |

Tableau XV – Interaction entre Index Lymphocytaire et les traitements adjuvants

| Index Lymphocytaire | Traitement Adjuvant | n | Survie médiane (mois) | p |
|---------------------|---------------------|----|-----------------------|-------|
| --- | - | 8 | 8,2 | 0,235 |
| --- | + | 13 | 14,7 | |
| +/- | - | 22 | 13,1 | 0,024 |
| +/- | + | 32 | 26,4 | |
| +++ | - | 6 | 18,3 | 0,098 |
| +++ | + | 15 | 31,7 | |

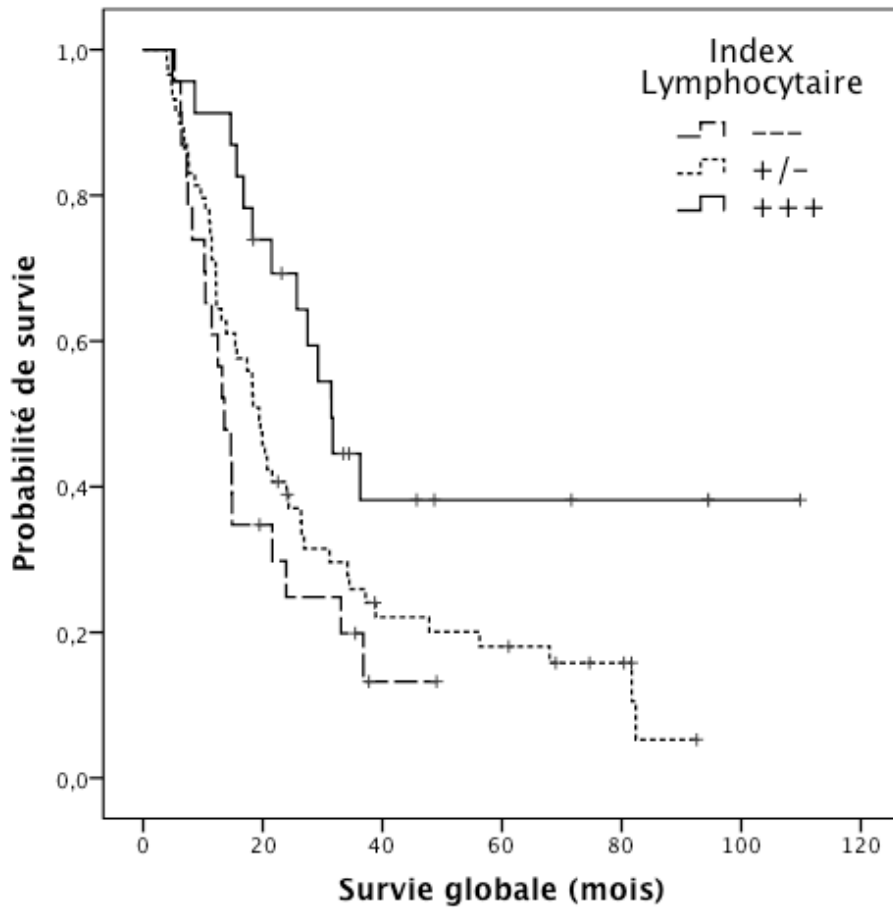


Figure 12 - Courbes de survie selon l'Index Lymphocytaire.

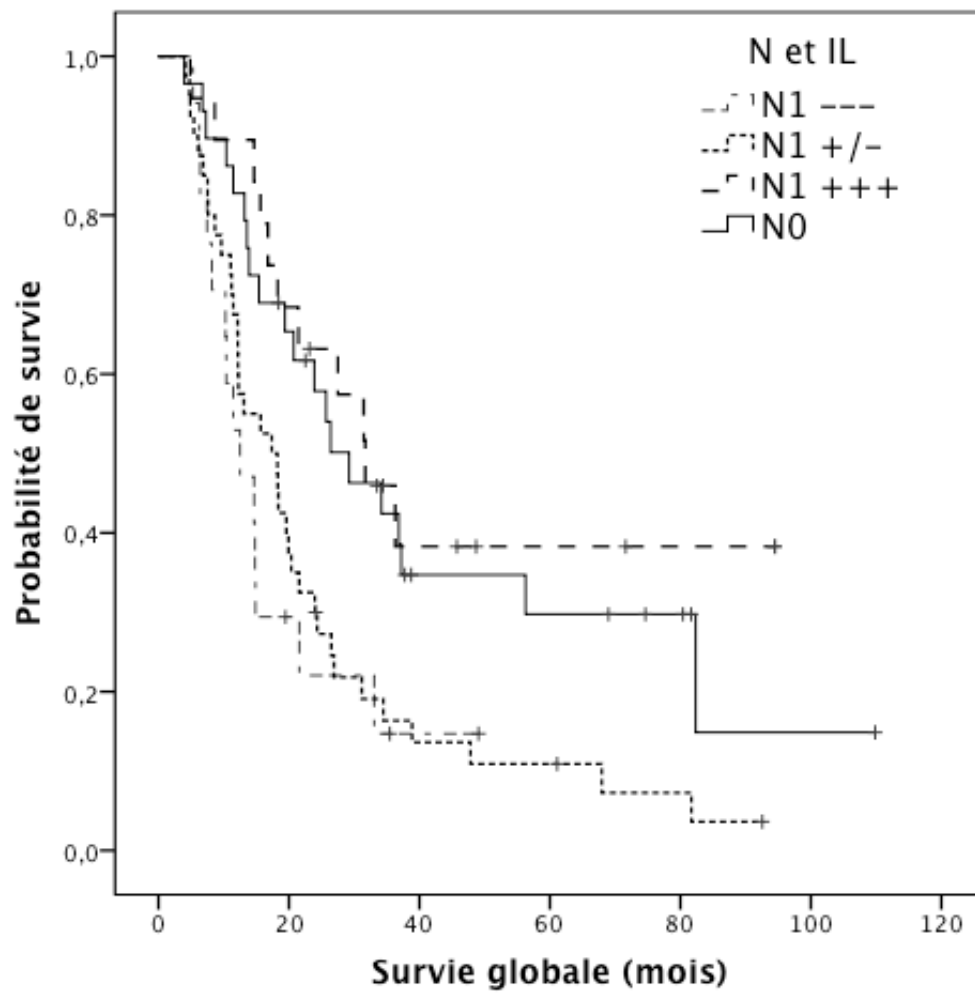


Figure 13 - Courbes de survie selon le statut N et l'Index Lymphocytaire

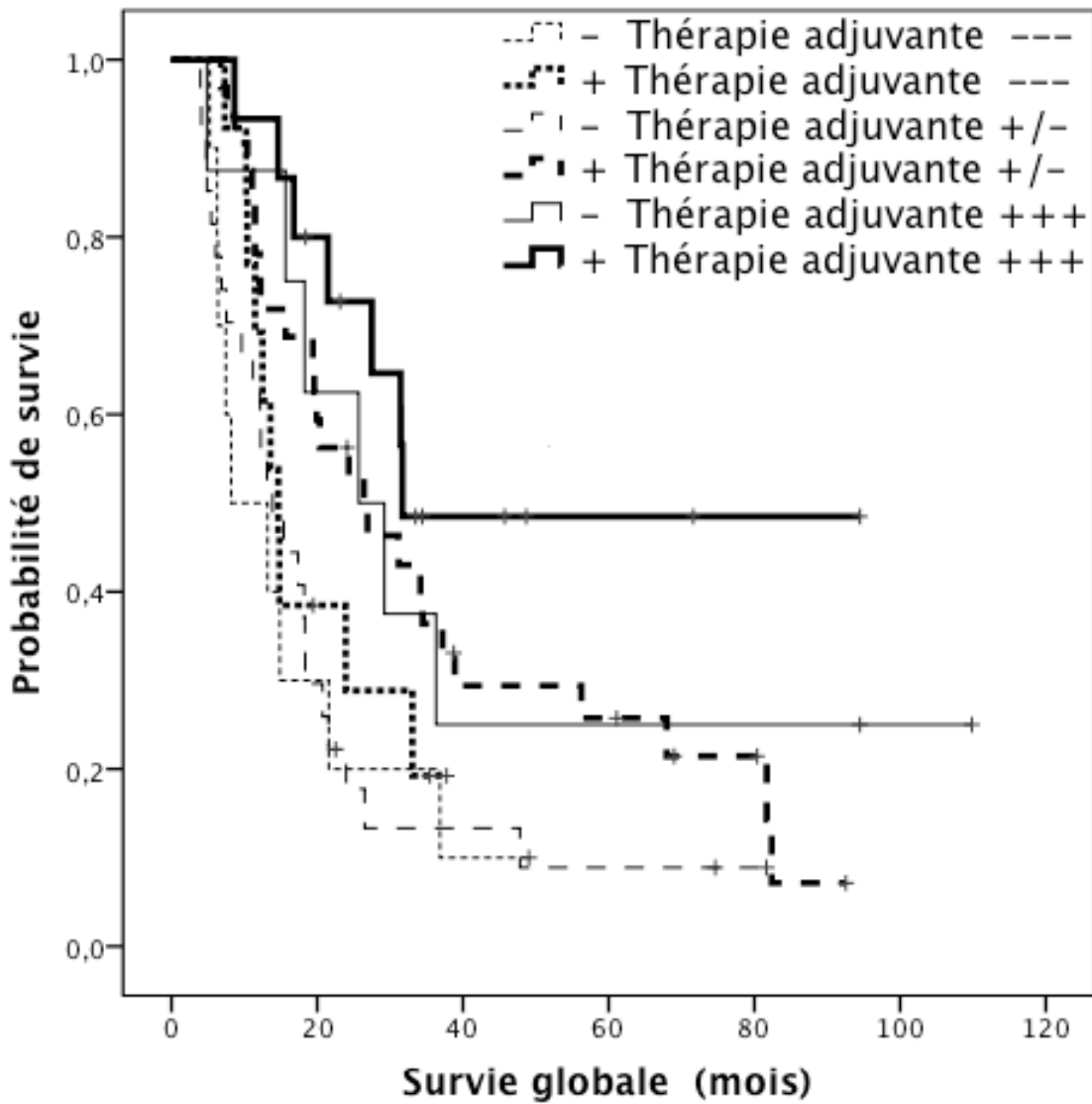


Figure 14 - Courbes de survies selon l'Index Lymphocytaire et la réception (+, courbes en gras) ou non (-) de traitements adjuvants. Le bénéfice de survie associée à la réception de traitements adjuvants était significatif pour le sous-groupe IL intermédiaire (IL +/-). Les patients IL +/- ayant reçu un traitement adjuvant (+) ont une survie 26,4 mois vs 13,1 mois pour ceux n'en ayant pas reçu (-) ($p = 0,024$).

Analyse multivariée

Les variables pathologiques et cliniques significatives en analyse univariée (degré de différenciation tumorale, présence de métastases ganglionnaires, reconstruction veineuse, traitements adjuvants, CA 19-9 ainsi que l'IL, ont été inclus dans le modèle multivarié de régression de Cox. Les variables ont également été contrôlées pour l'âge et le statut des marges chirurgicales.

En analyse multivariée, le degré de différenciation, la résection et la reconstruction veineuse, l'utilisation de traitements adjuvants, le CA 19-9 et l'Index Lymphocytaire demeuraient significatifs (Tableau XVI p. 49).

Tableau XVI - Analyse multivariée – régression de Cox

| Facteur | RR | p | IC limite inférieure | IC limite supérieure |
|--------------------------------------|-------|---------|----------------------|----------------------|
| Différenciation, bien/modérée ou peu | 2,72 | 0,003 | 1,406 | 5,271 |
| N, N0/N1 | 1,18 | 0,649 | 0,587 | 2,349 |
| Reconstruction veineuse, oui/non | 2,26 | 0,036 | 1,054 | 4,826 |
| Tx Adjuvant, oui/non | 0,324 | <0,0005 | 0,177 | 0,593 |
| Marges, R0 / R1 | 0,703 | 0,381 | 0,320 | 1,545 |
| Âge, ≤ 63 / > 63 ans | 0,748 | 0,280 | 0,441 | 1,267 |
| CA 19-9 (U / mL), ≤ 200 / > 200 | 2,212 | 0,008 | 1,232 | 3,972 |
| Index Lymphocytaire | 0,575 | 0,011 | 0,375 | 0,881 |

(---, +/-, +++)

RR : risque relatif, IC : intervalle de confiance, Tx : traitement

Discussion, perspectives et conclusions

Le pronostic de la majorité des patients atteints d'un cancer du pancréas demeure sombre. La résection chirurgicale, seul traitement à visée curative, offre l'espoir d'une survie médiane de près de 20 mois (2,3,12). Dans ce contexte, définir le pronostic d'un patient est un élément important de la prise en charge. Un des objectifs du système de classification TNM est justement de stratifier les patients en groupes homogènes par rapport à la survie. Ce but n'est que partiellement atteint dans le cancer du pancréas puisque 75% des patients se retrouvent dans un même stade, ce qui limite d'autant son utilité comme outil pronostique. L'ajout de biomarqueurs associés à la survie pourrait permettre de préciser et d'individualiser l'estimé de l'espérance de vie des patients. De plus, l'étude de tels biomarqueurs pourrait offrir une meilleure compréhension des mécanismes limitant la croissance des cellules tumorales et ouvrir la porte à de nouveaux traitements. L'étude des interactions entre les cellules responsables de la réponse immunitaire adaptative offre un tel potentiel. En effet, les études réalisées dans le cancer colorectal sur l'infiltrat lymphocytaire ont établi des associations entre la composition de cet infiltrat et la survie des patients (3,12,18,26,42-45,52,70,71).

L'objectif de ce projet de maîtrise était de transposer ces études chez les patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas et d'évaluer la valeur pronostique des lymphocytes T infiltrant la tumeur. Notre étude est la première à quantifier l'association entre la survie des patients et les densités tumorale et péri-tumorale des lymphocytes T CD3+, CD4+, CD8+ CD45RO+ et FOXP3+.

Nos résultats démontrent que les densités intratumorale et péri-tumorale des sous populations de lymphocytes T sont faiblement associées à la survie et à la récurrence des cancers lorsqu'elles sont considérées individuellement. Un infiltrat lymphocytaire plus dense en intratumoral qu'en péri-tumoral possède cependant une plus grande signification pronostique. En combinant ce différentiel lymphocytaire T (CD3+) entre les tumeurs et le pancréas adjacent avec les sous-types de lymphocytes T les plus étroitement associées au pronostic des patients (CD4+ intratumoraux et CD8+ péri-tumoraux), un index lymphocytaire (IL) a pu être conçu. Grâce à

cet index lymphocytaire, nous avons pu établir le pronostic de survie (globale et sans récurrence) les patients de façon indépendante des caractéristiques clinicopathologiques, notamment de l'atteinte métastatique ganglionnaire. En effet, chez les patients N1, un index lymphocytaire favorable (+++) était associé à une survie médiane sans récurrence de 31,7 mois alors qu'elle était de 12,5 mois pour les patients ayant un index défavorable ($p=0,011$) (tableau XIV p. 45). De plus, la survie des patients ayant un IL +++ et un statut N1 avait une survie similaire à ceux N0 (29,3 mois).

En résumé, cette étude démontre que la densité et le type de lymphocytes T infiltrant l'adénocarcinome du pancréas pourraient servir de biomarqueur pronostique pour les patients opérés. De plus, l'infiltrat lymphocytaire complète le système TNM tout en préservant son indépendance en éliminant une partie de son hétérogénéité. Nos résultats soulignent l'importance de comparer les compartiments intratumoraux et péri-tumoraux dans ce type d'étude. L'avantage de survie associée à une différence de densité lymphocytaire en faveur du compartiment tumorale, ou gradient lymphocytaire, pourrait être un nouveau paradigme applicable à d'autres types de tumeurs. Enfin, bien que la plupart des patients reçoivent des traitements adjuvants, seule une minorité semblent en tirer un bénéfice. L'identification de ces patients permettrait d'individualiser les traitements adjuvants. L'IL pourrait faire l'objet d'études prospectives qui testeraient sa valeur prédictive de réponse à la chimiothérapie. La discussion abordera ces points après une analyse critique des aspects techniques du projet.

Analyse des données cliniques et pathologiques

Nous avons inclus tous les patients opérés pour un adénocarcinome du pancréas entre 2000 et 2008 avec suffisamment de tissu et non-décédé de complications post-opératoires. Nos patients présentèrent un taux de survie à 5 ans de 20,5% et une survie médiane de 20,7 mois, ce qui est comparable à d'autres séries de la littérature (3,5,12). Notre taux de morbidité (incluant toutes les complications) de 55% était lui aussi semblable à ceux rapportés dans les séries provenant de John Hopkins, de la clinique Mayo ou de celles d'une revue de la littérature récente (3-6,67,72).

Plusieurs facteurs sont reconnus pour influencer la survie, plus particulièrement le statut des marges chirurgicales et le recours à des résections veineuses. Contrairement à certaines séries, nous n'avons pas retrouvé d'association entre le statut des marges chirurgicales et la survie (3,12,71). Cependant, d'autres auteurs ne retrouvent pas cette différence entre les marges R1 vs R0 mais seulement entre les marges R2 vs R0 (5,71). Notre petit nombre de marges R1 ainsi que l'absence de marges R2 ont pu contribuer à ce que nous ne retrouvions pas d'avantage de survie lié au statut des marges. En ce qui concerne les résections veineuses suivies de reconstruction, elles sont négativement associées à la survie dans la littérature (12,71,73). Dans leurs séries respectives, ces auteurs obtenaient des survies médianes entre 14 et 16,5 vs 20,1 et 29 mois favorisant les patients sans résection veineuse. Nous avons obtenu des résultats similaires avec des survies médianes de 11,5 et 23,9 mois pour les patients avec et sans résection de veine respectivement ($p=0,023$). La résection veineuse demeure toutefois le seul traitement à visée curative en présence d'une lésion accolée à la confluence porto-mésentérique. La valeur de CA 19-9 élevée (> 200 U / mL) était associée à une diminution de survie (14,7 vs 26,9 mois) ($p = 0,014$). Dans la littérature, cette valeur est parfois un marqueur de mortalité précoce mais ne semble pas clairement associée à la survie (5,12,71). Une équipe japonaise a démontré que la valeur de CA 19-9 en postopératoire était plus significative peu importe le seuil sélectionné (8,73). L'utilisation d'un seuil unique de CA 19-9 en préopératoire comme valeur pronostique ne semble pas envisageable à l'heure actuelle.

Plusieurs facteurs histopathologiques sont associés à une meilleure survie comme entre autre une tumeur bien différenciée et l'absence de métastase ganglionnaire. Jamieson *et al* rapportaient des différences significatives de survie médiane entre les tumeurs de « bas grade » à celles de « haut grade », soit 21,8 vs 15,4 mois ($p=0,041$) (3,8,12). De même, les patients avec une tumeur bien différenciée avaient une survie médiane de 35,3 mois vs 14,8 et 12,5 mois pour celles modérément et pauvrement différenciée ($p=0,002$ et $p=0,004$ respectivement) dans la cohorte de Lim (8). Notre analyse est en accord avec ces résultats avec une survie médiane de 36,3 et 15,4 mois ($p<0,0005$) pour les patients ayant des tumeurs bien différenciées et celles modérément ou pauvrement différenciées.

Des différences de survies significatives selon le statut ganglionnaire ont aussi été notées par plusieurs. Ces différences variaient de façon significative entre 19,9 à 27,2 mois et 15 à 19,6 mois en faveur des patients N0 selon les séries (3,8,12). Notre cohorte supportât la même association avec une survie médiane de 29,2 mois et 18,2 mois respectivement pour les patients N0 et N1 ($p=0,029$) en analyse univariée. Par contre, cette association n'était plus significative lors de l'analyse multivariée ($p=0,07$). Notre série comptait 80 patients (72%) avec des métastases ganglionnaires, taux similaire à ce qui est rapporté dans la littérature (5,7,8,12,69,73). Cette proportion élevée de patients avec le même stade du fait de leur statut N1, rend la présence de métastase ganglionnaire moins intéressante comme valeur pronostique. Cependant, tel que suggéré par Lim, le nombre de ganglions atteints pourrait être plus discriminant (8,10,74). Cet auteur rapporte une différence de survie entre N0 et N1 à la limite d'être significative (survie médiane de 19,9 vs 15,5 mois, $p=0,05$) tandis qu'en comparant les patients ayant 0 vs 4 et plus ganglions positifs, il obtient des survies médiane de 19,9 mois vs 10,5 mois ($p=0,003$). D'ailleurs, nous avons retrouvé aussi cette association négative entre le nombre de ganglions atteints et la survie. Les patients avec une atteinte de quatre ganglions et plus avaient une survie médiane diminuée à 12,1 mois alors qu'elle était de 24,0 et 29,2 mois respectivement pour 1-3 ganglions positifs et aucun ganglion métastatique ($p<0,0005$) (figure 11, p. 40).

Enfin, nos patients ont reçu des traitements adjuvants dans 60,4% des cas. Des taux de traitements adjuvants de 50% à 70% sont rapportés dans des études populationnelles (8,10,12,74). L'utilisation de traitements adjuvants dans notre cohorte était significativement associée à une meilleure survie (survie médiane de 27,5 mois vs 14,9 mois, $p=0,003$), associations également rapportées par d'autres (8,12,45).

En conclusion, l'analyse des données cliniques et pathologiques de cette série révèle des résultats en accord avec ceux rapportés par d'autres équipes. Ces résultats valident la sélection de nos patients pour cette étude.

Micromatrices et immunohistochimie : validité de la méthode

Afin de faciliter l'analyse d'une quantité relativement grande de spécimens traités avec plusieurs marqueurs, nous avons choisi d'utiliser des micromatrices, permettant de plus d'homogénéiser les réactions immunohistochimiques (45,75). Un inconvénient potentiel de cette technique est, cependant, l'erreur d'échantillonnage. Des critères ont été développés pour palier à cette possibilité. En effet, il a été démontré que deux biopsies cylindriques de 0,6 mm de diamètre sont suffisantes pour atteindre un taux de concordance de 95% entre des analyses immunohistochimiques réalisées sur des lames entières en comparaison à des micromatrices (45,75) et ce, même si ces deux biopsies prises à partir d'un spécimen d'un 1 cm³ ne correspondent qu'à seulement 0,6% volume tissulaire (volume qui était jugé auparavant représentatif). Cette précision de 95% est suffisamment robuste pour permettre l'étude d'association dans une population. Notons également que dans cette étude, les biopsies devaient contenir un minimum de 10% de tissu tumoral alors que nous avons fixé le minimum à 25%. Nous avons choisi d'utiliser des biopsies de 1 mm de diamètre afin de rencontrer ces critères. Une telle biopsie représentait 0,83% du volume tissulaire, supérieur donc au 0,6% recommandé.

Pour s'assurer d'obtenir ce minimum de tissu en cas de pertes de matériel d'une biopsie lors des manipulations, nous avons décidé de prendre trois échantillons en zone tumorale et quatre en zone péritumorale définie comme le tissu adjacent à la région tumorale, se situant entre 2 et 10 mm de cette dernière. En effet, parmi les difficultés inhérentes à la création d'une micromatrice, nous avons noté que les spécimens très fermes donnaient des biopsies qui se coupaient difficilement pour la préparation des lames. La forte réaction desmoplasique typiquement associée au cancer du pancréas pourrait avoir contribué à ce problème technique. Pour maximiser le nombre de cas disponibles pour les analyses de survie et s'assurer d'une puissance suffisante, nous avons créé une 8^e micromatrice à partir de nouveaux blocs pour les cas qui n'étaient pas quantifiables à l'analyse des 7 premières micromatrices initialement conçues. Le nombre de cas ainsi disponibles pour l'analyse variait entre 108 et 111 (sur une

possibilité de 111) selon les marqueurs et la zone, ce qui est similaire à ce que rapporte Noshio *et al* (45,63).

Par ailleurs, pour minimiser le risque d'erreur d'échantillonnage associé à l'hétérogénéité des tumeurs, nous avons utilisés les critères suivants. Premièrement, les zones de biopsies étaient sélectionnées à faible grossissement, ce qui rendait l'infiltrat lymphocytaire difficilement perceptible. Deuxièmement, les sélections des zones de biopsies étaient réalisées par un pathologiste à l'insu des données cliniques. Ainsi, si malgré ces précautions, une densité lymphocytaire n'était pas représentative de la tumeur, elle devrait être non-différentielle, c'est-à-dire sans lien avec la survie ou les autres variables clinicopathologiques puisqu'il y avait autant de chance statistique de faire des sur-estimations que des sous-estimations (45,52,63). Enfin, pour les cas où une seule biopsie était exploitable par zone, une analyse de survie entre les patients ayant une seule biopsie disponible et ceux en ayant deux ou plus a été préalablement faite. Cette analyse n'a pas montré de différence significative entre les 2 groupes, nous permettant de ne pas exclure de patient (analyse statistique non-présentée).

Validité des décomptes lymphocytaires

Nous avons choisi d'utiliser les types de lymphocytes T infiltrant CD3+, CD4+, CD8+, CD45RO+ et FoxP3+, des types pour lesquels une valeur pronostique avaient été suggérée dans le cancer du pancréas et d'autres types de cancers, notamment le cancer colorectal.

Afin d'accélérer le processus de décompte lymphocytaire, nous l'avons automatisé pour les marqueurs CD3 et CD8 en créant un algorithme de reconnaissance de cellules marquées sur le logiciel de quantification de Visiopharm Histoinformatics Software. Nous avons vérifié la fiabilité du décompte en comparant avec un décompte manuel. Nous avons atteint un haut taux de corrélation pour ces deux marqueurs ($R^2=0,98$ et $0,808$ respectivement, $p<0.05$). Pour les marqueurs CD4, CD45RO et FoxP3, un taux de corrélation suffisamment élevé n'a pu être atteint entre les décomptes manuels et automatiques. Le marquage non-spécifique du

parenchyme pancréatique normal rendait sous-optimale la distinction des lymphocytes marqués à l'aide d'un algorithme principalement basé sur la reconnaissance de couleur des pixels. Seul le décompte manuel a donc été utilisé, réalisé par l'auteur du mémoire.

Les résultats obtenus par notre approche étaient exprimés sous forme de densité selon le sous type de lymphocytes et la localisation (tumorale ou péri-tumorale). Les densités de lymphocytes obtenues étaient difficilement comparables à celles rapportées dans la littérature pour le cancer du pancréas parce que la localisation et/ou l'expression des densités pour chaque lymphocyte ne sont pas clairement définies et/ou exprimées de la même manière. Nous avons donc procédé à des comparaisons de nos résultats avec ceux des études sur le cancer colorectal ayant la méthodologie était la plus rigoureuse. Dans ces études, les cellules CD3+, CD4+, CD8+ et CD45RO+ avaient des densités de quelques centaines de cellules par mm², ce qui est similaire à nos résultats. Les densités des lymphocytes FOXP3+ furent inférieures d'un ordre de grandeur, un rapport que nous avons également observé (45,52). De plus, nos distributions de densités eurent également des profils similaires à celles de Nosho (42,43,45). En effet, toutes nos distributions étaient asymétriques vers la droite, c'est-à-dire que les valeurs moyennes étaient plus grandes que les valeurs médianes. Les densités des régions tumorales et péri-tumorales semblent également comparables à ce que l'on retrouve dans d'autres études. En effet, comme dans les études de Pages *et al*, nous avons obtenu des densités dans les deux régions qui furent du même ordre de grandeur pour les lymphocytes CD3+, CD8+ et CD45RO+ (42,43).

Valeur pronostique des densités de lymphocytes T tumoraux et péri-tumoraux

Dans ce travail, nous avons observé qu'un infiltrat plus dense de lymphocytes T CD4+ intratumoraux (T) étaient associé à une meilleure survie, alors qu'un infiltrat plus dense de lymphocytes T CD8+ péri-tumoraux (PT) était associé à une moins bonne survie. Puisque certains patients avaient des tumeurs riches en lymphocytes mais peu de lymphocytes dans le

tissu péri-tumoral, nous avons évalué la valeur pronostique des décomptes relatifs de lymphocytes (tableau XI p. 42). Un ratio élevé de CD3+ T sur CD3+ PT et de CD8+ T sur CD8+ PT étaient tous deux associés à une meilleure survie. Lors de la création de l'index lymphocytaire, nous avons décidé d'utiliser la médiane pour obtenir des variables catégorielles, reprenant ainsi la méthode utilisée dans d'autres études (9-11,46,52,55). D'autres auteurs proposent de dichotomiser les décomptes en se basant sur la valeur qui donne la meilleure association statistique avec la variable pronostique choisie (« optimal cut-off point »). Sur un nombre d'échantillons relativement petit comme le nôtre, cette technique risque d'entraîner un ajustement des données biaisé par la population étudiée, ce qui compromet ensuite la validation des résultats sur d'autres cohortes de patients (76). L'utilisation des valeurs médianes nous semblait être la manière la moins biaisée, sur une cohorte de moins de 200 échantillons, pour étudier un phénomène biologique.

Ces attributs immunitaires ont pu être combinés dans un index (CD4+ T^{hi}, CD8+ PT^{lo} et CD3+ T/PT >1) dont la capacité à discriminer les patients avec les plus longues survies globale et sans récurrence était supérieure à chacune des composantes du score prises séparément (Tableaux XII et XIII, p. 43 et p. 45). Cette association demeura significative en analyse multivariée en contrôlant pour les facteurs pronostiques clinicopathologiques (tableau XVI p. 49). Ainsi, cet Index Lymphocytaire permet d'identifier chez les patients atteints de métastases ganglionnaires un sous-groupe dont la survie était similaire aux patients sans atteinte ganglionnaire. Un score immunitaire ainsi conçu semble porteur dans sa capacité à identifier les patients dont la survie n'est pas estimée avec précision par le système TNM.

La validité de cette association pose l'hypothèse suivante : la présence de plus d'un type de lymphocytes T infiltrant et interagissant au sein de la tumeur plutôt qu'en périphérie semble nécessaire pour « contenir » la tumeur. De plus, puisqu'un index lymphocytaire favorable semblait contrebalancer l'effet négatif de la présence de métastase ganglionnaire, la réponse immunitaire adaptative pourrait contribuer à freiner la croissance de la tumeur même lorsque la tumeur a commencé à se disséminer. Alternativement, comme il sera discuté dans la section « perspectives et conclusions », un score immunitaire favorable pourrait aussi être associé à une plus grande efficacité des thérapies adjuvantes.

Comparaisons avec les études précédentes

Comme nous l'avons précédemment décrit, les densités que nous avons obtenues ne peuvent être directement comparées avec les décomptes rapportés par Hiraoka et Fukunaga car les densités avaient été exprimées respectivement en nombre de cellules par champs et par proportion (48,69). Dans l'étude de Fukunaga, portant sur 80 patients atteints d'un adénocarcinome du pancréas, un nombre élevé de CD8+ intratumoraux était associé à une meilleure survie lors de l'analyse univariée, ce qui n'était pas retrouvé avec les CD4+ intratumoraux. Par contre, la combinaison CD4+ élevé et CD8+ élevé était significativement associée à une meilleure survie lors de l'analyse multivariée. Dans notre étude, une densité faible de CD8+ PT^{lo} était associée à une meilleure survie ($p=0,047$) ainsi qu'une densité élevée de CD4+ T^{hi} ($p=0,016$). Cette étude de Fukunaga comporte quelques faiblesses pour permettre une comparaison. En effet, ils ont utilisé cinq champs à fort grossissement comptant le plus grand nombre de cellules lors de la quantification. Les cellules ont été comptées dans les « nids de cellules cancéreuses » et dans le stroma, sans plus de détails sur les paramètres de sélection. Il persiste donc une ambivalence au sujet des zones de décompte. Celle-ci rend difficile la comparaison des densités avec celles de notre étude pour laquelle deux zones, tumorales et péri-tumorales, ont été clairement définies.

Dans l'étude d'Hiraoka, portant sur une cohorte de 198 patients ayant eu une résection pour un adénocarcinome du pancréas, le nombre croissant de lymphocytes T régulateurs (FOXP3+) était associé à un mauvais pronostic (48). Nous n'avons pas reproduit ces résultats dans notre étude où la densité de FOXP3+ n'était pas associée à la survie. Dans leur étude, Hiraoka *et al* avaient choisi d'exprimer la prévalence des FOXP3+ en terme du pourcentage des cellules CD4+. Le pourcentage moyen était de 34,6%. En comparaison, dans notre étude, le pourcentage de FOXP3+ par rapport aux CD4+ était de 18% dans la région tumorale et de 8% dans la région péri-tumorale. Plusieurs études sur la densité des lymphocytes FOXP3+ ont été réalisées dans le cancer de l'ovaire (17,47,54). Dans une étude, il est rapporté que les cellules T_R, qui correspondent aux lymphocytes FOXP3+, composent en moyenne 23% (déviations standard de 11%) des CD4+ infiltrant la tumeur (47). Cet intervalle recouvre les estimés de

l'étude d'Hiraoka de même que le nôtre. Dans notre série, l'importance de la surface utilisée pour le décompte et la faible densité des cellules FOXP3+ (qui a facilité le décompte manuel) devrait en théorie fournir un échantillonnage plus fiable. Alors qu'il est à noter que dans l'étude d'Hiraoka, le décompte lymphocytaire a été effectué dans trois champs de 400x et plus, sans qu'il ne soit spécifié comment ces champs ont été sélectionnés. Ces différences montrent que la possibilité de généraliser les résultats pour FOXP3 paraît difficile étant donné que la faible densité des cellules l'exprimant est plus susceptible de varier selon la technique d'échantillonnage. Il semble donc que, comme cela est le cas pour d'autres types de tumeurs, la valeur pronostique des cellules FOXP3 demeure à être plus clairement établie dans le cancer du pancréas (70,77).

Perspectives et conclusions

L'index lymphocytaire comme score immunitaire

L'intérêt d'un score immunitaire est d'abord d'être un facteur pronostique comme nous l'avons démontré. Mais, également, ce score peut suggérer des cibles potentielles pour de nouvelles thérapies (70). Un groupe d'expert a établi des critères avec lesquels nous devrions juger les scores immunitaires. Les spécimens doivent être facilement évaluable par des techniques standardisées et de manière précise par un pathologiste. Les techniques immunohistochimiques doivent pouvoir être automatisées. Le marquage doit permettre une digitalisation et un décompte automatique et comprendre au moins deux marqueurs spécifiques. Les procédures doivent être facilement reproductibles par d'autres groupes à des fins de comparaison. Le score immunitaire doit être significatif dans une analyse multivariée selon un modèle de Cox qui inclut la classification TNM. L'index lymphocytaire que nous proposons répond déjà à plusieurs de ces critères. De plus, deux des marqueurs composants cet index, CD8 et CD3, sont reconnus comme spécifiques et se prêtent bien à une quantification standardisée. Par contre, l'optimisation des réactions immunohistochimiques du CD4 reste à développer pour permettre une meilleure reproductibilité. Tout ceci devrait permettre de rendre cet index plus robuste.

Gradient lymphocytaire tumoral sur péri-tumoral

Le gradient lymphocytaire tumoral sur péri-tumoral est-il un nouveau paradigme qui mérite une investigation plus approfondie ?

En étudiant de façon formelle la zone péri-tumorale, nous avons établi qu'une forte densité de CD8+ PT était associée à une moins bonne survie (tableau XI, p.42). Étant donné que notre étude est essentiellement associative, il est difficile à ce point d'avancer une explication biologique de ces résultats. Plus important que la valeur absolue des décomptes de

lymphocytes T dans les zones tumorale ou péri-tumorale, un gradient favorable à une plus grande infiltration tumorale est associé à une meilleure survie, et ce, pour l'ensemble des lymphocytes T testés. On retrouve dans la littérature quelques études dans le cancer du pancréas qui ont noté cette différence de distribution des lymphocytes et évalué divers facteurs pouvant l'expliquer. Le lien entre la distribution des lymphocytes et la survie n'a toutefois pas été spécifiquement étudié. Quelques études portant sur d'autres cancers ont comparé la distribution dans des compartiments tumoraux et péri-tumoraux. Prise ensemble, ces études laissent présager que la notion de gradient mérite d'être investiguée.

Le cancer du pancréas est associé à une forte réaction desmoplasique. L'abondance des tissus fibreux pourrait influencer la distribution et l'interaction entre les lymphocytes et la tumeur. Il a été noté que bien que les CD8+ soient parmi les lymphocytes les plus nombreux, ils étaient surtout localisés dans le tissu interstitiel, à distance des cellules épithéliales. Cette distance permettrait aux cellules épithéliales d'éviter le contact et donc l'élimination par les CD8+ (78). Cette hypothèse est supportée par d'autres travaux qui ont démontré que les lymphocytes T se trouvaient en majorité dans les tissus péri-tumoraux, alors que seulement 4 spécimens sur 33 en contenaient un nombre suffisant pour entrer en contact avec les cellules tumorales. La réaction desmoplasique « emprisonnerait » en quelque sorte les lymphocytes (79). Comme dans les études précédentes, il a été remarqué que les densités des lymphocytes T étaient plus grandes en périphérie de la tumeur plutôt qu'au sein de la tumeur, pour les CD3+, CD4+ et CD8+ (80). La densité des lymphocytes T infiltrant la tumeur était plus élevée lorsque les cellules tumorales avaient préservées l'expression du HLA-I. La densité était alors associée avec une survie augmentée qui n'était toutefois pas significative. D'autres auteurs ont noté cette hétérogénéité dans la distribution des lymphocytes mais ont plutôt comparé le nombre des lymphocytes T_{H2} vs T_{H1} . Un ratio T_{H2} sur T_{H1} bas était associé à une meilleure survie (33,81).

Cette différence de distribution est aussi notée dans d'autres types de cancers. Une étude rétrospective de 206 patients ayant subi une greffe hépatique pour un hépatocarcinome a exploré la relation entre la survie sans récurrence des patients et les densités des lymphocytes T CD45RO+ (mémoires) et lymphocytes T CD57+ (« Natural Killer ») dans les compartiments

intratumoraux et péri-tumoraux (57). Les auteurs ont également étudié les marqueurs CD3+, CD8+ et FOXP3+. La région péri-tumorale était définie comme dans notre étude : tissu non-cancéreux à la marge des cellules néoplasiques. Les densités étaient dichotomisées par rapport à la médiane. Les lymphocytes CD45RO+ élevés étaient le seul sous-type en intratumoral associé significativement à une meilleure survie sans récurrence lors de l'analyse univariée (HR=0,59 p=0,011). La relation s'inversait pour les CD45RO+ en PT (HR=1,4 p=0,107). Les auteurs n'ont cependant pas évalué le ratio CD45RO+ T/PT. Ces données vont dans le sens qu'un gradient de CD45RO+ T plus grand qu'en PT, soit favorable à une survie sans récurrence. Une autre étude a analysé la distribution des lymphocytes T dans les compartiments tumoraux et péri-tumoraux de 1270 spécimens de cancer de sein mais les auteurs se sont limités aux cellules avec FOXP3+ et CD8+ (82). Dans cette étude, une forte densité en intratumorale de lymphocytes FOXP3+ était associée à une moins bonne survie (p<0,0001). Ils ont également noté que la relation entre la densité des FOXP3+ et la survie s'inversait en péri-tumoral. La densité élevée en intratumoral demeurait significative lors de l'analyse multivariée. Toutefois, là encore, les auteurs n'ont pas évalué les ratios FOXP3+ T/PT.

La différence de distribution semble être le reflet des obstacles auxquels se butent les lymphocytes T effecteurs pour éliminer ou contenir la tumeur. Il est donc plausible que la distribution ait une valeur pronostique. L'utilisation d'un gradient T/PT semble plus pertinente pour évaluer le rôle pronostique de l'infiltrat lymphocytaire mais l'on constate que les données disponibles dans la littérature que ce soit pour le cancer du pancréas ou pour d'autres cancers soient limitées. Il est d'autant plus pertinent de faire connaître nos résultats rapidement afin que ce paradigme puisse être vérifié dans d'autres types de cancer.

L'index lymphocytaire comme facteur prédictif

L'index lymphocytaire pourrait-il être un facteur prédictif de réponse aux traitements adjuvants ?

L'influence que pourrait avoir la chimiothérapie sur la relation entre le système immunitaire et le cancer est un domaine de recherche en pleine expansion, plus particulièrement dans le cancer du sein et du mélanome (77). L'infiltrat lymphocytaire, en plus d'être un facteur pronostique, pourrait représenter un moyen pour comprendre comment la chimiothérapie exerce ses effets cytotoxiques sur les cellules néoplasiques. La composition de l'infiltrat lymphocytaire pourrait ainsi guider la réponse à la chimiothérapie. Une étude réalisée sur un modèle animal montre que la chimiothérapie peut agir via les lymphocytes T. Cette étude a été réalisée sur des souris immunocompétentes inoculées avec des cellules pancréatiques néoplasiques (83). En se basant sur le fait que le thiazolidinedione pourrait potentialiser la gemcitabine, Bunt *et al* ont étudié l'effet de l'ajout du Rosiglitazone à la gemcitabine sur la survie et le système immunitaire de ces souris. Les chercheurs ont noté qu'en plus d'avoir une survie augmentée suite au traitement combiné, les souris présentaient un infiltrat lymphocytaire tumoral dont les densités de CD4+ et CD8+ étaient plus grandes. Les auteurs ont soulevé l'hypothèse que la chimiothérapie altérerait la composition de l'infiltrat lymphocytaire vers un profil plus effecteur, plus cytotoxique. Il serait intéressant d'évaluer si une telle relation existe chez l'homme puisque la majorité des patients opérés pour un cancer du pancréas reçoivent des traitements adjuvants qui sont pour plusieurs à base de gemcitabine. Quelques études suggèrent dans d'autres cancers que l'infiltrat lymphocytaire pourrait être un facteur prédictif de réponse aux traitements adjuvants comme, par exemple, les lymphocytes T CD3+ dans le cancer l'ovaire. Leur présence dans la tumeur est associée à une meilleure survie chez des patients ayant reçu des traitements adjuvants (56). D'autres groupes ont rapporté des résultats similaires dans le cancer de l'œsophage ou du col de l'utérus (84,85). Ashida *et al* ont évalué le nombre de CD8+ dans les biopsies prétraitement de patients atteints de cancers épidermoïdes de l'œsophage traités par radiochimiothérapie. Ils ont noté un nombre de CD8+ significativement plus élevé chez les patients ayant survécu plus de trois ans en comparaison de ceux décédés dans la première année (84). Les auteurs soulèvent l'hypothèse qu'une réponse positive à la radiochimiothérapie dans le cancer de l'oesophage dépendrait en partie de la présence d'un nombre élevé de CD8+ au sein de la tumeur. Il n'y pas à l'heure actuelle d'étude qui nous permet de conclure que l'infiltrat lymphocytaire est un facteur prédictif de la réponse à la chimiothérapie dans le cancer du pancréas chez l'humain. Parmi les patients ayant reçu des traitements adjuvants, nous avons observé une différence de survie qui

était significative seulement chez les patients avec un IL intermédiaire (+/-) (13,1 mois vs 26,4 mois $p=0,024$) (tableau XV p. 45 et figure 14 p. 48). La différence de survies médianes de 18,3 à 31,7 mois dans le groupe IL +++ n'était pas significative ($p=0,098$). Il est difficile de tirer une conclusion de ce résultat dans le contexte d'une étude rétrospective avec de petits nombres de patients dans chaque groupe. De plus, le faible bénéfice de la chimiothérapie sur la survie dans le cancer du pancréas pourrait rendre l'utilisation de ces biomarqueurs plus difficile. Par exemple, la survie médiane des patients recevant de la gemcitabine en traitement adjuvant passe de 20 à 22 mois (11). Une autre piste pourrait être l'étude de l'infiltrat inflammatoire leucocytaire. Dans cette étude, Jamieson *et al*, ont évalué l'infiltrat inflammatoire leucocytaire de manière qualitative. Ils ont observé qu'un infiltrat inflammatoire leucocytaire de haut grade était possiblement un facteur de bon pronostic. Ils ont également noté que seuls les patients avec un bas grade d'infiltrat inflammatoire leucocytaire bénéficient de la chimiothérapie (survie médiane de 10 à 16 mois, $p = 0,02$) (86).

Il est donc possible que les différentes réponses aux traitements adjuvants dans le cancer du pancréas s'expliquent en partie par le degré et le type d'infiltrat immunitaire. L'utilisation de l'infiltrat lymphocytaire et d'un index lymphocytaire pour analyser l'impact et le pronostic de la chimiothérapie reste à définir dans le cancer du pancréas et pourrait faire l'objet d'études plus poussées. Idéalement, l'IL devrait être inclus dans une étude prospective chez des patients avec un adénocarcinome du pancréas traités par chirurgie et chimiothérapie adjuvante pour évaluer sa valeur prédictive.

Conclusions générales

En conclusion, l'objectif général de ce mémoire était d'évaluer la valeur pronostique de l'infiltrat lymphocytaire tumorale et péri-tumorale dans l'adénocarcinome du pancréas. Nos résultats montrent l'importance de l'infiltrat lymphocytaire et nous permettent de supporter l'utilisation d'un index lymphocytaire dans le pronostic du cancer du pancréas. Cet index combine le gradient de lymphocytes T CD3+ T sur PT et les densités de CD4+ T, CD8+ PT. En comparaison avec les valeurs de chaque sous-type de lymphocytes, sa valeur pronostique est plus puissante. Il permet de stratifier les patients avec envahissement ganglionnaire, soit 75% des patients, en trois groupes ayant une survie significativement différente.

De plus, par une analyse se basant sur une définition précise de zones tumorale et péri-tumorale, nous avons pu établir qu'un gradient d'infiltrat lymphocytaire tumoral sur péri-tumoral est associé de manière significative à une meilleure survie.

Ces résultats méritent d'être confirmés par une plus grande cohorte de patients et une validation externe. La définition précise des zones tumorale et péri-tumorale ainsi que l'utilisation de micromatrices avec décomptes automatisées devrait permettre cette validation.

L'utilisation de l'analyse des infiltrats lymphocytaires devrait donc pouvoir avoir un rôle pronostique clinique, et possiblement comme facteur prédictif de l'impact de la chimiothérapie, ce qui pourrait ouvrir la voie à d'autres types de traitement d'immunothérapie.

Bibliographie

1. Friedman R. Cdn Cancer Stats 2012E.vp. 2012 Feb 15;:1–69.
2. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010;60(5):277–300.
3. Schnelldorfer T, Ware A, Sarr M, Smyrk T, Zhang L, Qin R, et al. Long-term survival after pancreatoduodenectomy for pancreatic adenocarcinoma: is cure possible? *Ann Surg*. 2008 Mar 1;247(3):456–62.
4. Cameron JL, Riall TS, Coleman J, Belcher KA. One thousand consecutive pancreaticoduodenectomies. *Ann Surg*. 2006 Jul 1;244(1):10–5.
5. Barugola G, Partelli S, Marcucci S, Sartori N, Capelli P, Bassi C, et al. Resectable Pancreatic Cancer: Who Really Benefits From Resection? *Ann Surg Oncol*. 2009 Dec 26;16(12):3316–22.
6. Eloubeidi MA, Desmond RA, Wilcox CM, Wilson RJ, Manchikalapati P, Fouad MM, et al. Prognostic factors for survival in pancreatic cancer: a population-based study. *Am J Surg*. 2006 Sep 1;192(3):322–9.
7. Artinyan A, Soriano PA, Prendergast C, Low T, Ellenhorn JDI, Kim J. The anatomic location of pancreatic cancer is a prognostic factor for survival. *HPB (Oxford)*. 2008;10(5):371–6.
8. Lim J, Chien M, Earle C. Prognostic factors following curative resection for pancreatic adenocarcinoma: a population-based, linked database analysis of 396 patients. *Ann Surg*. 2003;237(1):74–85.
9. Hilbig A, Oettle H. Adjuvant therapy of pancreatic cancer. *Expert Rev Anticancer Ther*. Expert Reviews Ltd London, UK; 2010 Apr;10(4):485–91.
10. Mayo SC, Austin DF, Sheppard BC, Mori M, Shipley DK, Billingsley KG. Adjuvant therapy and survival after resection of pancreatic adenocarcinoma: a population-based analysis. *Cancer*. 2010 Mar 24.
11. Zuckerman DS, Ryan DP. Adjuvant therapy for pancreatic cancer: a review. *Cancer*. 2008 Jan 15;112(2):243–9.
12. Jamieson NB, Denley SM, Logue J, MacKenzie DJ, Foulis AK, Dickson EJ, et al. A prospective comparison of the prognostic value of tumor- and patient-related factors in patients undergoing potentially curative surgery for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2011 Aug 1;18(8):2318–28.

13. Greene FL, Sobin LH. The staging of cancer: a retrospective and prospective appraisal. *CA Cancer J Clin.* 2008;58(3):180–90.
14. Lu Y-C, El-Gamil M, Li YF, Gross C, Gartner J, Lin JC, et al. Mining exomic sequencing data to identify mutated antigens recognized by adoptively transferred tumor-reactive T cells. *Nat Med.* Nature Publishing Group; 2013 May 5;19(6):747–52.
15. Rosenberg SA. Cell transfer immunotherapy for metastatic solid cancer—what clinicians need to know. *Nat Rev Clin Oncol.* Nature Publishing Group; 2011 Aug 2;8(10):577–85.
16. Wasif N, Ko CY, Farrell J, Wainberg Z, Hines OJ, Reber H, et al. Impact of tumor grade on prognosis in pancreatic cancer: should we include grade in AJCC staging? *Ann Surg Oncol.* 2010 Sep 1;17(9):2312–20.
17. Zou W. Immunosuppressive networks in the tumour environment and their therapeutic relevance. *Nature Publishing Group.* 2005 Apr;5(4):263–74.
18. Pagès F, Galon J, Dieu-Nosjean M-C, Tartour E, Sautès-Fridman C, Fridman W-H. Immune infiltration in human tumors: a prognostic factor that should not be ignored. *Oncogene.* 2010 Feb 25;29(8):1093–102.
19. Shevach EM. Fatal attraction: tumors beckon regulatory T cells. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):900–1.
20. Pandol S, Edderkaoui M, Gukovsky I, Lugea A, Gukovskaya A. Desmoplasia of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 Nov 1;7(11 Suppl):S44–7.
21. Whitcomb DC. Inflammation and Cancer V. Chronic pancreatitis and pancreatic cancer. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2004 Aug 1;287(2):G315–9.
22. Whitcomb D, Greer J. Germ-line mutations, pancreatic inflammation, and pancreatic cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2009 Nov 1;7(11 Suppl):S29–34.
23. Farrow B, Sugiyama Y, Chen A, Uffort E, Nealon W, Evers BM. Inflammatory mechanisms contributing to pancreatic cancer development. *Ann Surg.* 2004 Jun 1;239(6):763–9; discussion769–71.
24. Erkan M, Weis N, Pan Z, Schwager C, Samkharadze T, Jiang X, et al. Organ-, inflammation- and cancer specific transcriptional fingerprints of pancreatic and hepatic stellate cells. *Mol Cancer.* 2010;9:88.
25. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:329–60.
26. Fridman W-H, Pagès F, Sautès-Fridman C, Galon J. The immune contexture in human

- tumours: impact on clinical outcome. *Nat Rev Cancer*. 2012 Apr;12(4):298–306.
27. van der Bruggen P, Traversari C, Chomez P, Lurquin C, De Plaen E, Van den Eynde B, et al. A gene encoding an antigen recognized by cytolytic T lymphocytes on a human melanoma. *Science*. 1991 Dec 13;254(5038):1643–7.
 28. Guillaume B, Stroobant V, Bousquet-Dubouch MP, Colau D, Chapiro J, Parmentier N, et al. Analysis of the Processing of Seven Human Tumor Antigens by Intermediate Proteasomes. *The Journal of Immunology*. 2012 Sep 20;189(7):3538–47.
 29. Kaufman HL, Di Vito J, Hørig H. Immunotherapy for pancreatic cancer: current concepts. *Hematology/Oncology Clinics of NA*. 2002 Feb;16(1):159–97–viii.
 30. Gjertsen MK, Bakka A, Breivik J, Saeterdal I, Solheim BG, Soreide O, et al. Vaccination with mutant ras peptides and induction of T-cell responsiveness in pancreatic carcinoma patients carrying the corresponding RAS mutation. *Lancet*. 1995 Nov 25;346(8987):1399–400.
 31. Pylayeva-Gupta Y, Lee KE, Hajdu CH, Miller G, Bar-Sagi D. Oncogenic Kras-induced GM-CSF production promotes the development of pancreatic neoplasia. *Cancer Cell*. 2012 Jun 12;21(6):836–47.
 32. Morse MA, Deng Y, Coleman D, Hull S, Kitrell-Fisher E, Nair S, et al. A Phase I study of active immunotherapy with carcinoembryonic antigen peptide (CAP-1)-pulsed, autologous human cultured dendritic cells in patients with metastatic malignancies expressing carcinoembryonic antigen. *Clin Cancer Res*. 1999 Jun;5(6):1331–8.
 33. Tassi E, Gavazzi F, Albarello L, Senyukov V, Longhi R, Dellabona P, et al. Carcinoembryonic antigen-specific but not antiviral CD4+ T cell immunity is impaired in pancreatic carcinoma patients. *The Journal of Immunology*. 2008 Nov 1;181(9):6595–603.
 34. Rong Y, Qin X, Jin D, Lou W, Wu L, Wang D, et al. A phase I pilot trial of MUC1-peptide-pulsed dendritic cells in the treatment of advanced pancreatic cancer. *Clin Exp Med*. 2011 Sep 20;12(3):173–80.
 35. Schettini J, Kidiyoor A, Besmer DM, Tinder TL, Roy LD, Lustgarten J, et al. Intratumoral delivery of CpG-conjugated anti-MUC1 antibody enhances NK cell anti-tumor activity. *Cancer Immunol Immunother*. 2012 Apr 28;61(11):2055–65.
 36. Niccolai E, Prisco D, D'Elis MM, Amedei A. What is recent in pancreatic cancer immunotherapy? *Biomed Res Int*. 2013;2013:492372.
 37. Melero I, Hervas-Stubbs S, Glennie M, Pardoll DM, Chen L. Immunostimulatory monoclonal antibodies for cancer therapy. *Nature Publishing Group*. 2007 Feb 1;7(2):95–106.

38. Clark C, Hingorani S, Mick R, Combs C, Tuveson D, Vonderheide R. Dynamics of the immune reaction to pancreatic cancer from inception to invasion. *Cancer Res.* 2007 Oct 1;67(19):9518–27.
39. Vonderheide RH, Bajor DL, Winograd R, Evans RA, Bayne LJ, Beatty GL. CD40 immunotherapy for pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2013 May;62(5):949–54.
40. Royal RE, Levy C, Turner K, Mathur A, Hughes M, Kammula US, et al. Phase 2 trial of single agent Ipilimumab (anti-CTLA-4) for locally advanced or metastatic pancreatic adenocarcinoma. *J Immunother.* 2010 Oct;33(8):828–33.
41. Hardacre JM, Mulcahy M, Small W, Talamonti M, Obel J, Krishnamurthi S, et al. Addition of algenpantucel-L immunotherapy to standard adjuvant therapy for pancreatic cancer: a phase 2 study. *J Gastrointest Surg.* 2013 Jan;17(1):94–100–discussionp.100–1.
42. Pages F, Berger A, Camus M, Sanchez-Cabo F, Costes A, Molitor R, et al. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. *N Engl J Med.* 2005 Dec 22;353(25):2654–66.
43. Galon J, Costes A, Sanchez-Cabo F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Lagorce-Pages C, et al. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science.* 2006 Sep 29;313(5795):1960–4.
44. Pagès F, Kirilovsky A, Mlecnik B, Asslaber M, Tosolini M, Bindea G, et al. In situ cytotoxic and memory T cells predict outcome in patients with early-stage colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2009 Dec 10;27(35):5944–51.
45. Noshu K, Baba Y, Tanaka N, Shima K, Hayashi M, Meyerhardt JA, et al. Tumour-infiltrating T-cell subsets, molecular changes in colorectal cancer, and prognosis: cohort study and literature review. *The Journal of pathology.* 2010 Aug 31.
46. Katz SC, Pillarisetty V, Bamboat ZM, Shia J, Hedvat C, Gonen M, et al. T Cell Infiltrate Predicts Long-Term Survival Following Resection of Colorectal Cancer Liver Metastases. *Ann Surg Oncol.* 2009 Sep 1;16(9):2524–30.
47. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat Med.* 2004 Sep;10(9):942–9.
48. Hiraoka N, Onozato K, Kosuge T, Hirohashi S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. *Clin Cancer Res.* 2006 Sep 15;12(18):5423–34.
49. Kryczek I, Liu R, Wang G, Wu K, Shu X, Szeliga W, et al. FOXP3 defines regulatory T cells in human tumor and autoimmune disease. *Cancer Res.* 2009 May 1;69(9):3995–

4000.

50. Ahmadzadeh M, Felipe-Silva A, Heemskerk B, Powell DJ, Wunderlich JR, Merino MJ, et al. FOXP3 expression accurately defines the population of intratumoral regulatory T cells that selectively accumulate in metastatic melanoma lesions. *Blood*. 2008 Dec 15;112(13):4953–60.
51. Yamamoto T, Yanagimoto H, Satoi S, Toyokawa H, Hirooka S, Yamaki S, et al. Circulating CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with pancreatic cancer. *Pancreas*. 2012 Apr 1;41(3):409–15.
52. Salama P, Phillips M, Grieu F, Morris M, Zeps N, Joseph D, et al. Tumor-Infiltrating FOXP3+ T Regulatory Cells Show Strong Prognostic Significance in Colorectal Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2009 Jan 10;27(2):186–92.
53. Katz SC, Bamboat ZM, Maker AV, Shia J, Pillarisetty VG, Yopp AC, et al. Regulatory T cell infiltration predicts outcome following resection of colorectal cancer liver metastases. *Ann Surg Oncol*. 2013 Mar;20(3):946–55.
54. Barnett JC, Bean SM, Whitaker RS, Kondoh E, Baba T, Fujii S, et al. Ovarian cancer tumor infiltrating T-regulatory (T(reg)) cells are associated with a metastatic phenotype. *Gynecol Oncol*. 2010 Mar 1;116(3):556–62.
55. Katz SC, Anderson JL, Glasgow K, Pillarisetty VG, Gonen M, Espat NJ, et al. T cell infiltrate and outcome following resection of intermediate-grade primary neuroendocrine tumours and liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2010 Dec;12(10):674–83.
56. Zhang L, Conejo-Garcia JR, Katsaros D, Gimotty PA, Massobrio M, Regnani G, et al. Intratumoral T cells, recurrence, and survival in epithelial ovarian cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jan 16;348(3):203–13.
57. Gao Q, Zhou J, Wang X-Y, Qiu S-J, Song K, Huang X-W, et al. Infiltrating memory/senescent T cell ratio predicts extrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2012 Feb;19(2):455–66.
58. Lee HE, Chae SW, Lee YJ, Kim MA, Lee HS, Lee BL, et al. Prognostic implications of type and density of tumour-infiltrating lymphocytes in gastric cancer. *Br J Cancer*. 2008 Nov 18;99(10):1704–11.
59. de Jong RA, Leffers N, Boezen HM, Hoor ten KA, van der Zee AGJ, Hollema H, et al. Presence of tumor-infiltrating lymphocytes is an independent prognostic factor in type I and II endometrial cancer. *Gynecol Oncol*. 2009 Jul 1;114(1):105–10.
60. Kawai O, Ishii G, Kubota K, Murata Y, Naito Y, Mizuno T, et al. Predominant infiltration of macrophages and CD8(+) T Cells in cancer nests is a significant predictor of survival in stage IV nonsmall cell lung cancer. *Cancer*. 2008 Sep 15;113(6):1387–95.

61. Hoos A, Nissan A, Stojadinovic A, Shia J, Hedvat CV, Leung DHY, et al. Tissue microarray molecular profiling of early, node-negative adenocarcinoma of the rectum: a comprehensive analysis. *Clin Cancer Res*. 2002 Dec 1;8(12):3841–9.
62. Hoos A, Cordon-Cardo C. Tissue microarray profiling of cancer specimens and cell lines: opportunities and limitations. *Lab Invest*. 2001 Oct 1;81(10):1331–8.
63. Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *The Journal of pathology*. 2001 Sep 1;195(1):72–9.
64. Cunha KSG, Caruso AC, Gonçalves AS, Bernardo VG, Pires ARC, da Fonseca EC, et al. Validation of tissue microarray technology in malignant peripheral nerve sheath tumours. *J Clin Pathol*. 2009 Jul 1;62(7):629–33.
65. Rubin MA. Use of laser capture microdissection, cDNA microarrays, and tissue microarrays in advancing our understanding of prostate cancer. *The Journal of pathology*. 2001 Sep 1;195(1):80–6.
66. Clavien P, Barkun J, de Oliveira M, Vauthey J, Dindo D, Schulick R, et al. The Clavien-Dindo classification of surgical complications: five-year experience. *Ann Surg*. 2009 Aug 1;250(2):187–96.
67. DeOliveira M, Winter J, Schafer M, Cunningham S, Cameron J, Yeo C, et al. Assessment of complications after pancreatic surgery: A novel grading system applied to 633 patients undergoing pancreaticoduodenectomy. *Ann Surg*. 2006 Dec 1;244(6):931–7; discussion937–9.
68. Dindo D, Demartines N, Clavien P. Classification of surgical complications: a new proposal with evaluation in a cohort of 6336 patients and results of a survey. *Ann Surg*. 2004 Aug 1;240(2):205–13.
69. Fukunaga A, Miyamoto M, Cho Y, Murakami S, Kawarada Y, Oshikiri T, et al. CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes together with CD4+ tumor-infiltrating lymphocytes and dendritic cells improve the prognosis of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2004;28(1):e26–31.
70. Galon J, Pagès F, Marincola FM, Angell HK, Thurin M, Lugli A, et al. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. *J Transl Med*. 2012;10:205.
71. Perini MV, Montagnini AL, Jukemura J, Penteado S, Abdo EE, Patzina R, et al. Clinical and pathologic prognostic factors for curative resection for pancreatic cancer. *HPB (Oxford)*. 2008;10(5):356–62.
72. Mezhir JJ. Management of complications following pancreatic resection: an evidence-based approach. *J Surg Oncol*. 2013 Jan;107(1):58–66.

73. Kondo N, Murakami Y, Uemura K, Hayashidani Y, Sudo T, Hashimoto Y, et al. Prognostic impact of perioperative serum CA 19-9 levels in patients with resectable pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol*. 2010 Sep 1;17(9):2321–9.
74. Aloia TA, Aloia TE, Lee JE, Vauthey J-N, Abdalla EK, Wolff RA, et al. Delayed recovery after pancreaticoduodenectomy: a major factor impairing the delivery of adjuvant therapy? *ACS*. 2007 Mar;204(3):347–55.
75. Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000 Dec 1;80(12):1943–9.
76. Altman DG. Suboptimal analysis using “optimal” cutpoints. *Br J Cancer*. 1998 Aug;78(4):556–7.
77. Zitvogel L, Kepp O, Kroemer G. Immune parameters affecting the efficacy of chemotherapeutic regimens. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Mar;8(3):151–60.
78. Ademmer K, Ebert M, Muller-Ostermeyer F, Friess H, Buchler M, Schubert W, et al. Effector T lymphocyte subsets in human pancreatic cancer: detection of CD8+CD18+ cells and CD8+CD103+ cells by multi-epitope imaging. *Clin Exp Immunol*. 1998 Apr 1;112(1):21–6.
79. Bernstorff von W, Voss M, Freichel S, Schmid A, Vogel I, Jöhnk C, et al. Systemic and local immunosuppression in pancreatic cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2001 Mar;7(3 Suppl):925s–932s.
80. Ryschich E, Nötzel T, Hinz U, Autschbach F, Ferguson J, Simon I, et al. Control of T-cell-mediated immune response by HLA class I in human pancreatic carcinoma. 2005 Jan 15;11(2 Pt 1):498–504.
81. De Monte L, Reni M, Tassi E, Clavenna D, Papa I, Recalde H, et al. Intratumor T helper type 2 cell infiltrate correlates with cancer-associated fibroblast thymic stromal lymphopoietin production and reduced survival in pancreatic cancer. *J Exp Med*. 2011 Mar 14;208(3):469–78.
82. Liu F, Lang R, Zhao J, Zhang X, Pringle GA, Fan Y, et al. CD8+ cytotoxic T cell and FOXP3+ regulatory T cell infiltration in relation to breast cancer survival and molecular subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Nov;130(2):645–55.
83. Bunt SK, Mohr AM, Bailey JM, Grandgenett PM, Hollingsworth MA. Rosiglitazone and Gemcitabine in combination reduces immune suppression and modulates T cell populations in pancreatic cancer. *Cancer Immunol Immunother*. 2013 Feb;62(2):225–36.
84. Ashida A, Boku N, Aoyagi K, Sato H, Tsubosa Y, Minashi K, et al. Expression profiling of esophageal squamous cell carcinoma patients treated with definitive chemoradiotherapy: clinical implications. *Int J Oncol*. 2006 Jun;28(6):1345–52.

85. Sc ABM, Sc ABB, Sc EMM, Sc MFB, D MPM, D GFM, et al. Selective Changes in the Immune Profile of Tumor-Draining Lymph Nodes After Different Neoadjuvant Chemoradiation Regimens for Locally Advanced Cervical Cancer. *Radiation Oncology Biology*. Elsevier Ltd; 2010 Apr 1;76(5):1546–53.
86. Jamieson NB, Mohamed M, Oien KA, Foulis AK, Dickson EJ, Imrie CW, et al. The Relationship Between Tumor Inflammatory Cell Infiltrate and Outcome in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol*. 2012 May 4.

