UNIVERSITÉ DE LILLE

FACULTÉ DE MÉDECINE HENRI WAREMBOURG

Année : 2022

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN MÉDECINE

Étude immunohistochimique du microenvironnement tumoral d'une série de 44 carcinomes corticosurrénaliens

Présentée et soutenue publiquement le jeudi 29 septembre 2022 à 16h00 au Pôle Formation

Par Thibaut GIOANNI

_____

JURY :
Président :
Madame le Professeur Emmanuelle LETEURTRE
Assesseurs :
Madame le Docteur Christine DO CAO
Monsieur le Docteur Arnaud JANNIN
Directeur de thèse :
Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT

_____

Avertissement

La Faculté n’entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses : celles-ci sont propres à leurs auteurs.

LISTE DES ABRÉVIATIONS

B7-H3 : B7 Homolog 3

BRCA1/2 : Breast Cancer 1/2

CCS : Carcinome Corticosurrénalien

CD : Cluster of Differenciation

CHU : Centre Hospitalier Universitaire

CIMP : CpG Island Methylation Phenotype

CLU : Cortisol Libre Urinaire

CPI : Checkpoint Inhibitor

CPS : Combined Positive Score

CTLA-4 : Cytotoxic T-Lymphocyte-Associated Protein 4

ENSAT : European Network for the Study of Adrenal Tumors

FDA : Food and Drug Administration

FoxP3 : Forkhead Box P3

GC : Glucocorticoïdes

GRAS : Grading, R Status, Age, Symptoms

HSP : High Steroid Phenotype

IGF-R1 : Insuline-like Growth Factor Receptor 1

LSP : Low Steroid Phenotype

MMR : Mismatch Repair

MSI : Microsatellite Instability

mTOR : Mammalian Target of Rapamycin

NK : Natural Killer

OS : Overall Survival

PD-1 : Programmed Cell Death Protein 1

PD-L1 : Programmed Death-Ligand 1

PFS : Progression Free Survival

POLE : ADN Polymérase Épsilon

TAMs : Tumor-associated Macrophages

TGCA : The Cancer Genome Atlas

TILs : Tumor-Infiltrating Lymphocytes

TMA : Tissue Microarray

TMB : Tumor Mutational Burden

TME : Tumor Microenvironment

TPS : Tumor Proportion Score

VEGF : Vascular Endothelial Growth Factor

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ 1

INTRODUCTION 2

Épidémiologie 2

Hétérogénéité tumorale 3

Stadification et pronostic 7

Traitement et perspectives 12

Carcinome corticosurrénalien et microenvironnement tumoral 16

Historique et généralités 16

Le microenvironnement tumoral dans le carcinome corticosurrénalien 24

Glucocorticoïdes et immunité 25
Autres acteurs 28
Carcinomes corticosurrénaliens et immunothérapie 31

OBJECTIFS 36

Objectif principal 36

Objectifs secondaires 37

MATÉRIEL ET MÉTHODES 38

Critères d'inclusion, d'exclusion et sélection des cas 38

Réalisation des Tissue Microarrays 40

Analyse Immunohistochimique 42

Réalisation des techniques 42

Numérisation des lames 44

Interprétation des immunohistochimies 45

Analyse statistique 49

RÉSULTATS 50

Données descriptives 50

Étude des TILs CD4+ et CD8+ en fonction du caractère sécrétant 52

Étude des populations leucocytaires et marqueurs théranostiques en fonction du caractère sécrétant 53

Étude des populations leucocytaires et marqueurs théranostiques en fonction du score S-GRAS 57

Résultats complémentaires 58

Comparaison du microenvironnement tumoral entre la périphérie et la profondeur des tumeurs 58

Étude de survies globale et sans récidive 59

Survies en fonction du caractère sécrétant 59
Survies en fonction du rapport CD4/CD8 61
Survies en fonction de la présence ou non de mastocytes intra-tumoraux 63

DISCUSSION 65

Intérêts de l'étude 65

Caractéristiques de la population étudiée 67

Étude du microenvironnement tumoral 71

TILs CD4+ et CD8+ et glucocorticoïdes 71

Mastocytes intra-tumoraux et glucocorticoïdes 72

Autres populations cellulaires et glucocorticoïdes 73

Marqueurs théranostiques et glucocorticoïdes 75

Comparaison entre la périphérie et la profondeur des tumeurs 76

Étude de survies globale et sans récidive 77

Influence des TILs CD4+ et CD8+ 77

Influence des mastocytes intra-tumoraux 78

Limites de l'étude 79

Taille de la population étudiée 79

Pertinence de l'étude immunohistochimique sur TMA 80

Pertinence de l'étude sur tumeur primitive 82

Perspectives 83

CONCLUSION 85

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES 86

ANNEXES 94

RÉSUMÉ

Contexte

Les carcinomes corticosurrénaliens (CCS) sont des tumeurs rares, de pronostic défavorable, souvent diagnostiquées à un stade avancé. Après chirurgie, le taux de récidive reste élevé et l'arsenal thérapeutique après récidive ou lésion métastatique reste limité. L'immunothérapie a révolutionné la prise en charge de certains cancers (mélanome, poumon…), tandis que les essais sur les patients atteints de CCS se sont révélés décevants. Une partie du problème est que l'interaction de ces tumeurs avec leur microenvironnement est mal connue. La sécrétion de glucocorticoïdes par les CCS (environ la moitié des cas) semble également jouer un rôle immunosuppresseur au niveau loco-régional. L'objectif de ce travail est donc de mieux caractériser le microenvironnement de ces tumeurs et d'évaluer l'impact de la sécrétion de glucocorticoïdes sur celui-ci.

Méthode

Une analyse rétrospective a été menée sur les CCS opérés au CHU de Lille durant la période de 2014 à 2021. Une étude immunohistochimique après réalisation de *tissue microarrays* a été effectuée sur 44 CCS, permettant la quantification intra-tumorale de plusieurs populations leucocytaires et l'évaluation de l'expression de marqueurs théranostiques.

Résultats

Les CCS sécrétants possédaient significativement moins de lymphocytes intra-tumoraux (TILs) CD4+ ($p = 0,014$), CD8+ ($p = 0,017$), CD20+ ($p = 0,034$) ainsi que de mastocytes intra-tumoraux ($p < 0,001$) que ceux non-sécrétants. Le caractère sécrétant tumoral était associé à des survies globale et sans récidive moindres. Un rapport de TILs CD4/CD8 > 1 était associé à une survie globale moindre, et l'absence de mastocytes intra-tumoraux était associée à des survies globale et sans récidive abaissées.

Conclusion

Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature. Non seulement la sécrétion de glucocorticoïdes par les CCS a un impact péjoratif sur la survie, mais elle induit aussi des changements dans la composition de leur microenvironnement tumoral avec notamment des concentrations en TILs CD4+ et CD8+ abaissées. Nos résultats suggèrent également un rôle pronostique favorable de la présence de mastocytes intra-tumoraux. L'étude des marqueurs théranostiques (PD-1, PD-L1 et CTLA-4) n'a pas démontré de différence d'expression statistiquement significative entre les deux groupes.

INTRODUCTION

Épidémiologie

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est une tumeur maligne rare d'origine épithéliale dérivant des cellules de la corticosurrénale. Son incidence est de 0,5 à 2 cas pour 1 million d'habitants dans le monde, avec un âge médian des patients au diagnostic situé entre 40 et 60 ans selon les séries, mais il peut survenir à tout âge, y compris pendant l'enfance. Il touche majoritairement les femmes avec un sex-ratio de 2,5 pour 1. (1)

À l'heure actuelle, il n'existe pas de facteurs de risque clairement identifiés, hormis certains syndromes génétiques prédisposants, tels que le syndrome de Li-Fraumeni (par ailleurs responsable de 50 à 80% des cas pédiatriques), le syndrome de Lynch, la néoplasie endocrinienne multiple de type 1, et plus rarement la polypose adénomateuse familiale, le syndrome de Beckwith-Wiedemann et la neurofibromatose de type 1. (1,2)

En France, l'incidence de la maladie est d'approximativement 20 à 25 cas par an. (3) La rareté de cette pathologie fait qu'il est difficile de réaliser des études à grands effectifs, ce qui, associé à un pronostic globalement mauvais, constitue un défi de taille pour l'optimisation et l'uniformisation de la prise en charge, ainsi que pour l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Hétérogénéité tumorale

Les carcinomes corticosurrénaliens sont des tumeurs hétérogènes aussi bien d'un point de vue clinique qu'anatomopathologique.

La moitié des patients présentent des signes de sécrétion hormonale excessive, majoritairement un hypercortisolisme, parfois un hyperandrogénisme, rarement un hyperaldostéronisme. Un tiers des patients présente des signes en rapport avec la croissance tumorale (douleurs, inconfort abdominal). Les autres cas sont découverts de façon fortuite lors d'examens radiologiques sans rapport avec cette affection. (1)

Histologiquement, ces tumeurs sont polymorphes (cf. fig. 1 et 2), avec des architectures et aspects cytologiques variables, mais surtout des degrés d'agressivité variables. Il a donc été proposé en 1984 par Weiss un score prédictif de métastase à distance (signant formellement la malignité) reposant sur 9 critères histologiques, définissant une tumeur corticosurrénalienne comme étant maligne si ce score était strictement supérieur à 2 (cf. fig. 3) (1,4) Certains de ces critères présentant une reproductibilité inter-observateur faible et le score étant non applicable aux tumeurs pédiatriques et à certains variants histologiques, d'autres scores ont été proposés, tels que le score de Weiss modifié par Aubert *et al.* (5,6), le score de Helsinki par Pennanen *et al.* (7), le score de Lin-Weiss-Bisceglia pour les tumeurs oncocytaires (cf. fig. 4) (8) et le score de Weineke pour les tumeurs pédiatriques. (9)

Néanmoins, le score de Weiss reste aujourd'hui l'outil le plus utilisé en pratique courante pour l'évaluation du potentiel de malignité d'une tumeur corticosurrénalienne non pédiatrique et non oncocytaire.

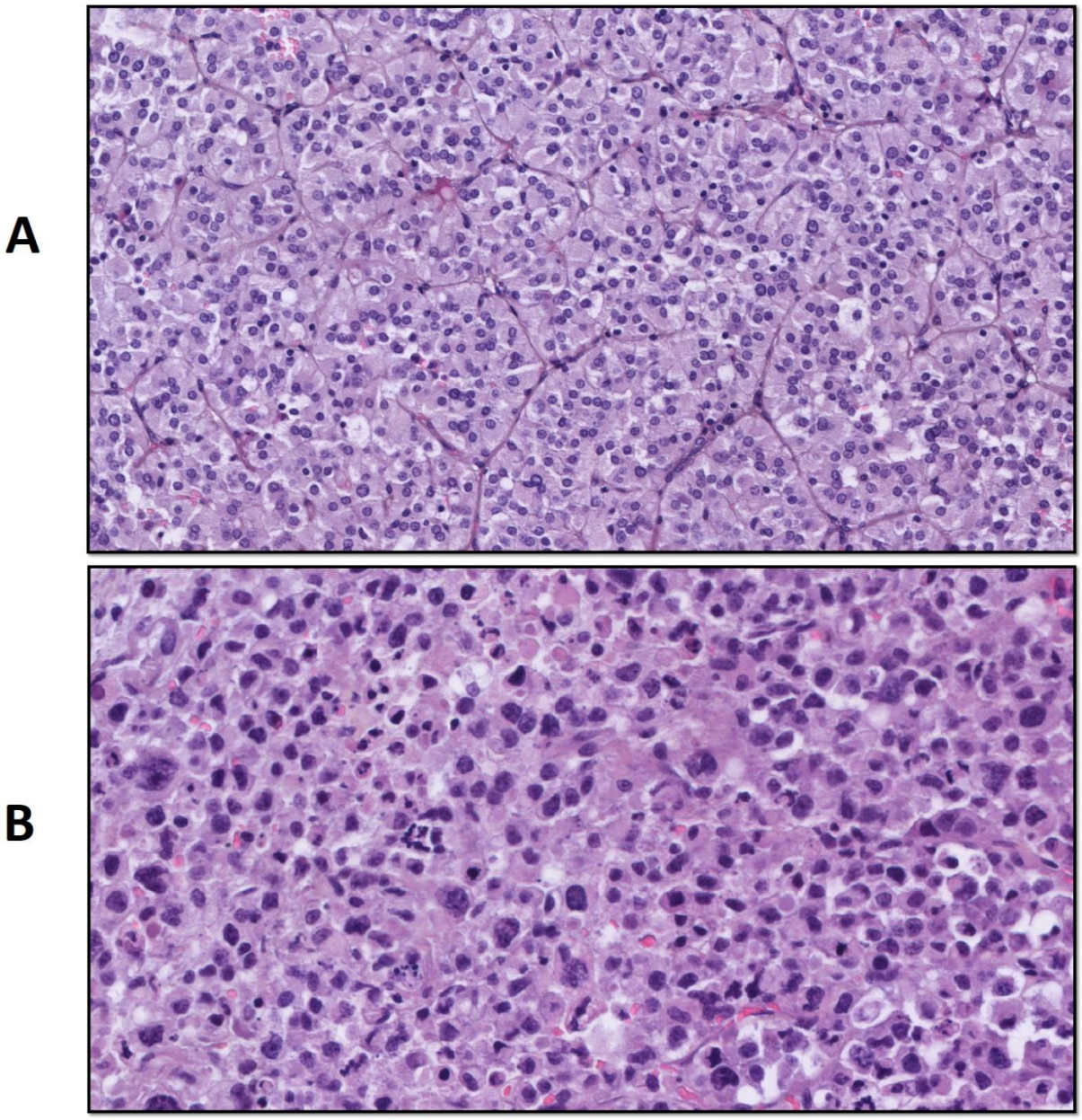


Figure 1. Variabilité d'agressivité histologique des CCS. (HES x 20)
(A) Tumeur dont le score de Weiss était égal à 4, présentant peu d'atypies cytonucléaires, peu de mitoses visibles et une architecture en nids et travées.
(B) Tumeur dont le score de Weiss était égal à 9, présentant des cellules disposées en plages comportant nombreuses mitoses dont certaines atypiques, des atypies cytonucléaires marquées associées à de la nécrose.

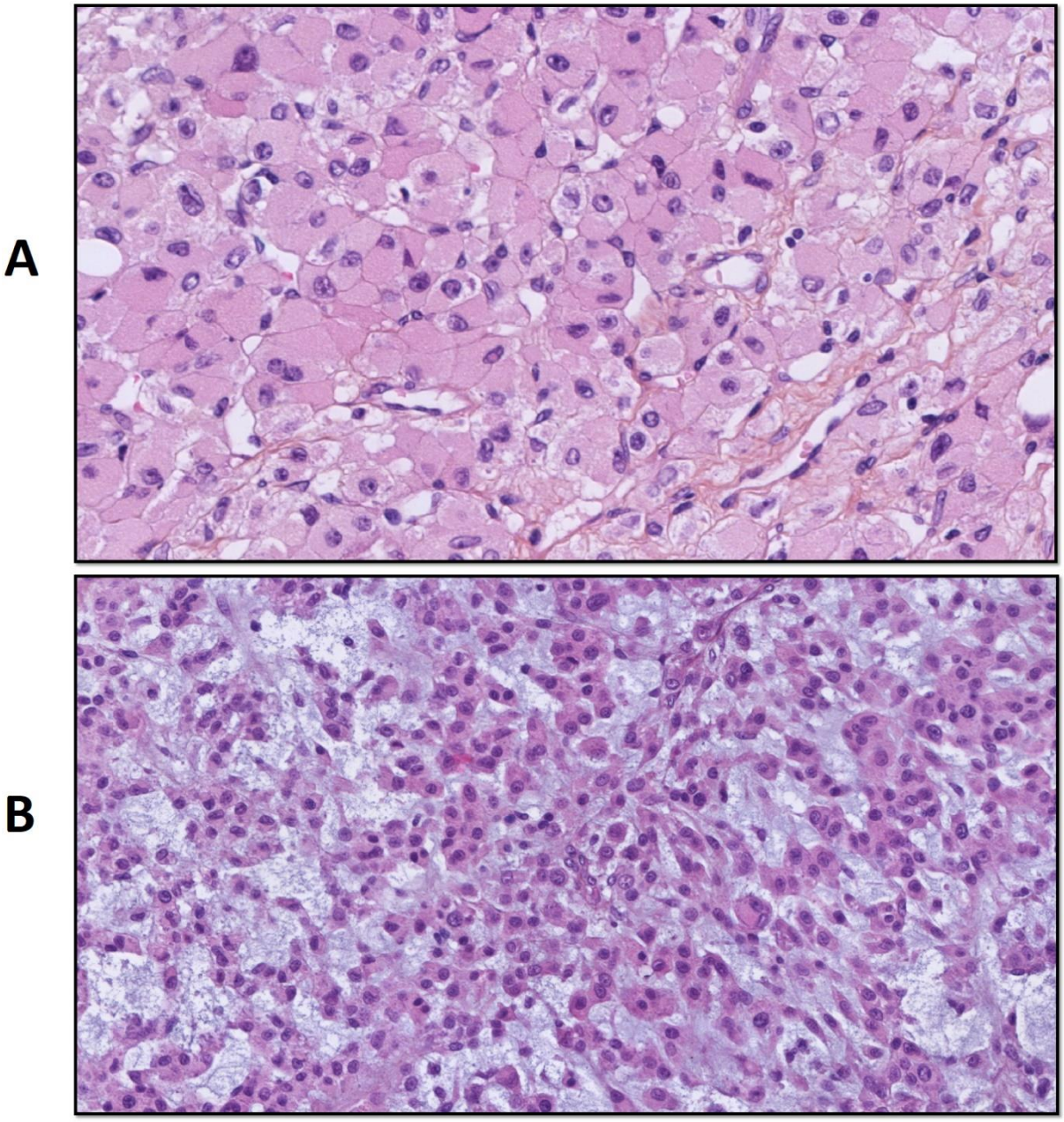


Figure 2. Variants histologiques des CCS. (HES x 20)
(A) Variant oncocytaire caractérisé par des cellules tumorales possédant un riche cytoplasme éosinophile granuleux riche en mitochondries. Ces tumeurs sont gradées à l'aide du système de Lin-Weiss-Bisceglia.
(B) Variant myxoïde, caractérisé par un stroma tumoral myxoïde abondant.

Critères histopathologiques	Un point si :
1. Grade nucléaire (selon Fuhrman)	Élevé (3 ou 4)
2. Mitoses	>5 pour 50 champs à fort grossissement
3. Mitoses atypiques	Oui
4. Cellules claires ou microvacuolisées	Représentent ≤25% de la tumeur
5. Architecture diffuse	Représente >33% de la tumeur
6. Nécrose	Oui
7. Invasion veineuse	Oui
8. Invasion des sinusoïdes	Oui
9. Invasion capsulaire	Oui

Figure 3. Score de Weiss. Une tumeur corticosurrénalienne avec un score < 3 est considérée comme bénigne. Une tumeur avec un score ≥ 3 est considérée comme maligne (1)

Critères majeurs	- >5 mitoses pour 50 champs à fort grossissement - Présence de mitoses atypiques - Présence d'invasion veineuse
Critères mineurs	- Taille tumorale >10 cm et/ou poids>200 g - Présence de nécrose - Présence d'invasion capsulaire - Présence d'invasion des sinusoïdes

Figure 4. Système de Lin-Weiss-Bisceglia pour les tumeurs corticosurrénaliennes oncocytaires. La présence d'un critère majeur est en faveur d'une tumeur maligne. La présence d'un ou plusieurs critères mineurs sans critère majeur est en faveur d'un potentiel de malignité incertain. (1,8)

Stadification et pronostic

Les carcinomes corticosurrénaliens sont des tumeurs de pronostic généralement mauvais, avec une survie à 5 ans comprise entre 37 et 47% tous stades confondus. (1) Du fait de la rareté et de l'hétérogénéité de cette pathologie, identifier avec précision des facteurs pronostiques est d'une importance capitale pour l'adaptation des choix thérapeutiques pour chaque patient.

Le stade tumoral, défini par l'ENSAT en 2008 (10) et figurant dans la dernière édition de la classification TNM des tumeurs malignes (11) définit les stades localisés et les maladies avancées. Le pronostic de ces dernières a été précisé par Libé *et al.* en 2015 (cf. fig. 5). En effet, les stades III et IV représentent respectivement 18 à 26% et 21 à 46% des malades au moment du diagnostic, avec des options thérapeutiques limitées. Préciser leur pronostic via une meilleure stadification était nécessaire, et le système mENSAT (ENSAT modifié) possède une forte corrélation avec la survie de ces patients. (1,12)

Un des autres facteurs pronostiques cliniques ayant été identifié est le caractère fonctionnel ou non de la tumeur. Les CCS étant dérivés des cellules de la corticosurrénale, environ 50% de ceux-ci sécrètent des hormones : principalement des glucocorticoïdes (GC) (surtout du cortisol), plus rarement des androgènes, des minéralocorticoïdes ou des œstrogènes de façon isolée ou associée, avec une traduction clinico-biologique.

La sécrétion de glucocorticoïdes a clairement été identifiée comme péjorative par plusieurs études et méta-analyses. Cependant, il n'a pas été établi si cette association était liée à l'action directe des GC sur l'organisme, à son action immunosuppressive, ou si les CCS sécrétants étaient généralement plus agressifs. (1,13)

A

Stade ENSAT	Définition
I	T1, N0, M0
II	T2, N0, M0
III	T1–T2, N1, M0
	T3–T4, N0–N1, M0
IV	T1–T4, N0–N1, M1

B

Stade	Définition
III	$T_{3-4}N_0M_0$
IV-A	$T_{1-4}N_1M_0$ or $T_{1-4}N_{0-1}M_1$ (<3 organes dont N)
IV-B	$T_{1-4}N_{0-1}M_1$ (3 organes)
IV-C	$T_{1-4}N_{0-1}M_1$ (>3 organes)

Figure 5. Stadification des CCS.
(A) Stades ENSAT en fonction du TNM (10)
(B) ENSAT modifié (mENSAT) proposé par Libé *et al.* en 2015 pour les maladies avancées (stades III et IV) (12)

La sécrétion d'androgènes n'apparait pas comme étant de mauvais pronostic, mais le manque de données sur le sujet ne permet pas de l'affirmer avec robustesse. (13) Par ailleurs, la persistance de signes cliniques d'hypercorticisme après résection complète suggèrerait la présence de reliquat tumoral et assombrit le pronostic. (1)

L'âge du patient au diagnostic apparait également comme un facteur important, avec notamment un âge supérieur à 50 ans comme étant péjoratif. (1,12,14)

Les résections incomplètes (R1 ou R2) sont de mauvais pronostic. (1,15) La résection se doit d'être large et emporte parfois des organes adjacents. Malgré cela, 60% des patients avec une maladie localisée récidivent après chirurgie. (16) La qualité de l'exérèse détermine en partie la suite de la prise en charge (cf. fig. 8).

D'autres caractéristiques inhérentes à la tumeur telles qu'un index mitotique supérieur à 20 mitoses pour 50 champs à fort grossissement (définissant une tumeur de haut grade), un index de prolifération selon le Ki67 supérieur à 10%, sont corrélées à une survie moindre et à un taux de récidive post-chirurgie R0 plus élevé. (1,15,17) En 2015, Beuschlein *et al.* ont proposé de grader les CCS en partie en fonction de leur index de prolifération. (17)

Il a également été proposé par Libé *et al.* de regrouper 4 facteurs pronostiques cliniques et histopathologiques au sein d'un système nommé GRAS (Grading, R Status, Age, Symptoms) et de les combiner avec le stade mENSAT afin d'observer s'ils présentaient une corrélation avec la survie globale des patients ayant une maladie au stade avancé. Ces 4 facteurs se sont avérés être utiles pour la stratification pronostique de ces patients. (12) Récemment, ce système a été modifié pour permettre le calcul d'un score pronostique (S-GRAS) utilisant l'âge, la présence ou non de symptômes au diagnostic, le stade ENSAT, la qualité de résection et le Ki67. (16,18) Ce score, séparant les patients en 4 sous-groupes, possédait une excellente corrélation avec la survie spécifique et la survie sans progression, le stade ENSAT et le Ki67 ayant la plus forte influence sur ces paramètres (cf. fig. 6) (16)

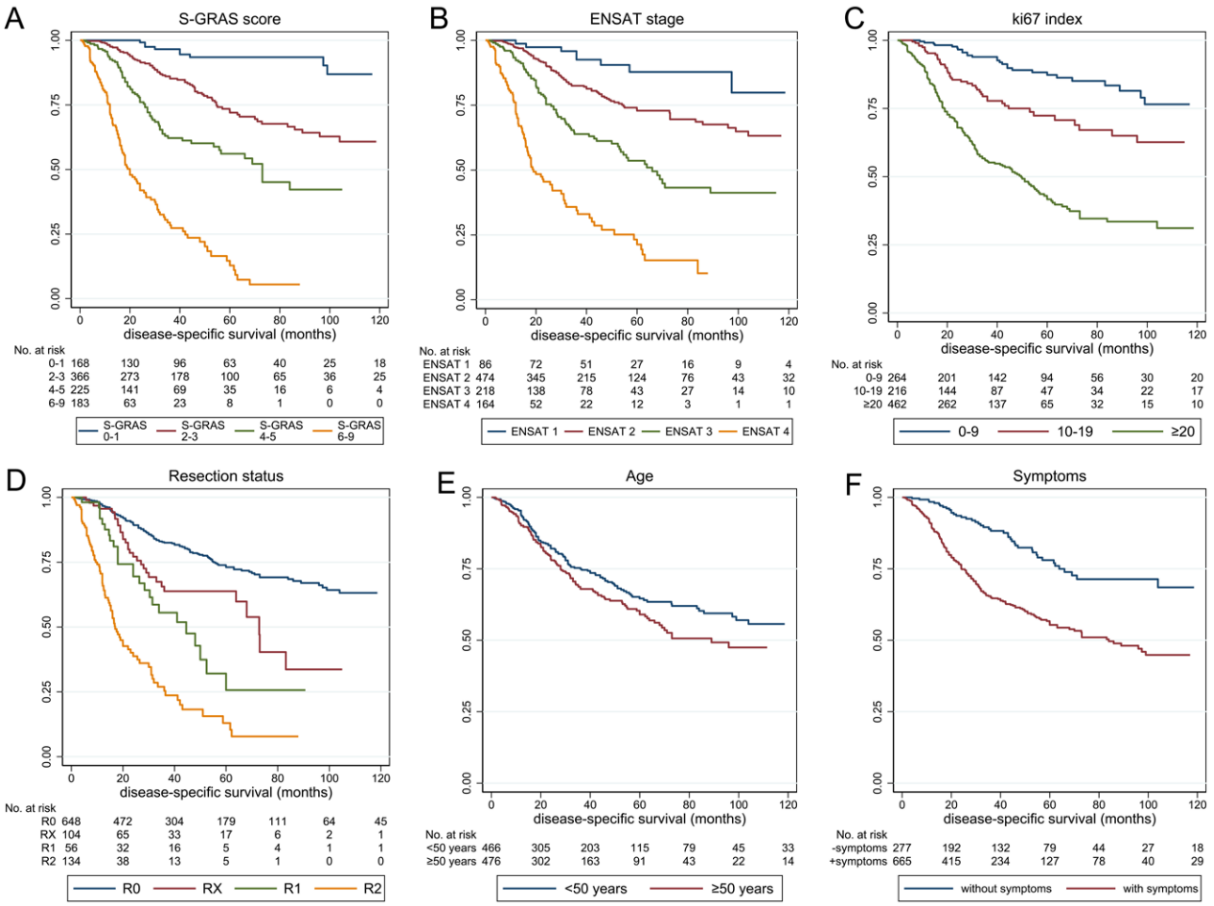


Figure 6. Courbes de Kaplan-Meier illustrant la survie spécifique en fonction du score S-GRAS ainsi que de chacun de ses composants pris séparément.
Source : Elhassan *et al. S-GRAS score for prognostic classification of adrenocortical carcinoma : an international, multicenter ENSAT study, Eur J of Edocrinology, 2022* (16)

L'apport de la biologie moléculaire a aussi permis d'identifier d'autres facteurs pronostiques. (cf. fig. 7)

Au niveau chromosomique, il a été montré que les tumeurs à génomique complexe présentant de nombreuses cassures chromosomiques sont de pronostic plus péjoratif que celles présentant des gains ou pertes de bras entiers, ou que celles ayant une génomique simple. (19)

Certaines mutations participant à la tumorogenèse des CCS sont corrélées à des survies globale et sans récidive moindres, en particulier au niveau des gènes intervenant dans la voie p53/Rb, comme *TP53* et *CDKN2A*, ou dans la voie Wnt/β-caténine, comme *CTNNB1* et *ZNFR3*. (18–20) Les tumeurs aux profils hyperméthylés (CIMP high), possédant certains profils d'expression génique (*BUB1B-PINK1*) ou de micro-ARNs sont de moins bon pronostic. (18,21,22)

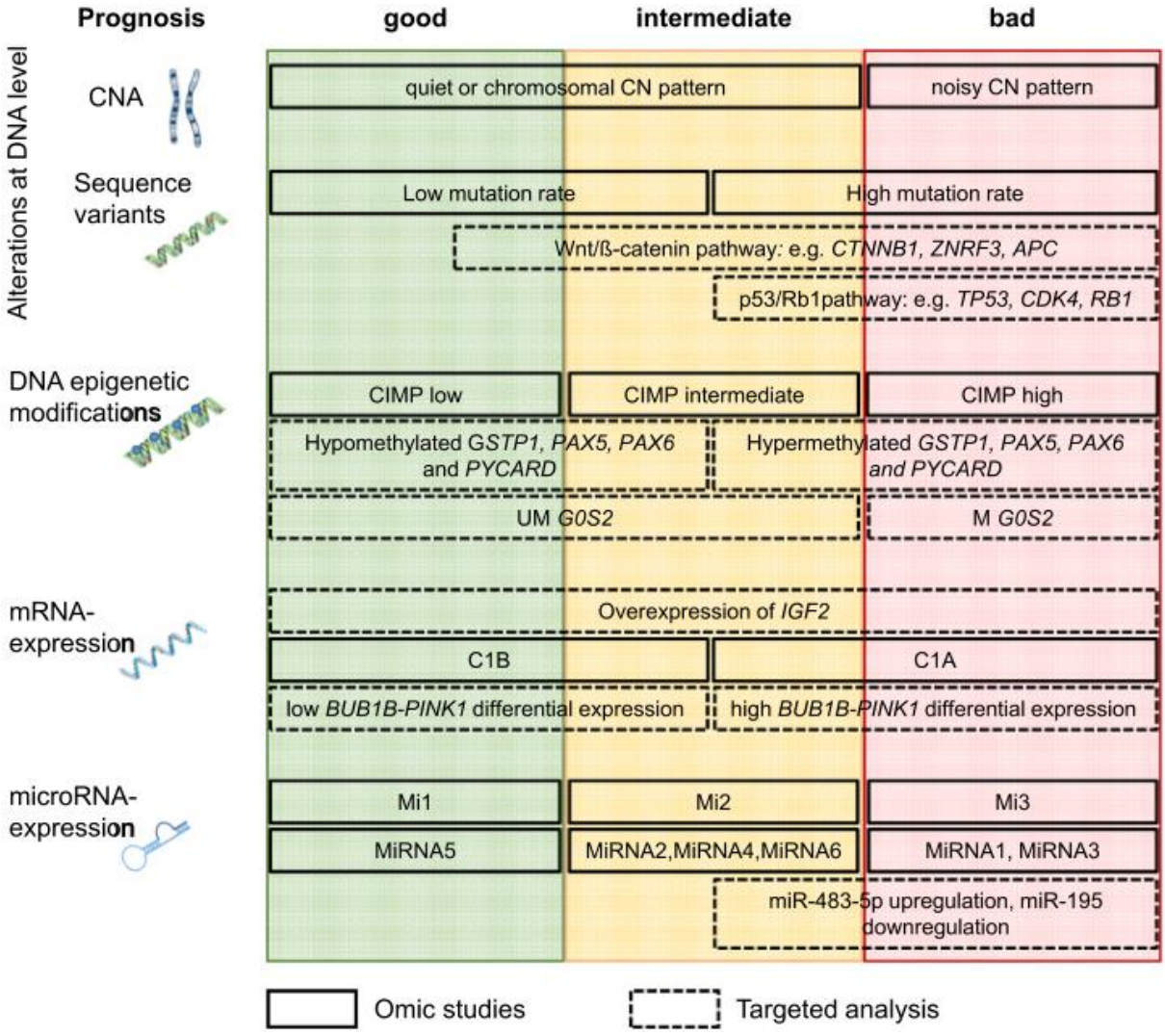


Figure 7. Illustration de sous-groupes pronostiques de CCS en fonction de différentes altérations moléculaires.
Source : Lippert *et al. The role of molecular profiling in adrenocortical carcinoma, Clinical Endocrinology, 2021* (23)

Dans une optique de stratification pronostique plus avancée, Lippert *et al.* ont proposé en 2018 une combinaison d'un score moléculaire au score GRAS, appelée COMBI score. Celui-ci serait plus performant que les scores n'utilisant que des critères cliniques et histopathologiques, notamment pour identifier les patients au pronostic favorable et ainsi éviter l'utilisation de traitements adjuvants après chirurgie. (18)

Traitement et perspectives

L'arsenal thérapeutique pour traiter les carcinomes corticosurrénaliens étant assez restreint, l'algorithme décisionnel pour la prise en charge reste simple (cf. fig. 8 et 9)

En cas de maladie résécable, le traitement consiste en la chirurgie qui se doit d'être R0, car le statut de résection est un facteur pronostique majeur. Après avoir déterminé si le patient est à haut risque de récidive ou non, il est possible d'utiliser du mitotane en traitement adjuvant au long cours. Il possède une activité cytotoxique et d'inhibition de la stéroïdogenèse sur la surrénale et sur les CCS. Il est centre de la prise en charge. (24)

En cas de maladie non résécable ou de récidive, les options thérapeutiques sont limitées. Le mitotane doit être toujours utilisé, en association avec une chimiothérapie cytotoxique à base d'étoposide, de doxorubucine et de cisplatine, et/ou des traitements locaux : radiothérapie, chimio-embolisation, cryo-ablation… Une chirurgie de cytoréduction peut être envisagée. (24)

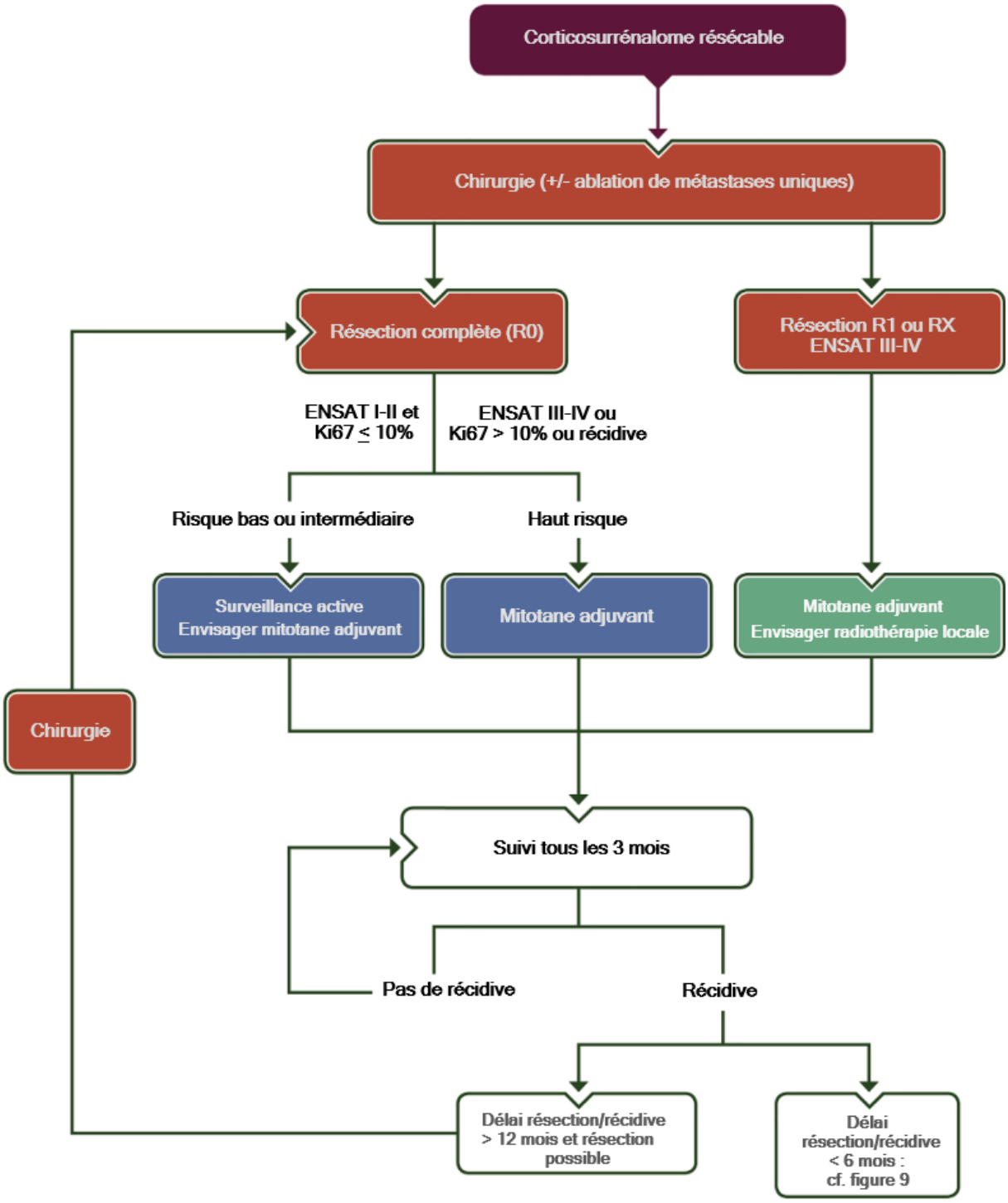


Figure 8. Algorithme de prise en charge des CCS résécables.
Source : Fassnacht *et al. Adrenocortical carcinomas and malignant phaeochromocytomas : ESMOeEURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Annals of Oncology, 2020* (24)

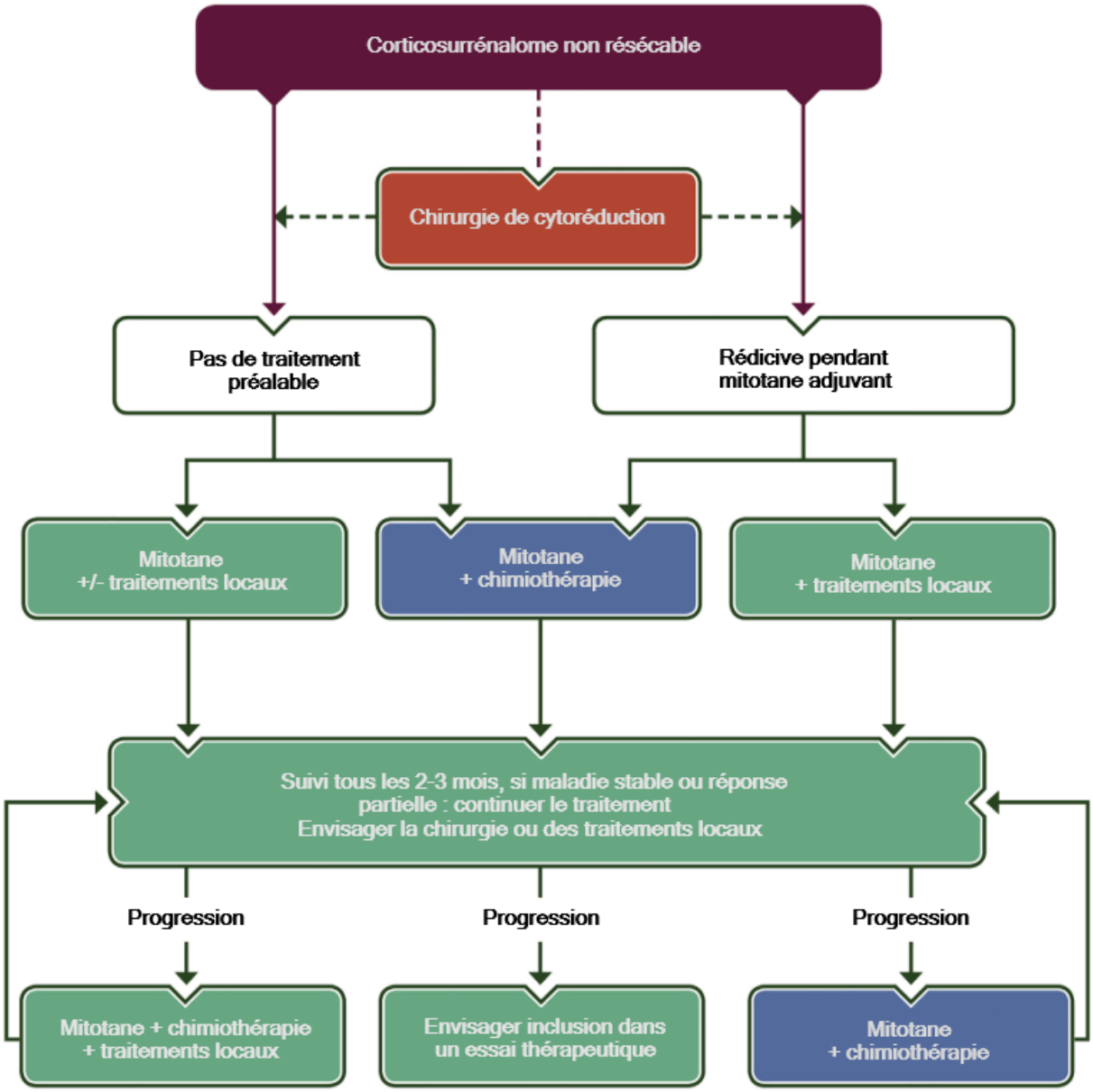


Figure 9. Algorithme de prise en charge des CCS non résécables.
Source : Fassnacht *et al. Adrenocortical carcinomas and malignant phaeochromocytomas : ESMOeEURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up, Annals of Oncology, 2020* (24)

En cas d'échec des traitements sus-cités, aucun autre traitement n'a fait preuve de sa supériorité. L'inclusion dans des protocoles d'essais thérapeutiques est donc à encourager.

Plusieurs cibles thérapeutiques et molécules ont été considérées : des inhibiteurs de la voie de l'insuline avec notamment le linsitinib, un bloqueur de l'IGF-R1 et du récepteur à l'insuline, certains inhibiteurs de tyrosine kinase, ou de la voie mTOR. Les résultats de l'immunothérapie ont été décevants jusqu'à maintenant. (15,25–29)

Les CCS sont des tumeurs complexes, hétérogènes, possédant des altérations moléculaires variées, et leur rareté est un obstacle majeur à la réalisation d'études à grands effectifs. De plus, leur pathogénie et interactions avec le système immunitaire de l'hôte ou leur microenvironnement tumoral (TME) sont mal comprises.

Il est donc crucial d'améliorer notre compréhension de ces tumeurs afin de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques, ou de déterminer quels facteurs conduisent à l'échec de celles précédemment citées.

Ce travail a pour objectif d'étudier un de ces facteurs : le microenvironnement tumoral, et plus particulièrement les cellules du système immunitaire qui le composent.

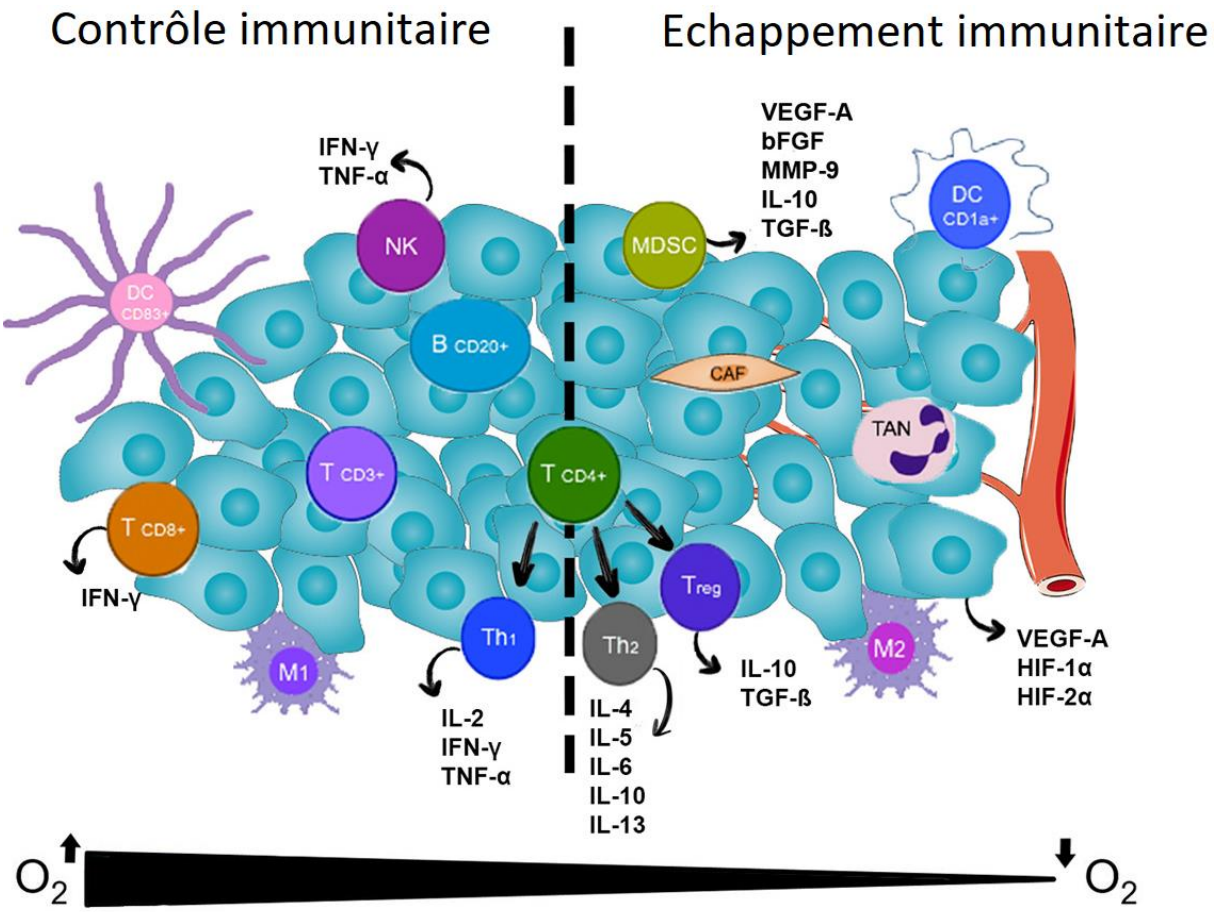
Carcinome corticosurrénalien et microenvironnement tumoral

Historique et généralités

Depuis quelques années, les travaux sur le microenvironnement tumoral ont révolutionné l'oncologie. Celui-ci est une intrication complexe d'intervenants, et chacun d'entre eux est une cible thérapeutique potentielle. (cf. fig. 10)

La vascularisation intra-tumorale et la néoangiogenèse induite par les tumeurs a été l'un des premiers axes de développement de nouvelles thérapeutiques (anticorps monoclonaux, inhibiteurs de tyrosine kinase) (30), notamment pour les cancers du sein et colorectaux. (31,32)

Récemment, l'attention est particulièrement portée sur les cellules tumorales et l'interaction avec les cellules de leur stroma. Les cellules du système immunitaire de l'hôte y jouent un rôle prépondérant.



- DC : cellule dendritique
- NK : lymphocyte natural killer
- M1 : macrophage M1
- M2 : macrophage M2
- MDSC : cellule myéloïde suppressive
- CAF : fibroblaste intra-tumoral
- TAN : neutrophile intra-tumoral
- B CD20 + : lymphocyte B
- T CD3 + : lymphocyte T
- T CD8 + : lymphocyte T cytotoxique
- T CD4 + : lymphocyte auxilliaire
- Th1 : lymphocyte Th1
- Th2 : lymphocyte Th2
- Treg : lymphocyte T régulateur

Figure 10. Représentation simplifiée de l'interaction tumeur/microenvironnement tumoral. Source : Nascimento, Ferreira *Tumor microenvironment of human breast cancer, and feline mammary carcinoma as a potential study model, BBA Reviews on Cancer, 2021*

Les lymphocytes intra-tumoraux (TILs), en particulier les lymphocytes T auxiliaires (ou « *helpers* ») CD4+ sont au cœur de la régulation de la réponse immunitaire anti-tumorale. A partir d'un lymphocyte CD4+ naïf découlent plusieurs sous-types de lymphocytes T auxiliaires, qui peuvent avoir une action anti-tumorale ou pro-tumorale. Cette polarisation se fait après contact avec une cellule dendritique.

Par le biais de sécrétion de cytokines, ces lymphocytes favorisent ou inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale. Celle-ci passe par l'action cytotoxique directe de lymphocytes T CD8+ cytotoxiques ou de cellules NK, et de la production d'anticorps anti-tumoraux par les lymphocytes B. (cf. fig. 11) (33)

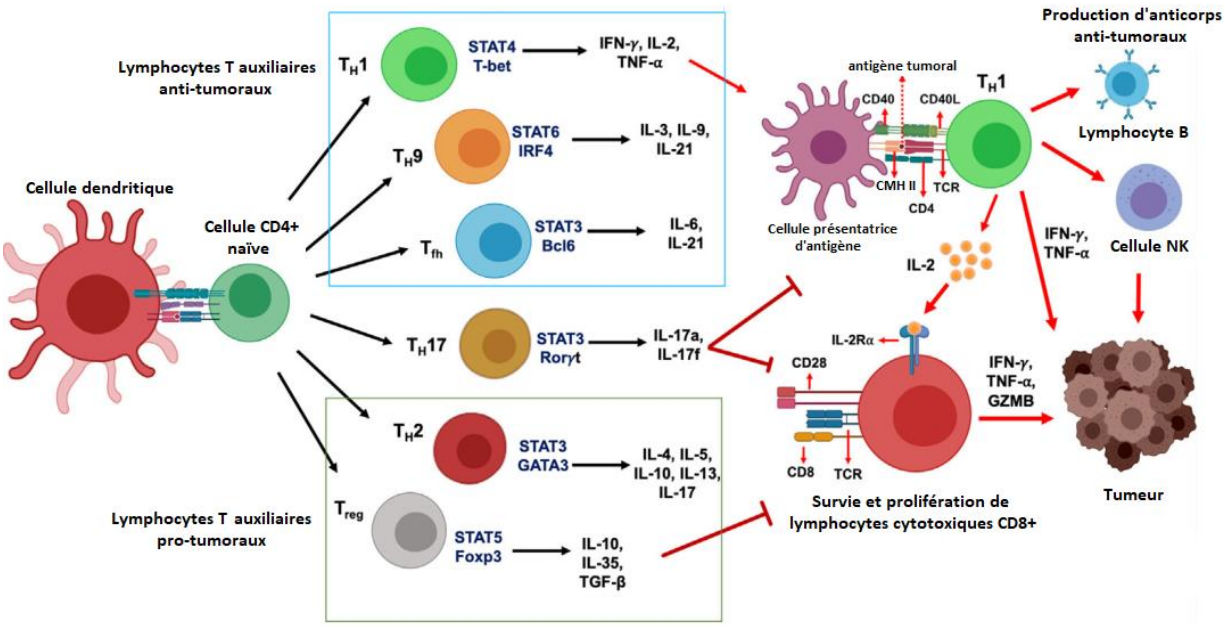


Figure 11. Polarisation des lymphocytes T *helpers* et leur fonction dans l'immunité anti-tumorale.
Source : Basu *et al. Differentiation and Regulation of T_H Cells : A Balancing Act for Cancer Immunotherapy, Frontiers in Immunology, 2021* (33)

Cette balance entre polarisation pro- ou anti-tumorale penche en faveur d'un côté ou de l'autre (cf. fig. 12) sous l'influence de facteurs liés à l'hôte ou à sa tumeur. Il est par exemple suggéré que les tumeurs à forte charge mutationnelle présentent de plus nombreux néo-antigènes et sont donc plus immunogènes, favorisant une polarisation T_H1 anti-tumorale. (33)

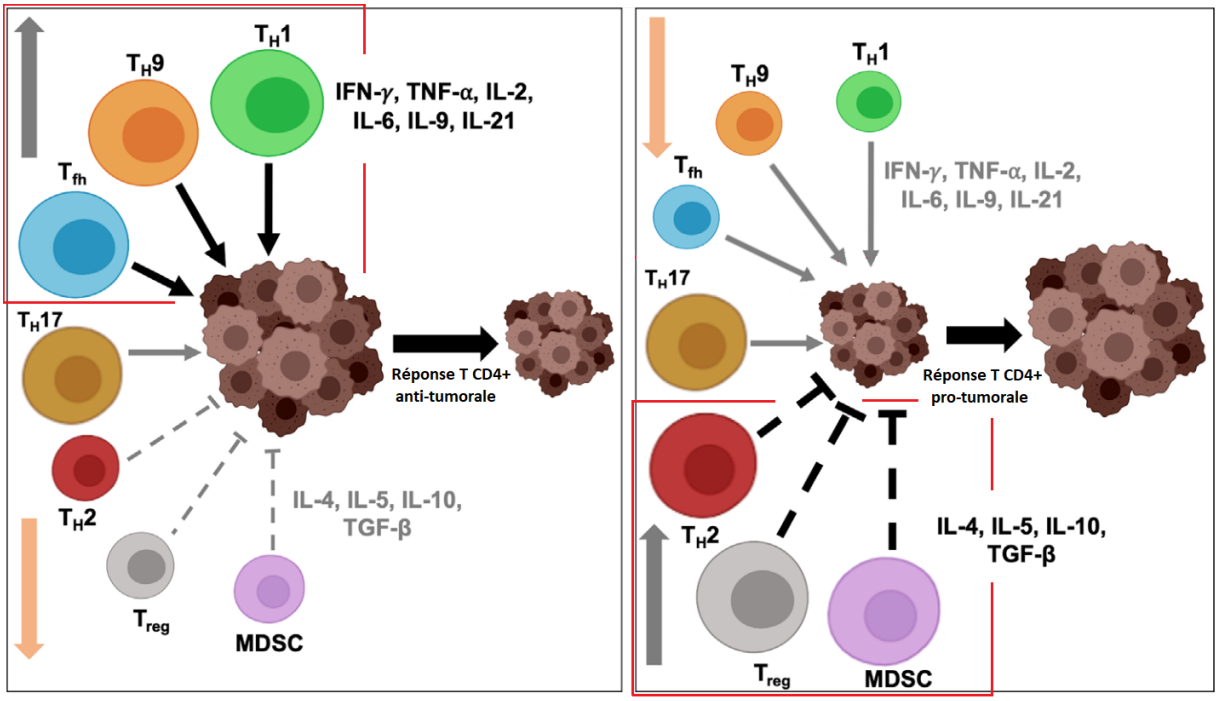


Figure 12. Balance entre activité pro- et anti-tumorale des lymphocytes T *helpers*.
Source : Basu *et al. Differentiation and Regulation of T_H Cells : A Balancing Act for Cancer Immunotherapy, Frontiers in Immunology, 2021* (33)

Cette hypothèse est en partie soutenue par l'étude des TILs des tumeurs hypermutées. Une étude ayant comparé 31 carcinomes endométrioïdes avec instabilité microsatellitaire (MSI) ou mutation de *POLE* (ADN Polymérase Épsilon) à 32 autres carcinomes sans profil hypermuté retrouvait un plus grand nombre de TILs dans les tumeurs MSI ou avec mutation de *POLE*. (34)

Une autre étude comparant 54 carcinomes ovariens séreux de haut grade avec mutation de *BRCA1* ou *BRCA2* avec 191 carcinomes sans mutation des gènes *BRCA* retrouvait également une plus grande infiltration lymphocytaire dans ces tumeurs hypermutées ainsi qu'une survie globale plus longue. (35)

Il est intéressant de noter que les tumeurs hypermutées de ces deux études présentaient une expression immunohistochimique de PD-L1 plus importante que les autres. Ceci suggère que ces tumeurs pourraient bénéficier de thérapies par inhibiteurs de checkpoints immunitaires. (33)

En effet, l'activation et la polarisation d'un lymphocyte ne dépend pas uniquement de l'antigène qui lui est présenté, mais aussi de points de contrôles immunitaires stimulateurs ou inhibiteurs associés (« *immune checkpoints* »). Ceux-ci sont indispensables à la tolérance vis-à-vis des antigènes du soi et à une réponse immunitaire appropriée face à une situation donnée. Ils sont nombreux et la grande majorité dépend de récepteurs membranaires. (36)

Historiquement, deux *checkpoints* immunitaires ont fait l'objet de larges études dans leur relation avec le cancer et ont débouché sur des thérapeutiques ayant radicalement changé le pronostic de certaines pathologies. D'autres sont prometteurs et sont actuellement à l'étude.

CTLA-4, ou CD152, fut le premier récepteur de *checkpoint* immunitaire à être ciblé de façon thérapeutique. Il s'agit d'un récepteur compétiteur de CD28. CD28 est un point de contrôle immunitaire stimulant l'activation d'un lymphocyte T après contact de son TCR avec un antigène, en se liant avec CD80 ou CD86. (36)

En se liant de manière compétitive à CD80 et CD86, CTLA-4 empêche le signal de co-activation médié par CD28 d'avoir lieu, résultant en l'absence d'activation du lymphocyte T. Le blocage de CTLA-4 permet de restaurer ce signal et la réponse lymphocytaire T anti-tumorale. (cf. fig. 13)

L'ipilimumab, un anticorps monoclonal ciblant CTLA-4 a prouvé son efficacité dans l'amélioration de la survie globale des patients atteint de mélanome métastatique et a été approuvé par la FDA en 2011. (36,37) Il fait maintenant partie des thérapeutiques à disposition chez les patients atteints de mélanomes à un stade avancé. (38)

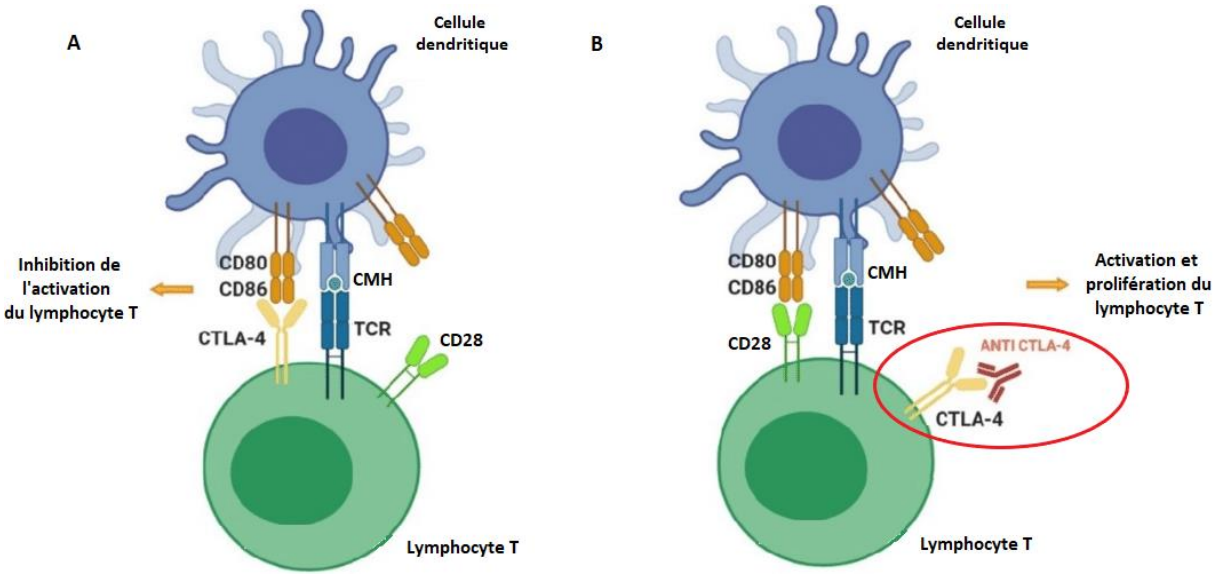


Figure 13. Rôle de CTLA-4 dans l'activation lymphocytaire T
(A) : Inhibition de l'activation par compétition avec CD28
(B) Levée de l'inhibition après blocage par un anticorps monoclonal
Source : Alard *et al. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets, Cancers, 2021*

PD-1, ou CD279, est un autre *checkpoint* immunitaire. Sa découverte a permis le développement de plusieurs molécules ayant révolutionné la prise en charge de certaines néoplasies. Il est exprimé par les lymphocytes T lorsque ceux-ci sont activés, et permet de réguler la réponse immunitaire afin d'éviter des phénomènes d'auto-immunité. Une fois en contact avec un de ses ligands (PD-L1 et PD-L2), il inhibe l'activité de kinases impliquées dans l'activation du lymphocyte T. (36) A l'instar de CTLA-4, les données de la littérature suggèrent que les lymphocytes T_{reg} expriment fortement PD-1 et que son activation entraine une prolifération de ces lymphocytes *helpers*. (39)

Les tumeurs exprimant PD-L1 (ou via les cellules immunitaires de leur stroma comme les TILs, les macrophages et les cellules dendritiques) exerceraient donc une activité immunosuppressive double, en inhibant la polarisation lymphocytaire vers un phénotype anti-tumoral, et en favorisant la prolifération d'une population T régulatrice, elle-même immunosuppressive.

L'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant PD-1 ou PD-L1 permet comme pour CTLA-4 de restaurer une activité immunitaire anti-tumorale. (cf. fig. 14)

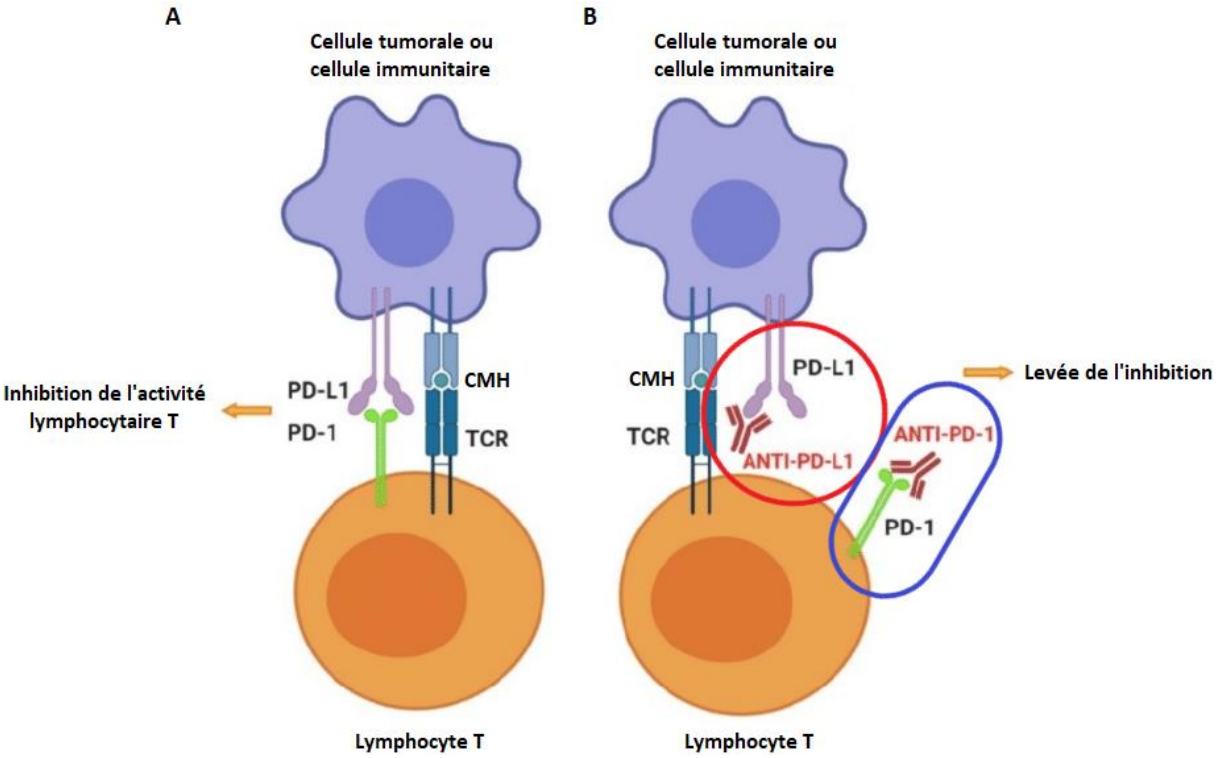


Figure 14. L'axe PD-1/PD-L1 comme co-signal inhibiteur de l'activité lymphocytaire T
(A) : La liaison PD-1/PD-L1 entraîne un co-signal inhibiteur
(B) Levée de l'inhibition après blocage de PD-1 (en bleu) ou de PD-L1 (en rouge) par un anticorps monoclonal
Source : Alard *et al. Advances in Anti-Cancer Immunotherapy: Car-T Cell, Checkpoint Inhibitors, Dendritic Cell Vaccines, and Oncolytic Viruses, and Emerging Cellular and Molecular Targets, Cancers, 2021*

Les inhibiteurs de PD-1 ou PD-L1 sont actuellement utilisés en pratique courante dans plusieurs cancers à un stade avancé et ont amélioré le pronostic de ceux-ci. L'association d'inhibiteurs de CTLA-4 et de PD-1 est également possible. (38,40)

Le microenvironnement tumoral dans le carcinome corticosurrénalien

Le rôle du TME des carcinomes corticosurrénaliens est mal connu. Au vu de leur hétérogénéité, identifier des facteurs pronostiques ou de prédiction de réponse à un médicament (en particulier une immunothérapie) est nécessaire.

En comparaison avec les adénocarcinomes et carcinomes épidermoïdes pulmonaires, ainsi que les mélanomes qui font partie des cancers les plus riches en cellules immunitaires (et qui se révèlent être de bons candidats à l'immunothérapie), les CCS sont parmi les tumeurs les plus immunologiquement « froides » et sont pauvres en leucocytes. (41) Comprendre les mécanismes derrière cette déplétion immunitaire intra-tumorale et trouver comment rendre ces tumeurs plus immunogènes pourrait améliorer leur pronostic, ou les rendre plus accessibles à l'immunothérapie.

Glucocorticoïdes et immunité

Les CCS ont la particularité de sécréter des glucocorticoïdes (GC) dans approximativement la moitié des cas. (1) Ces derniers peuvent exercer une activité immunosuppressive globale sur l'hôte et les cellules immunitaires au sein de sa tumeur. Comparer les CCS sécrétants et non-sécrétants s'avère donc pertinent dans le cadre de l'étude de l'interaction entre ces cancers et l'immunité locorégionale.

Récemment, Landwehr *et al.* ont effectué une étude sur 146 patients en comparant la présence de TILs en fonction du caractère sécrétant de glucocorticoïdes ou non des tumeurs. Les populations lymphocytaires étudiées étaient les TILs CD4+, CD8+ et FoxP3+. Il a été observé que les tumeurs sécrétantes possédaient significativement moins de TILs CD4+ que les tumeurs non-sécrétantes, et que 80% des tumeurs dépourvues de TILs CD4+ étaient sécrétantes. Par ailleurs, les tumeurs non-sécrétantes avec une haute concentration de TILs CD4+ étaient corrélées à la survie globale la plus longue. A l'inverse, les tumeurs sécrétantes sans TILs CD4+ exhibaient la survie globale la plus courte. (42)

Le caractère pronostique péjoratif de la sécrétion hormonale par les CCS est déjà documenté. (13) Cependant, l'étude de Landwehr *et al*. suggère que les glucocorticoïdes n'ont pas qu'une action délétère systémique sur l'hôte, mais favorisent également une déplétion immunitaire au sein du TME. Le fait que la population T CD4+ *helper* soit particulièrement touchée revêt son importance, car celle-ci est au centre de la réponse immunitaire anti-tumorale. (cf. fig. 11 et 12)

Des données *in silico* montrent également une influence du caractère sécrétant des CCS sur la composition du TME.

Baechle *et al.* ont effectué une étude transcriptomique d'échantillons tissulaires de 67 CCS (dont la moitié sécrétait des glucocorticoïdes) à l'aide de l'*Atlas du génome du cancer* (TGCA). Les CCS sécrétants possédaient une signature transcriptomique montrant une inhibition de gènes en rapport avec des fonctions immunitaires telles que l'activation lymphocytaire T, macrophagique, ou encore la signalisation cytokinique. Cette signature était également corrélée avec infiltration moindre par les lymphocytes T CD8+, NK, et les macrophages M1 dans les tissus étudiés. (43)

Muzzi *et al.* ont également conduit une étude sur 78 CCS issus de la base de données du TGCA, et les ont séparés en deux catégories à partir de leur profil d'expression génique : une catégorie « *High Steroid Phenotype* » (HSP) et une autre, « *Low Steroid Phenotype* » (LSP) correspondant au degré d'expression de gènes impliqués dans la stéroïdogenèse. Les tumeurs dites « HSP » représentaient la majorité des patients présentant des signes de sécrétion hormonale excessive. Bien que celles-ci possédaient des fractions leucocytaires intra-tumorales effondrées, les CCS « LSP » étaient dans les 40% des tumeurs les plus infiltrées au sein de la cohorte du TGCA. En accord avec l'étude de Baechle *et al.* (43), les tumeurs « LSP » présentaient des fractions intra-tumorales en lymphocytes T CD8+ et NK bien plus élevées que les tumeurs « HSP ». (44)

Ces résultats nuancent les données de l'étude de Vésteinn *et al.* présentant les CCS comme des tumeurs globalement immunologiquement « froides ». (41) Leur degré d'infiltration leucocytaire dépendrait en partie de leur profil d'expression génique en rapport avec l'immunité et la stéroïdogenèse.

Ces études montrent l'impact des glucocorticoïdes sécrétés sur le TME. Cependant, il est constaté que certains CCS non-sécrétants présentent une forte déplétion en cellules immunitaires, faisant suggérer que même en l'absence de traduction clinico-biologique d'une sécrétion hormonale excessive, les CCS pourraient posséder des concentrations intra-tumorales en GC largement supérieures à celles d'autres cancers. (42) L'activation des voies métaboliques de la stéroïdogenèse pourrait être immunosuppressive au sein du microenvironnement, sans symptômes cliniques ou anomalie biologique détectables. (44)

Bien que cette hypothèse mérite de futures investigations, il semble peu probable que les glucocorticoïdes soient l'unique facteur d'inhibition de la réponse immunitaire intra-tumorale au sein des carcinomes corticosurrénaliens.

Autres acteurs

Des travaux récents ont mis en évidence d'autres intervenants au sein de l'immunité intra-tumorale des CCS.

Deux études *in silico* utilisant également la base de données du TGCA ont observé des profils transcriptomiques d'échantillons tissulaires afin de mieux caractériser les populations leucocytaires intra-tumorales. Tian *et al.* ont montré sur une série de 79 CCS du TGCA que les signatures transcriptomiques en rapport avec la concentration de mastocytes intra-tumoraux possédaient la plus forte corrélation avec la survie globale, en comparaison avec d'autres populations leucocytaires. Une forte concentration intra-tumorale en mastocytes était ainsi corrélée à une meilleure survie. Les auteurs de cette étude ont ensuite évalué semi-quantitativement par immunohistochimie la concentration intra-tumorale de mastocytes sur une série de 39 CCS issus de leur institution. Une forte infiltration par des mastocytes était corrélée à une augmentation significative du nombre de lymphocytes T CD4+ et CD8+ en cytométrie de flux effectuée sur ces échantillons tissulaires. (45)

Les mastocytes interagissent avec de très nombreuses populations leucocytaires par le biais de la sécrétion d'une grande variété de cytokines et facteurs de croissance (cf. fig. 15) (46) Leur rôle dans la cancérogénèse et l'immunité anti-tumorale semble ambivalent car une densité intra-tumorale élevée apparaît comme un facteur pronostic péjoratif ou favorable en fonction du type de cancer considéré. (47,48)

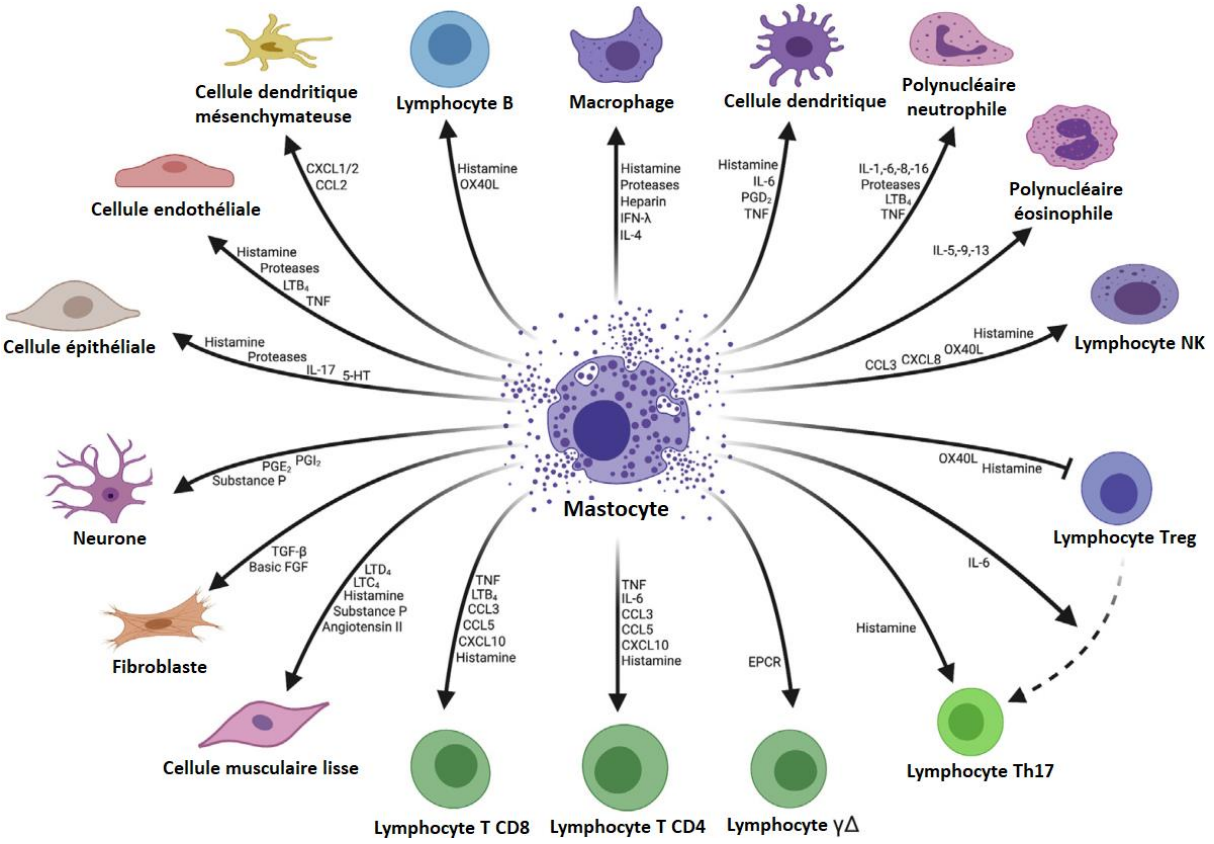


Figure 15. Interactions des mastocytes avec différentes populations cellulaires
Source : Baechle *et al. Multiplatform computational analysis of mast cells in adrenocortical carcinoma tumor microenvironment, Surgery, 2021* (49)

L'étude de Tian *et al*. suggère qu'une forte concentration intra-tumorale en mastocytes dans les CCS serait de bon pronostic. La seconde étude menée par Baechle *et al.* sur ces mêmes 79 tumeurs montrait également qu'une signature transcriptomique témoignant d'une forte infiltration intra-tumorale par des mastocytes était associée à une survie sans récidive plus longue. Deux profils transcriptomiques en rapport avec la signalisation mastocytaire ont ensuite été identifiés : l'un dit « anti-tumoral » corrélé à de meilleures survies globale et sans récidive, l'autre « pro-tumoral » ayant la corrélation inverse.

La signature « anti-tumorale » était significativement moins exprimée chez les CCS sécrétant des glucocorticoïdes. (49) Ces résultats sont en accord avec ceux de l'étude de Landwehr *et al.* ainsi qu'avec celles *in silico* suggérant que les GC inhibent la réponse immunitaire anti-tumorale au sein du microenvironnement. (42–45)

Des altérations moléculaires spécifiques pourraient également contribuer à la faible réponse immunitaire au sein du TME des CCS.

La voie Wnt/β-caténine est fréquemment le siège de mutations « *drivers* » (au niveau de *CTNNB1* ou *ZNFR3* principalement) dans les CCS. Il a déjà été observé dans d'autres néoplasies que des altérations de cette voie peuvent mener à une diminution de la réponse immunitaire anti-tumorale. (50,51)

Au sein des 92 patients de la cohorte du TGCA, Shenghua *et al.* ont observé qu'une forte expression de *CTNNB1* était corrélée à une baisse significative des TILs CD8+ ainsi qu'à une survie globale diminuée. À partir d'une cohorte de 16 tumeurs issues de leur institution, les auteurs suggéraient qu'une forte expression immunohistochimique de la β-caténine était corrélée à une faible expression de PD-L1 ainsi qu'un faible nombre de TILs. (52)

Les altérations de la voie p53/Rb sont également fréquentes avec en premier lieu des mutations de *TP53* qui sont associées à des tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic. (53) Les pertes de fonction de p53 ont déjà été décrites comme inhibant la réponse immunitaire anti-tumorale (54), mais aucun travail à ce sujet n'a été réalisé sur les CCS à ce jour.

Carcinomes corticosurrénaliens et immunothérapie

Devant le manque d'options thérapeutiques face aux maladies à un stade avancé et l'efficacité des inhibiteurs de *checkpoint* (CPI) dans d'autres cancers, des molécules sont actuellement à l'étude dans des essais thérapeutiques de phase I ou de phase II chez des patients atteints de CCS au stade avancé. (55,56) Il s'agit d'inhibiteurs de PD-1, de PD-L1, et de CTLA-4, parfois en monothérapie ou en association avec d'autres molécules comme des inhibiteurs de tyrosine kinase. Les résultats sont jusqu'ici décevants ou modestes, d'efficacité comparable à la chimiothérapie. (57–60) Cependant, les effectifs des études sont faibles et les mécanismes derrière le manque d'efficacité de l'immunothérapie chez les CCS avancés sont mal compris.

Un des premiers obstacles au succès de l'immunothérapie évoqué chez ces patients est le caractère fonctionnel des tumeurs. La sécrétion de glucocorticoïdes est déjà largement suspectée d'agir sur le type et quantité de cellules immunitaires infiltrant les tumeurs, mais elle pourrait également agir sur les systèmes de points de contrôle immunitaire.

Il a été démontré *in vitro* et *in vivo* que les corticoïdes augmentent l'expression de PD-1 et de CTLA-4 par les lymphocytes T (61,62) ce qui pourrait contribuer à diminuer l'efficacité de traitements ciblant ces récepteurs.

Maintenir des taux de GC circulants faibles chez les patients atteints de CCS à un stade avancé traités par CPI pourrait améliorer l'efficacité de ces derniers. L'action inhibitrice de la stéroïdogenèse du mitotane (déjà au centre de la prise en charge) combinée à l'immunothérapie mérite d'être évaluée dans de futurs essais cliniques, et a déjà été rapportée comme bénéfique sur un faible échantillon de patients. (63)

Des molécules restaurant les activités normales des voies Wnt/β-caténine ou p53/Rb, en association avec des inhibiteurs de *checkpoint* sont également une piste de développement. Cependant, les conséquences de ces altérations moléculaires sur l'immunité anti-tumorale au sein des CCS sont encore mal connues et les molécules ciblant ces voies n'en sont qu'au stade de la recherche clinique. (64,65)

Une autre problématique est de déterminer quels patients seraient susceptibles de répondre à un traitement par CPI. Les marqueurs prédictifs de réponse à ces molécules dans le traitement du CCS doivent être précisés. Ceux-ci sont nombreux et revêtent une importance variable en fonction du type de cancer considéré. L'expression immunohistochimique de PD-L1 par les cellules tumorales ou celles du microenvironnement, la charge mutationnelle tumorale et néoantigénique, la quantité et le type de cellules immunitaires intra-tumorales et autres biomarqueurs liés à la l'hôte en font partie. (66,67)

L'expression immunohistochimique de PD-L1 par les carcinomes corticosurrénaliens a été étudiée en 2015 par Fay *et al.* sur une série de 28 CCS et seulement 3 d'entre eux présentaient une expression considérée comme positive. (68)

Une étude plus récente effectuée sur 34 tumeurs retrouvait également une faible proportion d'expression immunohistochimique de PD-L1. Cependant, l'expression de PD-L2 était positive dans 44% des cas, suggérant un plus grand rôle joué par ce ligand dans les CCS. (69)

Il est important de noter qu'aucune étude à ce jour n'a montré de corrélation entre l'expression immunohistochimique de PD-L1 et la réponse aux CPI dans les CCS, principalement par manque de puissance statistique. Des études avec de plus grands effectifs et prenant également en compte l'expression de PD-L2 pourraient préciser l'utilité de l'étude immunohistochimique de ces marqueurs dans la prédiction de la réponse à l'immunothérapie.

Par ailleurs, de nombreux autres *checkpoints* immunitaires sont connus et il est possible que les phénomènes d'exclusion immunitaire au sein des CCS ne soient pas uniquement dépendants de l'axe PD-1/PD-L1/PD-L2. Récemment, Jiayu *et al.* ont étudié l'expression immunohistochimique de B7-H3 (CD276) sur 48 tumeurs. 44 d'entre elles présentaient une expression au moins focale, et plusieurs corrélations avec les caractéristiques cliniques des patients et leurs survies globale et sans récidive ont été établies. (70)

Cependant, l'évaluation de l'expression immunohistochimique de ce marqueur dans le cancer n'est pas encore standardisée et interprétée de différentes manières dans d'autres études. (71) Ces résultats sont donc discutables.

De manière intéressante, l'étude transcriptomique réalisée par Muzzi *et al.* révélait une forte expression de B7-H3 aussi bien chez les tumeurs « *Low Steroid Phenotype* » et « *High Steroid Phenotype* », alors que PD-1, PD-L1 et PD-L2 étaient principalement exprimés par les tumeurs « LSP ». (44) Ces résultats indiquent que le rôle d'autres *checkpoints* immunitaires mérite d'être exploré au sein des CCS, d'autant plus que l'expression de B7-H3 dans le cancer a été décrite comme ayant de nombreux effets pro-tumoraux et associée à un pronostic péjoratif. (72)

Enfin, la charge mutationnelle, ou « *tumor mutational burden* » (TMB) représente le nombre de mutations par mégabase du génome codant d'une tumeur. De nombreuses mutations entraîneraient l'expression de nombreux néoantigènes et favoriseraient la réponse immunitaire anti-tumorale, en particulier après inhibition de l'axe PD-1/PD-L1/PD-L2. Une tumeur fortement mutée (« *TMB high* ») est définie par une charge mutationnelle supérieure ou égale à 10 mutations par mégabase. L'efficacité de ce biomarqueur dans la prédiction de la réponse à l'immunothérapie est variable en fonction des cancers.

L'étude de la charge néoantigénique (« *neoantigen load* ») et de son affinité avec le système immunitaire de l'hôte est également un marqueur performant de réponse à l'immunothérapie. (66,67,73)

Le TMB des CCS est classé comme intermédiaire en comparaison avec celui des autres néoplasies (74), avec toutefois une charge mutationnelle élevée dans ses localisations métastatiques en comparaison avec la lésion primitive. (75)

Une étude *in silico* utilisant les 92 CCS de la base de données du TGCA a montré qu'il n'existait pas de corrélation entre leur charge mutationnelle et le niveau d'expression de PD-L1 ou de CTLA-4. La relation avec PD-L2 et B7-H3 n'a pas été étudiée. Il n'existait pas non plus de corrélation entre le TMB et les TILs, ce qui suggèrerait une faible implication de ce biomarqueur dans l'immunité anti-tumorale et en ferait un mauvais marqueur prédictif de réponse à l'immunothérapie dans les CCS. (76)

Pour autant, Bonneville *et al.* ont décrit que 4,3% de ces 92 CCS présentaient une instabilité microsatellitaire, fortement corrélée à une charge mutationnelle élevée. (77) Il est déjà décrit que le statut MSI est un bon marqueur prédictif de la réponse au blocage de l'axe PD-1/PD-L1/PD-L2. (78) De rares cas de CCS MSI ayant répondu à l'immunothérapie sont décrits dans la littérature (60), mais des études à plus grande échelle sont nécessaires pour déterminer si l'instabilité microsatellitaire chez ces tumeurs pourrait être un marqueur prédictif de réponse aux CPI.

OBJECTIFS

Le microenvironnement tumoral des carcinomes corticosurrénaliens est encore mal connu. Peu de travaux ont été réalisés sur des coupes histologiques d'échantillons tissulaires, et les effectifs restaient modestes. A notre connaissance, l'étude de Landwehr *et al*. est la plus large portant sur les TILs dans les CCS, avec 107 tumeurs primitives, 16 récidives loco-régionales, et 23 métastases analysées. (42). L'expression immunohistochimique des *checkpoints* immunitaires mérite également de plus amples investigations. Ce travail a donc pour objectif de décrire les populations leucocytaires au sein des CCS et d'étudier l'expression de potentiels marqueurs théranostiques.

Objectif principal

La répartition des CCS sécrétants et non-sécrétants de glucocorticoïdes est quasi-équivalente. Ces derniers jouant un rôle prépondérant dans l'immunité anti-tumorale, nous nous sommes proposés d'étudier la composition et la teneur des différentes populations lymphocytaires T intra-tumorales en fonction du caractère sécrétant ou non de ces tumeurs. Ceci permettra de corroborer ou de contredire le peu de résultats disponibles sur ce sujet dans la littérature.

Les TILs étudiés étaient les lymphocytes T *helpers* CD4+ et les lymphocytes T cytotoxiques CD8+.

Objectifs secondaires

Les techniques réalisées nous ont également permis de nous fixer plusieurs objectifs secondaires. En plus des populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+, nous avons étudiés d'autres populations leucocytaires telles que les lymphocytes T cytotoxiques activés, les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes B, les macrophages et les mastocytes intra-tumoraux. Des marqueurs théranostiques tels que PD-1, PD-L1 et CTLA-4 ont également été évalués.

Ces variables ont été comparées en fonction du caractère sécrétant ou non des tumeurs étudiées, et du score pronostique S-GRAS calculé pour chaque patient. Ceci dans un but descriptif, mais aussi afin de déterminer si ces variables sont influencées par d'autres facteurs que le caractère fonctionnel tumoral.

Enfin, nous avons étudié la survie globale et la survie sans récidive des patients en fonction du caractère fonctionnel ou non de leurs tumeurs, puis en combinant ce paramètre avec la teneur intra-tumorale en lymphocytes T CD4+, CD8+ et en mastocytes. Les données de la littérature semblent suggérer que ces types leucocytaires jouent un rôle important dans l'immunité anti-tumorale dans les CCS et nous avons voulu déterminer leur valeur pronostique.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

Critères d'inclusion, d'exclusion et sélection des cas

Ce travail est une étude rétrospective effectuée sur une série de carcinomes corticosurrénaliens sélectionnés à l'aide du logiciel de gestion de laboratoire Diamic® développé par la société Dedalus, utilisé à l'Institut de Pathologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille.

Les cas inclus étaient représentés par toutes les tumeurs corticosurrénaliennes opérées entre 2014 et 2021 au sein du CHU de Lille dont le diagnostic anatomopathologique reposait sur un score de Weiss ≥ 3 soit un carcinome corticosurrénalien ou une tumeur corticosurrénalienne de pronostic incertain.

Les cas exclus étaient les cas pédiatriques, ceux pour lesquels le service ne disposait pas d'échantillon tissulaire de la tumeur primitive (cas adressés pour avis), et ceux où le matériel prélevé était insuffisant pour réaliser les techniques nécessaires à l'étude.

Les cas sélectionnés étaient au nombre de 45. Les lames et les blocs ont été désarchivés. Les cas ont fait l'objet d'une relecture systématique au microscope par le pathologiste junior et le pathologiste sénior.

Une tumeur de pronostic incertain (Weiss 3) fut reclassée en carcinome (Weiss 5) et une autre était exclue de l'étude car il n'était pas retrouvé suffisamment de critères de Weiss pour aboutir à un score $\geq$ 3 sur le matériel disponible. Le nombre final de cas étudiés était donc de 44.

Les données clinico-biologiques des patients utilisées pour ce travail étaient obtenues en collaboration avec l'équipe médicale du Service d'Endocrinologie Clinique de l'hôpital Claude Huriez du CHU de Lille. Elles ont ensuite été consignées dans un fichier informatisé et anonymisé (déclaration CNIL n°2227573)

Pour notre étude, le caractère sécrétant ou non des tumeurs était défini par la traduction clinico-biologique d'un hypercortisolisme, comme recommandé par l'ENSAT (79), soit un taux plasmatique de cortisol élevé après test de freinage fort par la dexaméthasone (test de Nugent). Si celui-ci n'était pas renseigné, un cortisol libre urinaire (CLU) élevé était utilisé pour définir une tumeur comme sécrétante.

Le calcul du score S-GRAS a été effectué pour chaque patient à partir des données cliniques fournies comme décrit dans l'étude menée par l'ENSAT sur le score GRAS modifié. Les patients étaient subdivisés en 4 sous-groupes : S-GRAS = 0-1, 2-3, 4-5 et 6-9. (16)

Les survies globale (OS) et sans progression (PFS) étaient recueillies en jours à partir de la date du diagnostic jusqu'à l'évènement considéré (décès ou progression de la maladie), ou jusqu'à la date des dernières nouvelles.

Réalisation des Tissue Microarrays

Le *Tissue Microarray* (TMA) est une technique utilisée en anatomopathologie permettant de concentrer plusieurs prélèvements de différents patients sur un même bloc de paraffine et ainsi diminuer le temps opérateur et le coût en réactifs pour la réalisation d'analyses ultérieures. Des blocs d'intérêt sont sélectionnés puis échantillonnés à l'aide d'un punch. Les carottes de bloc ainsi obtenues sont coulées dans un nouveau bloc de paraffine receveur (cf. fig. 16)

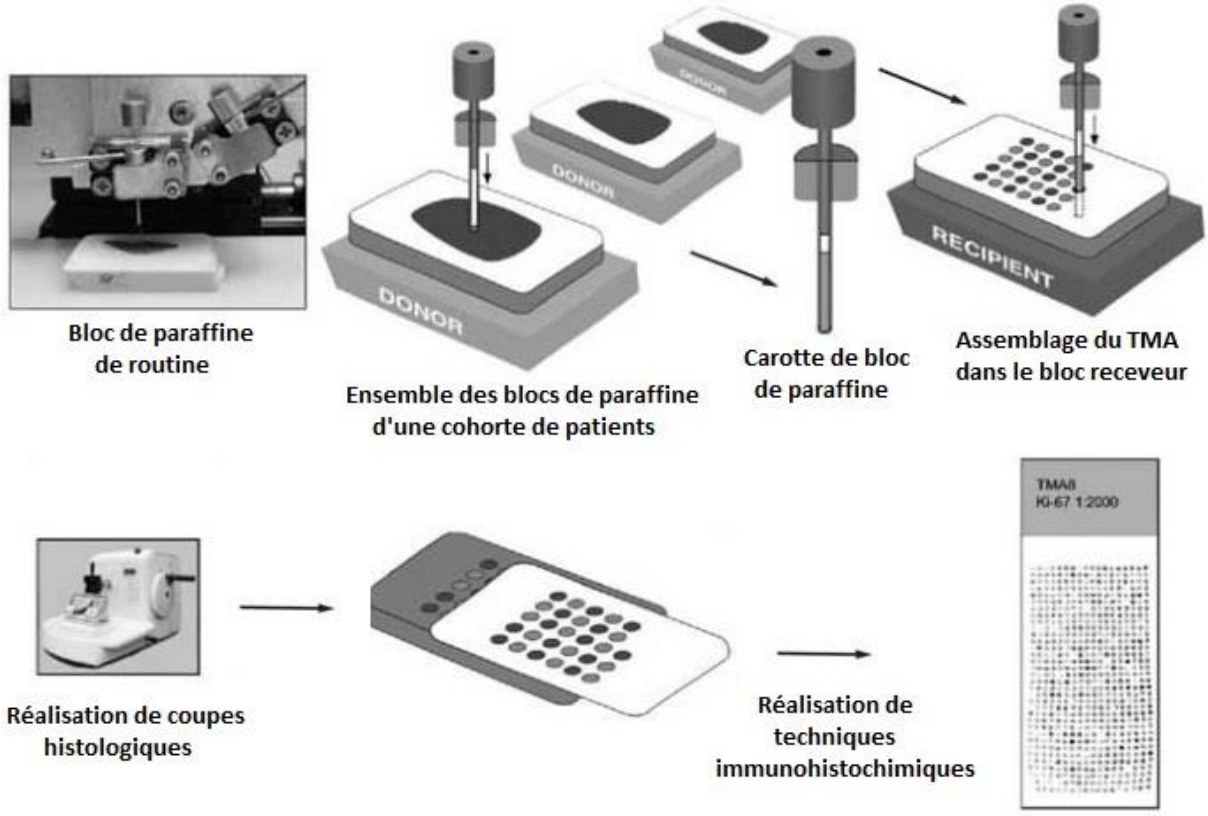


Figure 16. Réalisation de *tissue microarrays* en anatomopathologie
Source : Giltnane et Rimm : *Technology Insight : identification of biomarkers with tissue microarray technology, Nature Clinical Practice Oncology, 2004*

Les coupes histologiques de chaque patient ont été relues afin de sélectionner les zones les plus représentatives des tumeurs pour la construction des blocs de TMA. Les zones de nécrose et de fibrose ont été évitées. Pour chaque tumeur, 2 spots en périphérie (sous la capsule lésionnelle lorsqu'elle était présente) et 1 spot en profondeur de la tumeur ont été sélectionnés, ainsi que 2 spots de surrénale saine servant de témoin.

Deux carottes de 1 mm ont été prélevées au punch par spot tumoral et une par spot de tissu sain, pour un total de 8 blocs de TMA réalisés à l'aide d'un *tissue microarrayer* semi-automatique Minicore® (société Excilone, France). Une fois les lames réalisées, chaque patient présentait 2 spots de tissu sain analysables, 4 de tissu tumoral périphérique, et 2 de tissu tumoral profond (cf. fig. 17)

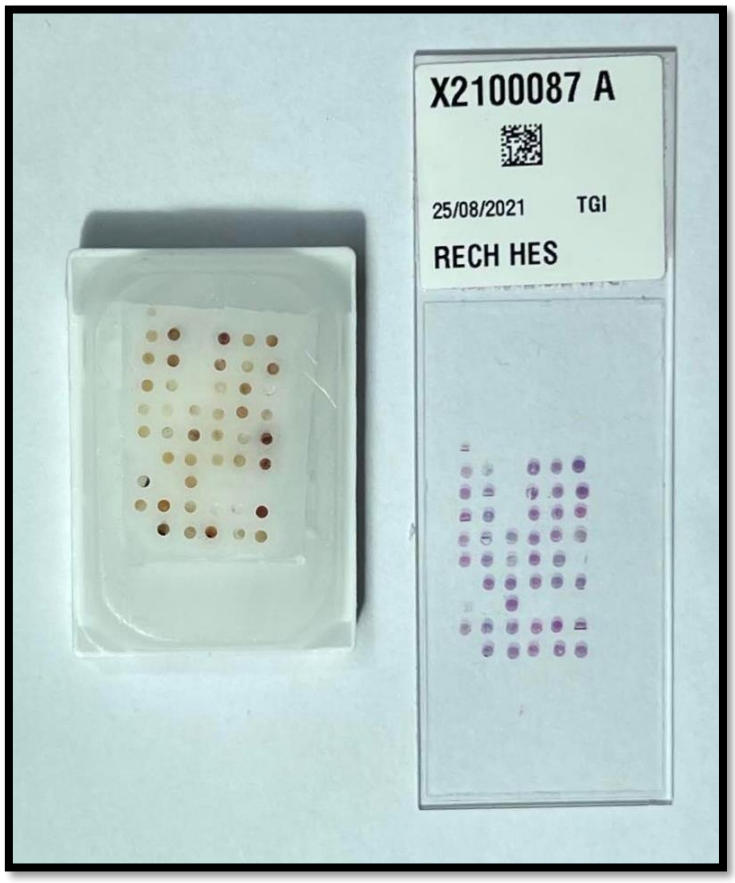


Figure 17. Exemple de réalisation de coupe HES à partir d'un bloc de TMA

Analyse Immunohistochimique

Réalisation des techniques

Les blocs de TMA ont ensuite été coupés au microtome réalisant des coupes de 4 µm d'épaisseur, étalées à l'eau distillée sur des lames silanées (DakoFlex®). Une coupe de tissu amygdalien y était ajoutée pour servir de témoin externe aux techniques immunohistochimiques. Ces dernières étaient automatisées, réalisées sur un automate Benchmark ULTRA® (société Roche, Suisse). Hormis les solutions d'anticorps, tous les réactifs utilisés provenaient de la société Roche.

Les lames ont été soumises à une étape de déparaffinage à l'aide d'une solution EZ-prep diluée à une concentration 1X, à une température de 72°C, suivie d'une étape de réhydratation par 3 lavages par un *Reaction Buffer* à 36°C. Le démasquage antigénique a été effectué à 100°C pendant 30 à 92 minutes selon l'anticorps considéré dans une solution tampon Tris de pH 8,2 (*Cell Conditioning Solution* 1, CC1), suivi d'un blocage des peroxydases endogènes avec du peroxyde d'hydrogène pendant 4 minutes.

Les lames ont ensuite été incubées avec les anticorps primaires à 37°C pendant 16 à 62 minutes, dont les caractéristiques sont résumées dans le tableau ci-dessous (cf. Tableau 1)

Tableau 1. Caractéristiques des anticorps primaires utilisés pour l'analyse immunohistochimique

Anticorps	Fabricant / Distributeur	Référence	Dilution	Hôte	Clone
CD 4	Ventana Roche	790-4423	Prédilué	Rabbit	SP35
CD 8	Dako	M7103	1/25	Mouse	C8/144B
Granzyme B	Dako	M7235	1/100	Mouse	GrB-7
FoxP3	Abcam	ab20034	1/100	Mouse	236A/E7
CD 20	Bio SB	BSB 5195	1/150	Mouse	L26
CD 117	Dako	A4502	1/200	Rabbit	Polyclonal
CD 68	Ventana Roche	790-2931	Prédilué	Mouse	KP1
PD-1	Ventana Roche	760-4895	Prédilué	Mouse	NAT105
CTLA4	BioSB	BSB-88	1/25	Mouse	BSB-88
PD-L1	Dako	M3653	1/50	Mouse	22C3
β-caténine	Biosciences	610153	1/500	Mouse	14/Bcatenin
MLH1	Ventana Roche	790-4535	Prédilué	Mouse	G168-728
PMS2	Ventana Roche	760-5094	Prédilué	Mouse	A16-4
MSH2	Ventana Roche	760-4265	Prédilué	Mouse	G219-1129
MSH6	Ventana Roche	790-4455	Prédilué	Mouse	44

Pour tous les anticorps primaires sauf PD-L1, β-caténine, CTLA-4 et PMS2 la révélation du complexe antigène-anticorps a été réalisée à l'aide d'un kit *ultraView Universal DAB Detection*®. Un cocktail d'anticorps secondaires anti-lapin et anti-souris marqués à la peroxydase de raifort (*HRP multimer*) a servi à l'amplification du signal. L'incubation était de 8 minutes à 37°C.

Pour PD-L1, β-caténine, CTLA-4 et PMS2 le kit de révélation était l'*Optiview Universal DAB Detection*®. Un cocktail d'anticorps secondaires (*HQ linker*) était également utilisé pendant 8 à 12 minutes, suivi d'une incubation par un cocktail d'anticorps tertiaires (*HRP multimer*) pendant 8 à 12 minutes. L'amplification était réalisée par incubation pendant 4 minutes dans un mélange de peroxyde d'hydrogène et de tyramide inactive, suivie d'une incubation de 4 minutes avec un anticorps anti-HQ.

Enfin, la révélation du complexe antigène-anticorps était effectuée à l'aide de diaminobenzidine associée à du peroxyde d'hydrogène pendant 8 minutes. Les lames étaient contre-colorées à l'hématoxyline et post-colorées au *bluing reagent*. Un dernier rinçage était réalisé, suivi d'une déshydratation par bains successifs d'éthanol à 70%, 96%, 100%, puis de xylène pendant 2 minutes. Les coupes ont ensuite été montées entre lame et lamelle.

Numérisation des lames

Les lames étaient ensuite numérisées à l'aide d'un scanner à lames Ventana iScan HT® (Roche), pour une résolution maximale de 0,227 µm/pixel au grossissement x40, permettant l'interprétation à l'aide d'un logiciel tiers.

Interprétation des immunohistochimies

Une fois numérisées, les lames d'immunohistochimie étaient interprétées à l'aide du logiciel d'analyse d'images QuPath® (université d'Edimburg). Les comptes cellulaires étaient effectués à l'aide de la fonction comptage du logiciel (cf. fig 18). Pour le tissu sain, tumoral périphérique et tumoral profond, le nombre cellules comptées était exprimé en cellules par mm^2, après calcul de la moyenne arithmétique de tous les spots comptés.

Pour les marquages immunohistochimiques anti-CD4, CD8, CD20, CTLA-4 et PD-1, un marquage était considéré positif si membranaire, complet ou incomplet, , et centré sur un noyau de la taille d'un lymphocyte (cf. fig 18). Les immunohistochimies anti-CD68 et CD117 étaient considérées positives en cas de marquage membranaire complet ou incomplet autour d'un noyau non tumoral. L'immunohistochimie anti-granzyme B était considérée positive en cas de marquage golgien périnucléaire d'un lymphocyte. L'immunohistochimie anti-FoxP3 était considérée positive en cas de marquage nucléaire d'un noyau de la taille d'un lymphocyte (cf. fig 19).

L'immunohistochimie anti-PD-L1 était considérée comme positive en cas de marquage membranaire complet ou incomplet de cellules tumorales ou immunitaires (cf fig. 19) et permirent de calculer 2 scores utilisés en pathologie de routine (80) :

- Le *Tumor Proportion Score* (TPS) exprimant le pourcentage de cellules tumorales exprimant PD-L1. Les tumeurs étaient classées en 3 catégories : 0 (TPS < 1%), 1 (TPS 1-49%) et 2 (TPS $\geq$ 50%)

$$TPS = \frac{\text{nombre de cellules tumorales marquées}}{\text{nombre de cellules tumorales viables}} \times 100$$

- Le *Combined Positive Score* (CPS) prenant en compte l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales et les cellules immunitaires. Les tumeurs étaient classées en 2 catégories : 0 (CPS < 1) et 1 (CPS $\geq$ 1)

$$CPS = \frac{\text{nombre de cellules tumorales et immunitaires marquées}}{\text{nombre de cellules tumorales viables}} \times 100$$

L'étude immunohistochimique des protéines Mismatch Repair (MMR) a été effectuée. Une tumeur était considérée comme de phénotype MSI si l'expression nucléaire par les cellules tumorales d'un des deux couples (MLH1/PMS2 ou MSH2/MSH6) était perdue.

Une étude immunohistochimie de l'expression de la β-caténine sur coupes entières a également été réalisée et prenait en compte le pourcentage de cellules tumorales présentant un marquage membranaire, et le pourcentage de cellules tumorales présentant un marquage nucléaire et plus ou moins membranaire.

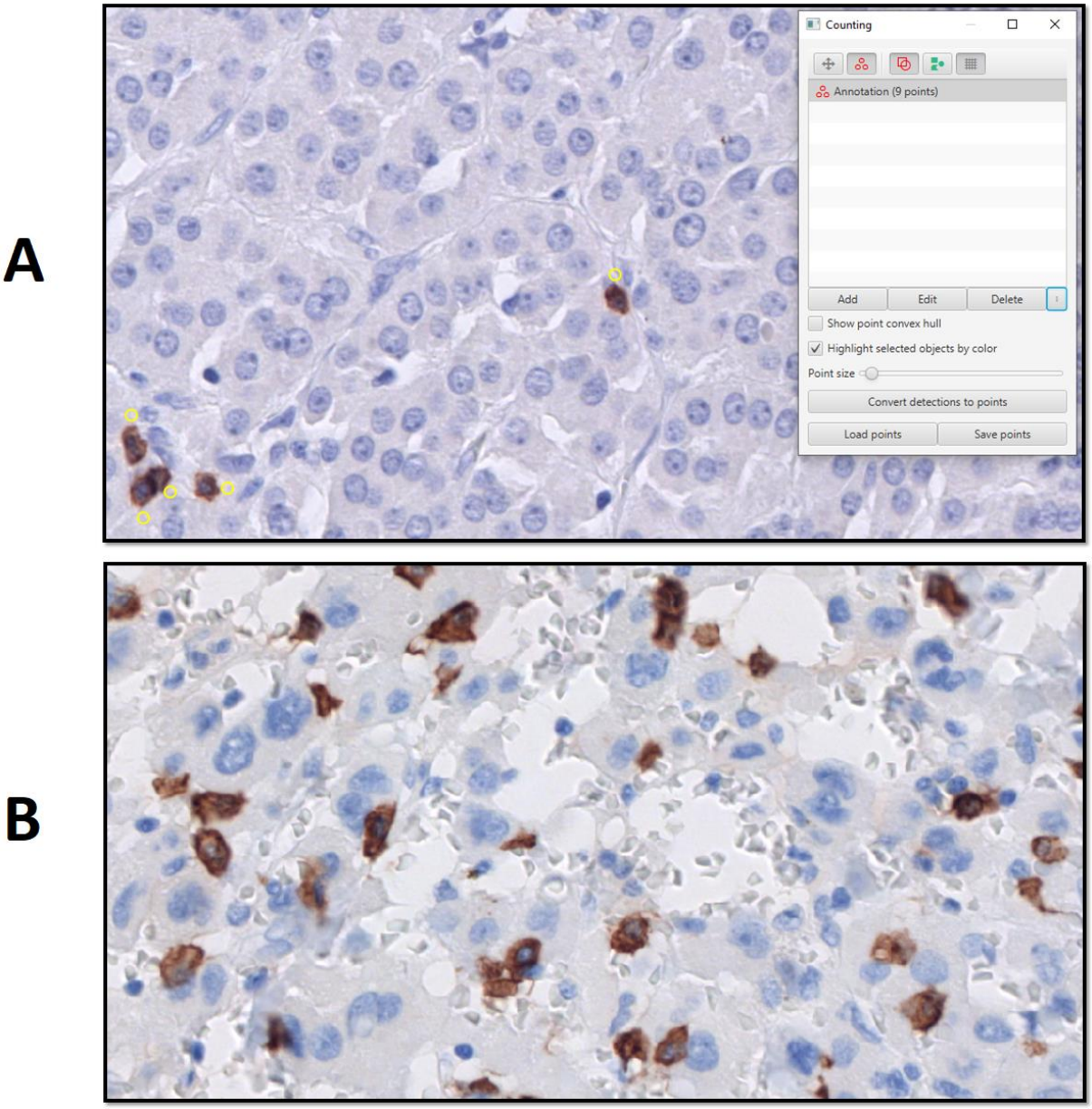


Figure 18. (A) Utilisation de la fonction comptage du logiciel QuPath® permettant un compte exhaustif des cellules marquées
(B) Exemple de marquage membranaire, ici après étude immunohistochimique par l'anticorps anti-CD117, révélant les mastocytes intra-tumoraux.

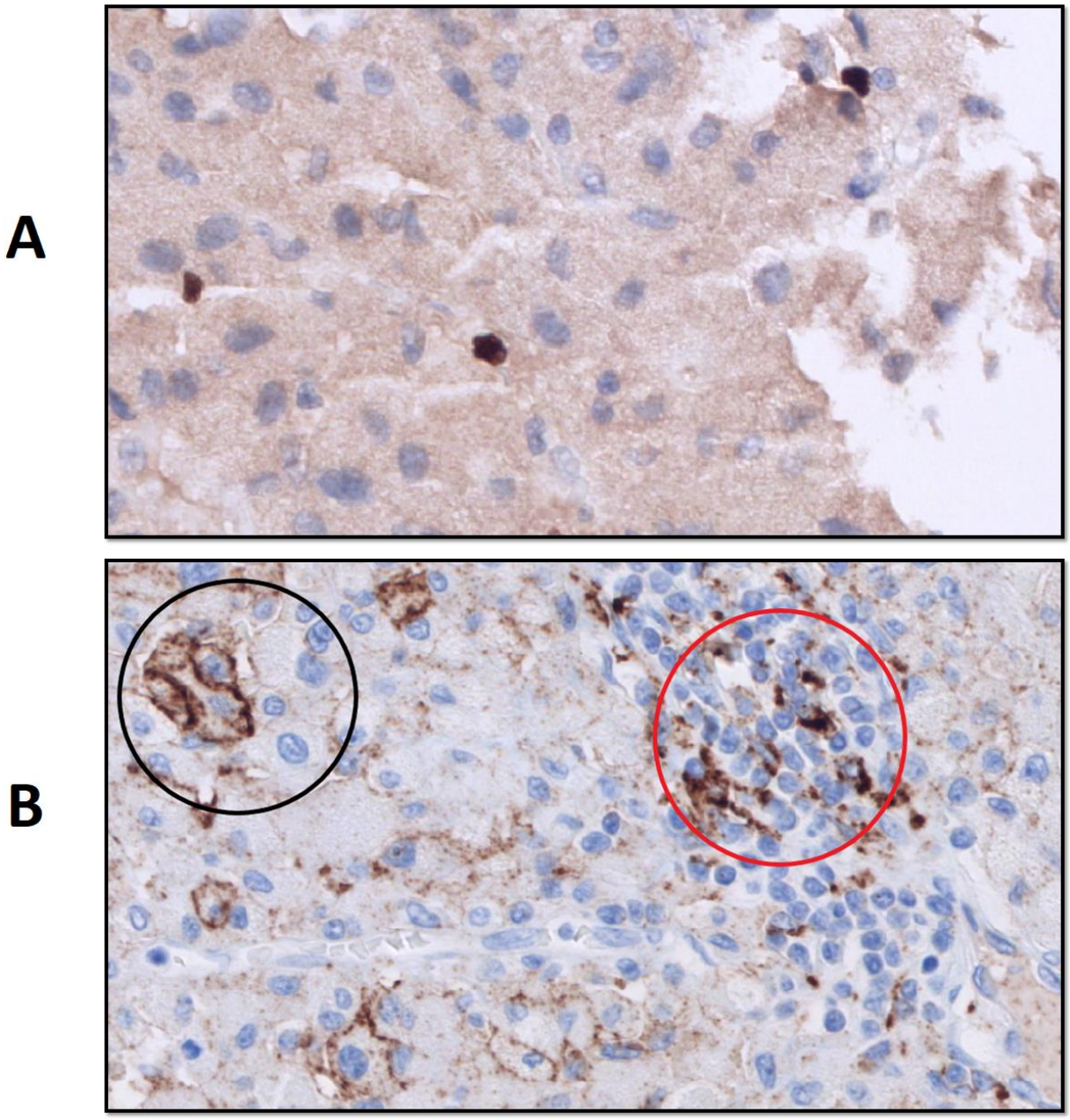


Figure 19. (A) Exemple de marquage nucléaire de lymphocytes après étude immunohistochimie par l'anticorps anti-FoxP3.
(B) Exemple de marquage membranaire après étude immunohistochimique par l'anticorps anti-PD-L1. Présence de cellules tumorales (entourées en noir) et immunitaires (rouge) marquées.

Analyse statistique

Les variables qualitatives (statut fonctionnel tumoral, score S-GRAS, scores TPS et CPS) ont été décrites en termes de fréquences et de pourcentages. Les variables quantitatives (nombre de cellules marquées par mm^2, rapports de populations leucocytaires) ont été décrites par la moyenne et l'écart type ou par la médiane et l'intervalle interquartile en cas de distribution non gaussienne. La normalité des distributions a été vérifiée graphiquement et à l'aide du test de Shapiro-Wilk.

L'infiltrat inflammatoire de la périphérie des tumeurs a été comparé à celui de la profondeur à l'aide du test des rangs signés de Wilcoxon.

Les tumeurs sécrétantes ont été comparées aux tumeurs non sécrétantes à l'aide du test U de Mann-Whitney.

Les 4 groupes pronostiques issus du S-GRAS ont été comparés à l'aide du test de Kruskal-Wallis ; en cas de résultat significatif, les comparaisons post-hoc 2 à 2 ont été réalisées à l'aide du test de Dunn après application d'une correction de Bonferroni.

Les survies globale et sans récidive des patients ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier et comparées entre les tumeurs sécrétantes et non-sécrétantes à l'aide d'un modèle de Cox à risques proportionnels. La survie globale et la survie sans récidive ont également été comparées entre les patients ayant un rapport CD4/CD8 inférieur à 1 et ceux ayant un rapport supérieur ou égal à 1, et selon la présence ou non de mastocytes intra-tumoraux à l'aide de la même méthode.

Le niveau de significativité a été fixé à 5%. Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel SAS (SAS Institute version 9.4)

RÉSULTATS

Données descriptives

Au sein des 44 patients sélectionnés pour l'étude, l'âge médian au diagnostic était de 53 ans, avec 72,7% de femmes soit un ratio femme/homme proche de 2,5. La répartition entre tumeurs sécrétantes et non-sécrétantes était équilibrée, avec 45,5% de CCS sécrétants et 54,5% de non-sécrétants.

Les patients avec tumeurs non-sécrétantes possédaient des scores S-GRAS plutôt répartis dans les 2 premières tranches pronostiques (scores 0-1 et 2-3), au contraire de ceux des patients ayant des tumeurs sécrétantes, qui se situaient dans les 2 dernières (scores 4-5 et 6-9). Ceci s'explique par le fait que les facteurs pronostiques utilisés pour le calcul du score étaient dans des catégories plus péjoratives chez les tumeurs sécrétantes. En effet, il était retrouvé chez ces patients un stade ENSAT plus avancé, un index de prolifération selon le Ki67 plus élevé, et une plus grande proportion de résections incomplètes (R1). Au sein de notre série, les tumeurs sécrétantes exhibaient proportionnellement plus de critères histopronostiques d'agressivité (score de Weiss, Ki67…) que les non-sécrétantes.

La majorité des variants histologiques oncocytaires (77,8%) étaient retrouvés parmi les CCS non-sécrétants (cf. Tableau 2)

Tableau 2. Caractéristiques cliniques et anatomopathologiques des 44 CCS étudiés (valeurs absolues, %)

	CCS non-sécrétants n = 24 (54.5)	**CCS sécrétants (glucocorticoïdes +/- autres hormones)** n = 20 (45.5)
Sexe		
- Homme	6 (13.6)	6 (13.6)
- Femme	18 (10.9)	14 (31.8)
Âge au diagnostic		
- < 50	14 (31.8)	7 (15.9)
- ≥ 50	10 (22.7)	13 (29.5)
Stade ENSAT		
- I	2 (4.5)	2 (4.5)
- II	17 (38.6)	3 (6.8)
- III	3 (6.8)	10 (22.7)
- IV	2 (4.5)	5 (11.7)
Resection status		
- R0	21 (47.7)	14 (31.8)
- Rx	1 (2.3)	0 (0)
- R1	1 (2.3)	6 (13.6)
- R2	1 (2.3)	0 (0)
Index Ki67		
- 0-9 %	13 (29.5)	2 (4.5)
- 10-19 %	6 (13.6)	7 (15.9)
- ≥ 20 %	5 (11.4)	11 (25)
Score S-GRAS		
- 0-1	13 (29.5)	1 (2.3)
- 2-3	7 (15.9)	3 (6.8)
- 4-5	1 (2.3)	8 (18.2)
- 6-9	4 (9.1)	7 (15.9)
Sous-type histologique		
- Conventionnel	17 (38.6)	17 (38.6)
- Oncocytaire	7 (15.9)	2 (4.5)
- Myxoïde	0 (0)	1 (2.3)
Score de Weiss (variants oncocytaires exclus : n = 36)	**Non-sécrétants** n = 18 (50)	**Sécrétants** n = 18 (50)
- 3-5	8 (22.2)	1 (2.8)
- 6-9	10 (27.8)	17 (47.2)

Étude des TILs CD4+ et CD8+ en fonction du caractère sécrétant

Au sein de notre série, la périphérie des tumeurs sécrétantes possédait significativement moins de TILs CD4+ par mm² que les non-sécrétantes (p = 0,014). Une tendance non significative était observée dans la profondeur des tumeurs. De même, il était significativement retrouvé moins de TILs CD8+ par mm² chez les tumeurs sécrétantes, en périphérie et en profondeur (p = 0,017 et p = 0,035 respectivement) (cf. Tableau 3)

Tableau 3. Comparaison du nombre de TILs CD4+ et CD8+ par mm² en périphérie (p) et en profondeur (t) des CCS selon leur caractère sécrétant ou non

	Cohorte totale	**CCS non-sécrétants**	**CC sécrétants**	**Valeur du *p***
CD4p	38 ± 58[a] 17 (7 ; 41)[b] 2 | 284[c]	57.9 ± 73.3 23 (9 ; 76) 3 | 284	15.1 ± 13 11 (4.5 ; 19) 2 | 45	**p = 0.014**
CD4t	33.6 ± 52.3 18 (9 ; 31) 2 | 284	47.6 ± 67.4 24 (9 ; 43) 5 | 284	17.4 ± 16.4 12.5 (7.5 ; 23) 2 | 72	p = 0.057
CD8p	58.7 ± 91.2 22 (8 ; 55) 2 | 395	89.8 ± 114.5 45 (13 ; 125) 4 | 395	22.9 ± 25.9 13.5 (7,5 ; 34) 2 | 112	**p = 0.017**
CD8t	32.3 ± 37.4 15 (7 ; 44) 0 | 142	46.5 ± 44.6 37 (9 ; 82) 1 | 142	15.2 ± 13.8 14 (4,5 ; 19) 0 | 56	**p = 0.035**

[a] : Moyenne ± écart-type

[b] : Médiane (Q1 ; Q3)

[c] : Minimum | Maximum

Étude des populations leucocytaires et marqueurs théranostiques en fonction du caractère sécrétant

L'étude des autres populations leucocytaires a mis en évidence une différence significative du rapport granzyme B_{totaux}/$CD8_{totaux}$ (représentant la proportion de lymphocytes T CD8 activés par rapport à la population CD8 totale) qui était plus élevé chez les tumeurs sécrétantes ($p = 0,021$). Il était retrouvé significativement moins de lymphocytes B (CD20) en périphérie des tumeurs sécrétantes ($p = 0,034$). Une tendance similaire non-significative était observée en profondeur.

Enfin, il était retrouvé significativement moins de mastocytes (CD117) en périphérie et en profondeur des tumeurs sécrétantes ($p < 0,001$ et $p < 0,001$ respectivement).

L'étude des autres populations leucocytaires (macrophages CD68+ et lymphocytes T *helper*s FoxP3+) ne mettait pas en évidence de différence significative (cf. Tableau 4)

L'étude des marqueurs théranostiques n'a pas montré de différence significative au niveau de l'expression de PD-1 et de CTLA-4. La différence d'expression de PD-L1 via le TPS ou le CPS n'a pas pu être évaluée statistiquement car une trop grande majorité des tumeurs (84,1%) ne présentait pas d'expression (cf. Tableau 5)

Tableau 4. Comparaison du nombre de leucocytes par mm² en périphérie (p) et en profondeur (t) des CCS selon leur caractère sécrétant ou non

	Cohorte	Non-sécrétants	Sécrétants	Valeur du *p*
Rapport CD4/CD8p	1.4 ± 2.3[a] 0.8 (0.4 ; 1.7)[b] 0.1 | 14.6[c]	1.6 ± 3.0 0.7 (0.3 ; 2.1) 0.1 | 14.6	1.1 ± 0.9 0.8 (0.4 ; 1.6) 0.1 | 3.3	0.73
Rapport CD4/CD8t	2.1 ± 2.8 0.9 (0.6 ; 2.8) 0.3 | 12	2.3 ± 3.1 0.8 (0.6 ; 3.1) 0.3 | 12	1.9 ± 2.4 1.2 (0.6 ; 2.2) 0.3 | 11	0.63
Rapport granzyme$_{totaux}$/CD8$_{totaux}$	0.2 ± 0.2 0.1 (0 ; 0.3) 0 | 0.9	0.1 ± 0.2 0 (0 ; 0.3) 0 | 0.4	0.3 ± 0.2 0.2 (0.1 ; 0.3) 0 | 0.9	**0.021**
Rapport FoxP3/CD4	0.2 ± 0.2 0.1 (0 ; 0.2) 0 | 1	0.1 ± 0.2 0.1 (0 ; 0.2) 0 | 0.7	0.2 ± 0.3 0.1 (0.1 ; 0.3) 0 | 1	0.32
CD20p	12.3 ± 57.5 1 (0 ; 4) 0 | 378	21.7 ± 78.1 1 (0 ; 9) 0 | 378	1.5 ± 2.9 0 (0 ; 2) 0 | 12	**0.034**
CD20t	3.2 ± 8.3 1 (0 ; 2) 0 | 41	4.6 ± 10.4 1 (0 ; 4) 0 | 41	1.7 ± 4.9 0 (0 ; 1) 0 | 22	0.058
CD68p	467.9 ± 273.3 410 (292 ; 542) 146 | 1509	532 ± 334.6 455 (301 ; 676) 146 | 1509	394.2 ± 157.4 354 (258 ; 532) 193 | 700	0.22

[a] : Moyenne ± écart-type

[b] : Médiane (Q1 ; Q3)

[c] : Minimum | Maximum

Tableau 4. (suite)

	Cohorte	Non-sécrétants	Sécrétants	Valeur du *p*
CD68t	481.4 ± 275.1 463.5 (291 ; 631) 112 | 1474	526.7 ± 311.6 505.5 (291 ; 761) 118 | 1474	427.1 ± 219.3 402 (279.5 ; 560) 112 | 1018	0.32
CD117p	14.2 ± 58.1 0 (0 ; 4) 0 | 365	26.3 ± 78.2 3 (1 ; 16) 0 | 365	0.2 ± 0.7 0 (0 ; 0) 0 | 3	**<0.001**
CD117t	7.3 ± 37.7 0 (0 ; 2) 0 | 251	13.4 ± 50.8 1.5 (0 ; 5.5) 0 | 251	0.1 ± 0.3 0 (0 ; 0) 0 | 1	**<0.001**

Tableau 5. Comparaison du nombre de TILs exprimant CTLA-4, PD-1 par mm² en périphérie (p) et en profondeur (t), du TPS et du CPS des CCS selon leur caractère sécrétant ou non

	Cohorte	**Non-sécrétants**	**Sécrétants**	**Valeur du *p***
CTLA-4p	2.1 ± 4.6[a] 0 (0 ; 1)[b] 0 | 22[c]	2.7 ± 5.1 0 (0 ; 4) 0 | 22	1.6 ± 4.1 0 (0 ; 1) 0 | 17	0.44
CTLA-4t	2.1 ± 3.6 1 (0 ; 2) 0 | 17	2.7 ± 4.3 1 (0 ; 4) 0 | 17	1.4 ± 2.5 0 (0 ; 1.5) 0 | 9	0.21
PD-1p	2.7 ± 7.3 0 (0 ; 1) 0 | 37	3.6 ± 8.5 0 (0 ; 2) 0 | 37	1.7 ± 5.6 0 (0 ; 0) 0 | 25	0.091
PD-1t	1.4 ± 3.5 0 (0 ; 1) 0 | 17	1.5 ± 3.6 0 (0 ; 1) 0 | 17	1.3 ± 3.6 0 (0 ; 1) 0 | 16	0.52
TPS - < 1 % - 1-49 % - ≥ 50 %	 37 (84.1) 6 (13.6) 1 (2.3)	 19 (79.2) 4 (16.7) 1 (4.2)	 18 (90) 2 (10) 0 (0)	Non applicable
CPS - < 1 - ≥ 1	 39 (88.6) 5 (11.4)	 20 (83.3) 4 (16.7)	 19 (95) 1 (5)	Non applicable

[a] : Moyenne ± écart-type

[b] : Médiane (Q1 ; Q3)

[c] : Minimum | Maximum

Étude des populations leucocytaires et marqueurs théranostiques en fonction du score S-GRAS

La comparaison des différentes populations leucocytaires ainsi que de l'expression de CTLA-4, PD-1 et PD-L1 en fonction de l'appartenance aux 4 groupes pronostiques établis à l'aide du score S-GRAS n'a montré que de rares différences significatives (cf. Annexe 1)

Il a été retrouvé significativement moins de TILs CD4+ en périphérie des tumeurs des patients S-GRAS = 4-5 par rapport aux patients S-GRAS = 0-1.

La périphérie des tumeurs des patients S-GRAS = 4-5 et 6-9 contenait significativement moins de TILs CD8+ que celles des patients S-GRAS = 0-1.

Enfin, il était retrouvé significativement moins de mastocytes (CD117) en périphérie des tumeurs des patients S-GRAS = 2-3, 4-5 et 6-9 par rapport aux patients S-GRAS = 0-1.

Résultats complémentaires

Comparaison du microenvironnement tumoral entre la périphérie et la profondeur des tumeurs

Dans un but descriptif, le microenvironnement de la périphérie et la profondeur des tumeurs a été comparé. Il était significativement retrouvé plus de TILs CD8, de TILs CD8 activés (granzyme B) et de mastocytes (CD117) en périphérie des tumeurs par rapport à la profondeur. Aucune différence n'a été observée pour les autres populations leucocytaires, ou pour l'expression de CTLA-4 et PD-L1 (cf. Tableau 6)

Tableau 6. Comparaison du microenvironnement entre périphérie (p) et profondeur (t) des tumeurs

	Moyenne ± écart-type	**Médiane (Q1 ; Q3)**	**Minimum | Maximum**	**Comparaison (*valeur du p*)**
CD4p **CD4t**	37.6 ± 58.6 32.2 ± 52.1	16.5 (7 ; 39) 16.5 (9 ; 31)	2 | 284 2 | 284	0.7216
CD8p **CD8t**	58.7 ± 91.2 31 ± 36.9	22 (8 ; 55) 15 (7 ; 42)	2 | 395 0 | 142	**0.0025**
Granzyme_p **Granzyme_t**	6.1 ± 7.8 4 ± 5	4 (2 ; 7) 3 (1 ; 6)	0 | 44 0 | 29	**0.0490**
FoxP3p **FoxP3t**	4.5 ± 6.5 3.7 ± 8	2 (0 ; 6) 1 (0 ; 5)	0 | 27 0 | 50	0.1022
CD20p **CD20t**	12.2 ± 58.2 3.3 ± 8.4	1 (0 ; 3) 1 (0 ; 2)	0 | 378 0 | 41	0.1116
CD68p **CD68t**	467.9 ± 273.3 480.8 ± 278.3	410 (292 ; 542) 453 (276 ; 634)	146 | 1509 112 | 1474	0.5443
CD117p **CD117t**	14.2 ± 58.1 7.3 ± 38.2	0 (0 ; 4) 0 (0 ; 2)	0 | 365 0 | 251	**0.0107**
CTLA-4p **CTLA-4t**	2.2 ± 4.7 1.9 ± 3.4	0 (0 ; 1) 0.5 (0 ; 2)	0 | 22 0 | 17	0.8002
PD-1p **PD-1t**	2.7 ± 7.3 1.4 ± 3.6	0 (0 ; 1) 0 (0 ; 1)	0 | 37 0 | 17	0.1984

Étude de survies globale et sans récidive

Les données de suivi ont pu être obtenues pour 43 des 44 patients étudiés. Au total, 15 (35,9%) d'entre eux étaient décédés, et 28 (64,1%) étaient toujours vivants aux dernières nouvelles. Vingt-deux (51,2%) patients ont présenté une récidive durant la durée de suivi, 21 (48,8%) ne présentaient pas de récidive aux dernières nouvelles.

Survies en fonction du caractère sécrétant

Il a d'abord été effectué une étude des survies globale et sans récidive des patients en fonction du caractère sécrétant ou non de leurs tumeurs. Les patients présentant des tumeurs sécrétantes étaient significativement plus à risque de décès ainsi que de récidive (cf. Figure 20)

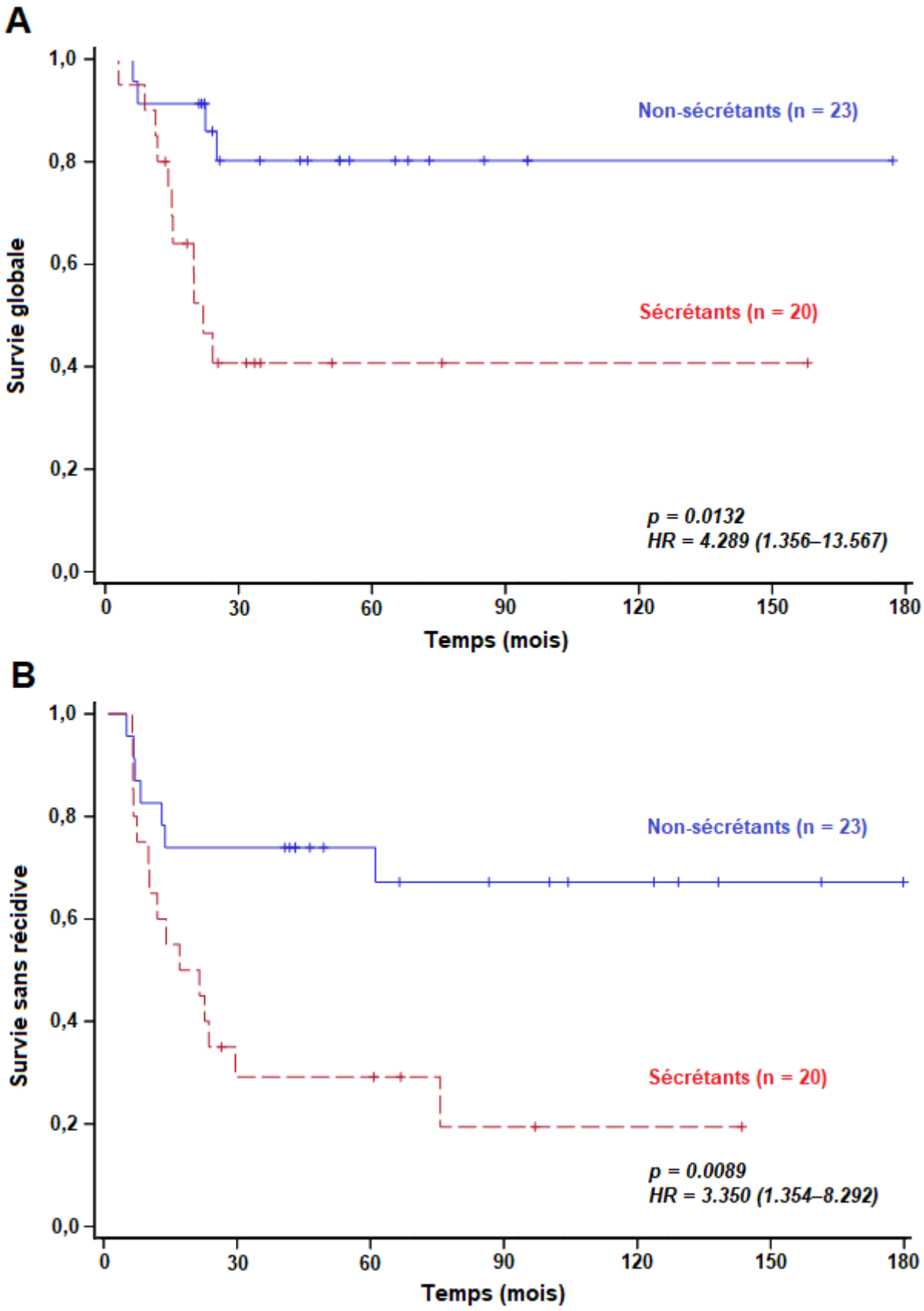


Figure 20. Survies globale **(A)** et sans récidive **(B)** des patients suivis en fonction du caractère sécrétant ou non de leur carcinome corticosurrénalien. HR, *Hazard Ratio*.

Survies en fonction du rapport CD4/CD8

Les survies globale et sans récidive des patients ont également été évaluées en fonction du rapport des TILs CD4+ et CD8+ présents dans leurs tumeurs. Deux catégories ont été comparées : les tumeurs avec un rapport CD4/CD8 < 1, l'autre avec un rapport > 1. Malgré un seuil de significativité non atteint (p = 0,0505) l'étude montrait que les patients avec un rapport CD4/CD8 > 1 avaient tendance à avoir un risque de décès plus important que ceux avec un rapport CD4/CD8 < 1. Aucune tendance n'était observée pour la survie sans récidive. (cf. fig. 21)

L'analyse a ensuite été reproduite en subdivisant les patients également en fonction du statut sécrétant de leurs tumeurs. Il en résultait 4 sous-groupes dont la taille des effectifs n'était pas suffisante pour effectuer une comparaison statistique. Néanmoins, les 13 patients du groupe [CD4/CD8 < 1/Non-sécrétants] ne présentait aucun décès à 24 mois, tandis que 3 des 9 patients du groupe [CD4/CD8 > 1/Sécrétants] étaient décédés à 24 mois. Le groupe [CD4/CD8 < 1/Non-sécrétants] ne présentait que 7,7% de récidive à 2 ans (cf. Annexe 2)

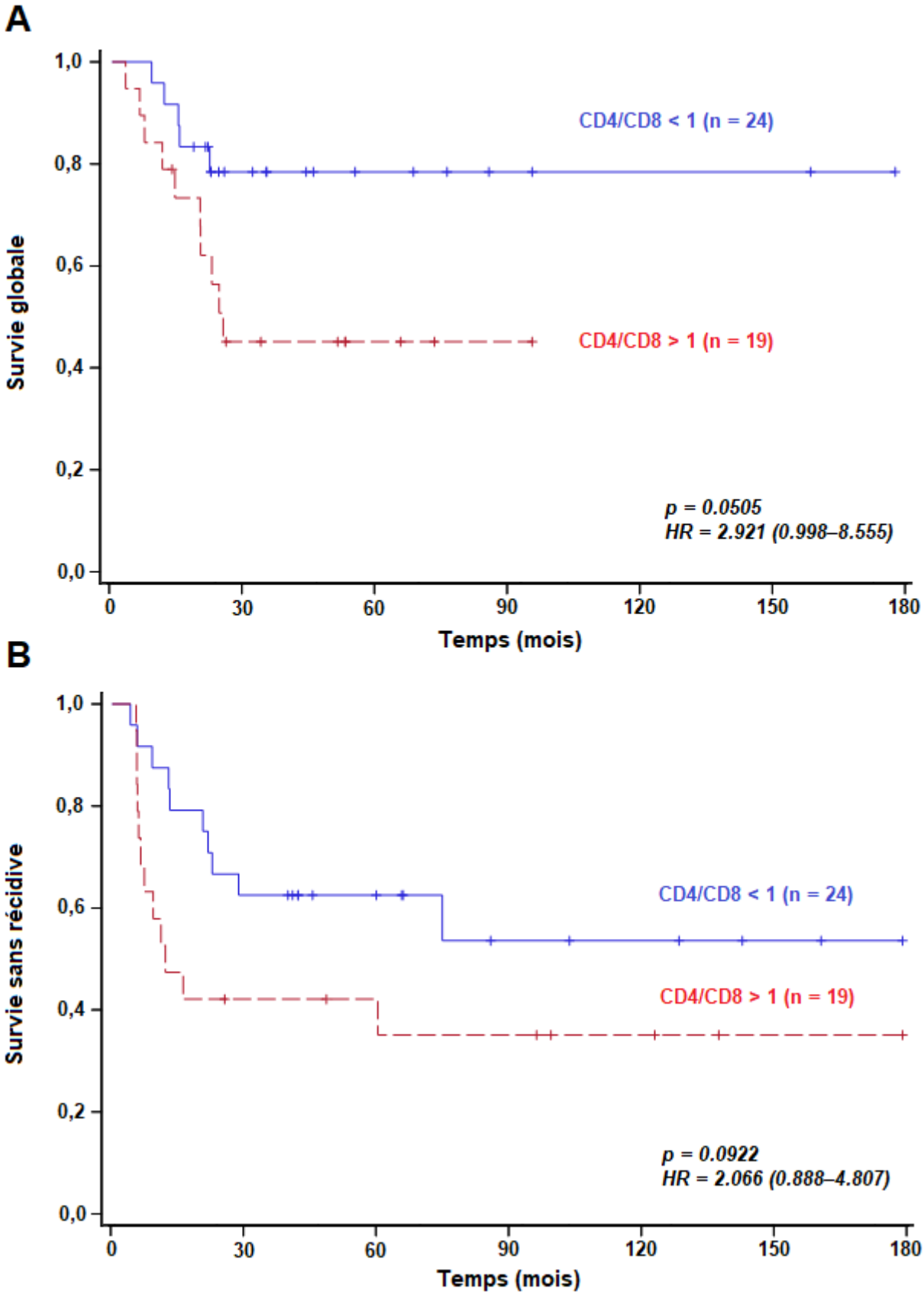


Figure 21. Survies globale **(A)** et sans récidive **(B)** des patients opérés d'un carcinome corticosurrénalien en fonction du rapport des TILs CD4+ et CD8+. HR, *Hazard Ratio*.

Survies en fonction de la présence ou non de mastocytes intra-tumoraux

Les survies globale et sans récidive de la cohorte ont été étudiées en fonction de la présence ou de l'absence de mastocytes intra-tumoraux, séparant les patients en 2 groupes. Les patients sans mastocytes intra-tumoraux étaient significativement plus à risque de décès et de récidive que les patients en possédant (cf. Figure 22)

L'analyse en sous-groupe en fonction du statut sécrétant tumoral n'a pas pu être réalisée comme pour le rapport CD4/CD8 car l'un des groupes présentait un effectif trop faible (1 patient)

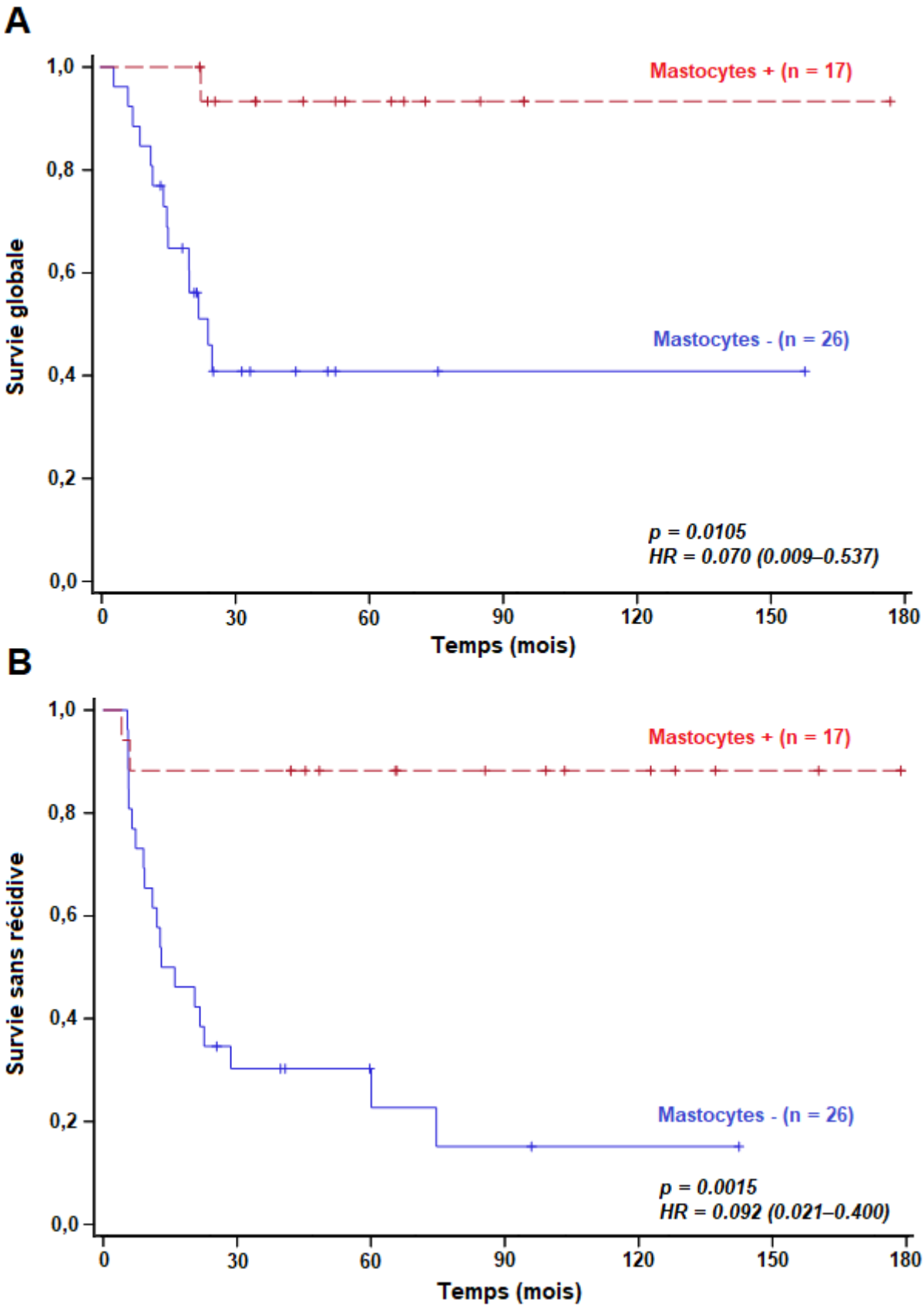


Figure 22. Survies globale **(A)** et sans récidive **(B)** des patients opérés d'un carcinome corticosurrénalien en fonction de l'absence ou de la présence de mastocytes intra-tumoraux. HR, *Hazard Ratio*.

DISCUSSION

Intérêts de l'étude

À notre connaissance, aucun travail à ce jour n'a mené d'étude du microenvironnement tumoral des carcinomes corticosurrénaliens sur échantillons tissulaires inclus en paraffine portant sur autant de populations leucocytaires et marqueurs théranostiques. Les données de la littérature étant peu abondantes sur le sujet, nous avons voulu coupler la grande quantité de matériel tissulaire disponible sur le CHU de Lille à la réalisation de *tissue microarrays* afin de réaliser l'analyse la plus exhaustive possible. La collaboration avec le service d'Endocrinologie Clinique du site a également permis un recueil des données clinico-biologiques centralisé et complet.

Considérant la rareté de cette pathologie, cette série de 44 patients représente un effectif important, relativement aux travaux sur coupes histologiques déjà publiés. En effet, l'étude de Landwehr *et al.*, la plus large menée à ce jour, comportait 146 échantillons (dont 107 tumeurs primitives, 16 récidives et 23 métastases) (42). Le reste de la littérature ne rapporte que de séries de moins de 50 patients, et exceptionnellement plus de 40. (45,52,68–70)

Cette série a également été réalisée sur une période courte, la rendant homogène sur le plan diagnostique et de la prise en charge.

Par ailleurs, l'échantillonnage de la périphérie et de la profondeur des tumeurs permettait une description plus complète du TME. Cette méthode de sélection de zones d'intérêt par topographie pour l'analyse n'est également pas rapportée dans la littérature.

Aussi, l'interprétation des techniques immunohistochimiques à l'aide d'un logiciel informatique après numérisation des lames permettait une analyse quantitative la plus reproductible possible. Nous pensons qu'un compte à partir de lames numérisées réduit la proportion d'erreurs liés à l'observateur durant un compte au microscope.

Caractéristiques de la population étudiée

Notre série rétrospective monocentrique portant sur 44 CCS opérés au CHU de Lille présente des caractéristiques épidémiologiques de sexe et d'âge au diagnostic comparables aux données de la littérature. Les proportions de tumeurs sécrétantes (45,5%) et non-sécrétantes (54,5%) étaient équilibrées avec un ratio proche de 1, en accord avec les données d'autres séries. (1) Il existait une discrète surreprésentation des stades ENSAT III (29,3%) au diagnostic, contre 18-26% dans les séries étudiés dans la littérature, et une sous-représentation des stades IV (16,2%), contre 21-46%. (12)

En comparaison avec l'étude d'Elhassan *et al*. sur le score pronostique S-GRAS portant sur 942 patients (16), notre série présentait une plus grande proportion de scores 0-1 (31,8% contre 17,8%) et une plus faible proportion de scores 2-3 (22,7% contre 38,9%). Il est possible que cette différence soit due à la faible taille de notre série, ou à des différences au niveau des facteurs servant au calcul du score. En effet, la cohorte d'Elhassan *et al*. présentait de nettes différences au niveau du statut de résection, avec 1% de statuts R2 dans notre cohorte contre 14,2%, et 2,3% de statuts R1 contre 11%, résultant possiblement en des scores S-GRAS plus élevés. Notre étude étant monocentrique et incluant des patients uniquement opérés sur le CHU de Lille par des chirurgiens experts en pathologie endocrinienne, il est possible que les chirurgies R0 (79,5%) soient surreprésentées dans celle-ci. Le caractère récent des cas sélectionnés pourrait également expliquer cette disparité, la prise en charge des CCS étant mieux codifiée à ce jour.

Les patients de notre cohorte présentant des tumeurs sécrétantes appartenaient à des catégories de scores S-GRAS plus élevées que les patients ayant des tumeurs non sécrétantes (cf. Tableau 2). Retrouver ces patients dans des catégories pronostiques péjoratives est en accord avec la littérature qui rapporte une survie globale moins bonne en cas de tumeur sécrétante. Il est intéressant de noter que les connaissances actuelles ne permettent pas de savoir si cette survie globale diminuée est due à un effet délétère des glucocorticoïdes sur l'organisme, ou si les tumeurs sécrétantes sont intrinsèquement plus agressives et d'évolution défavorable (ou une combinaison des deux) (13) Les tumeurs sécrétantes de notre série présentaient des scores de Weiss et des index de prolifération Ki67 généralement plus élevés (cf. Tableau 2). Ces données vont plutôt dans le sens d'une corrélation entre le caractère sécrétant d'une tumeur et la présence de critères d'agressivité cliniques et histopathologiques.

Établir une relation de cause à effet reste cependant difficile à l'heure actuelle. Les mécanismes derrière l'agressivité et la déplétion immunitaire intra-tumorale des CCS ne peuvent être imputés uniquement à leur statut sécrétant ou non. Il s'agit probablement d'une intrication complexe de plusieurs facteurs dont la sécrétion de glucocorticoïdes fait partie, associée à certaines mutations *drivers* (des voies p53/Rb ou Wnt/β-caténine), des profils de méthylation défavorables et caryotypiques complexes.

Il est par ailleurs possible que certains CCS de haut grade présentent de profondes altérations moléculaires des voies de la stéroïdogenèse résultant en l'absence de traduction clinico-biologique d'hypercortisolisme.

Ces tumeurs pourraient pourtant sécréter des précurseurs et métabolites immatures ne possédant qu'une activité agoniste partielle faible sur l'organisme, mais contribuant tout de même à une suppression de l'immunité anti-tumorale loco-régionale. Ce phénomène de sécrétion de métabolites alternatifs par les CCS (en comparaison avec des adénomes cortisoliques par exemple) est connu. (81–83)

En effet, certaines tumeurs non-sécrétantes de notre série possédant des scores de Weiss ou index de prolifération très élevés étaient quasiment dépourvues d'infiltrat inflammatoire (cf. fig. 23). Ceci souligne l'importance de prendre en compte les autres facteurs menant à l'agressivité et l'immunosuppression locale au sein des CCS et d'améliorer notre compréhension de l'interaction entre ces acteurs.

Notre cohorte comportait une part non négligeable (20,4%) de variants histologiques oncocytaires. La prévalence de ce type histologique est peu documentée dans la littérature, avec une série de 41 patients en rapportant 22% (84), une autre portant sur 521 patients en rapportant 2%. (85)

Sur les 9 CCS oncocytaires de notre série, seulement 2 étaient des tumeurs sécrétantes. Cette faible proportion de CCS oncocytaires sécrétants est en accord avec les rares études publiées à ce jour. L'hypothèse avancée étant que les cellules oncocytaires présenteraient trop d'anomalies mitochondriales pour une stéroïdogenèse fonctionnelle. (85–87)

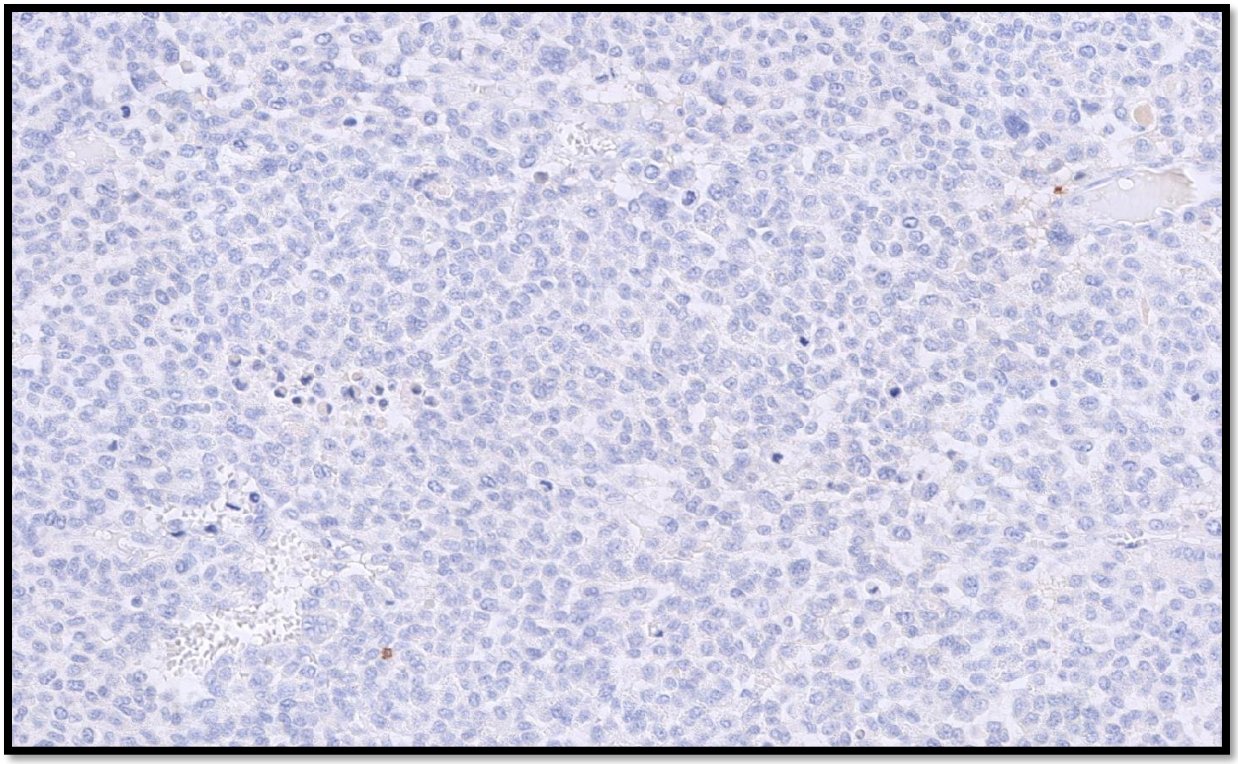


Figure 23. Exemple de tumeur de haut grade (score de Weiss 9) non-sécrétante quasiment dépourvue d'infiltrat inflammatoire. Ici, l'immunohistochimie anti-CD8 ne met en évidence que 2 lymphocytes marqués (en marron)

Étude du microenvironnement tumoral

TILs CD4+ et CD8+ et glucocorticoïdes

À notre connaissance, ce travail est le premier à comparer quantitativement la présence de TILs dans le TME des carcinomes corticosurrénaliens avec le statut sécrétant de ces derniers. En effet, l'étude menée par Landwehr *et al.* a effectué cette comparaison seulement en fonction de la présence ou de l'absence de TILs au sein des tumeurs et rapportaient 26% et 15,7% de CCS dépourvus de TILs CD4+ et CD8+ respectivement. (42) Ce résultat est discordant avec notre expérience. Les tumeurs les plus immuno-déplétées de notre cohorte présentaient toujours au moins de rares TILs, et seulement une seule était dépourvue de lymphocytes CD8+ au sein de sa profondeur (cf. Tableau 3). Cependant, ces auteurs ne précisaient pas l'existence ou non d'un éventuel nombre seuil de lymphocytes positifs nécessaires pour définir la présence de TILs. Dans notre étude sur TMA, nous avons fait le choix d'une analyse quantitative, prenant en compte toute cellule immunomarquée.

Nous rapportons donc une association entre le caractère sécrétant d'un CCS et sa teneur en TILs CD4+ et CD8+, les CCS sécrétants étant significativement plus pauvres en TILs que les non-sécrétants ($p = 0,014$ pour les CD4+ périphériques, et $p = 0,017$ et 0,035 pour les CD8+ périphériques et en profondeur respectivement). Ce résultat corrobore les données de la littérature et renforce l'hypothèse que les glucocorticoïdes sécrétés par les CCS jouent un rôle négatif majeur dans l'immunité anti-tumorale, les populations lymphocytaires CD4 et CD8 étant au centre de celle-ci.

Mastocytes intra-tumoraux et glucocorticoïdes

Dans notre étude, nous montrions une association entre la sécrétion de glucocorticoïdes et la teneur en mastocytes intra-tumoraux. A l'instar des TILs, les CCS sécrétants de notre cohorte présentaient significativement moins de mastocytes intra-tumoraux que les non-sécrétants ($p < 0,001$) (cf. Tableau 4)

Le fait que la teneur en mastocytes présente une forte association avec le caractère sécrétant tumoral suggère que cette population joue un rôle important dans l'immunité anti-tumorale des CCS, comme l'avaient rapporté les rares études menées sur le sujet.

L'étude *in silico* menée par Tian *et al*. montrait qu'une signature transcriptomique témoignant d'une forte concentration de mastocytes intra-tumoraux était associée à une meilleure survie. Une forte concentration mastocytaire intra-tumorale sur coupe histologique était également associée à une plus grande concentration en TILs CD4+ et CD8+. (45) L'étude de Baechle *et al*. retrouvait la même association statistique avec la survie sans récidive. Une signature transcriptomique mastocytaire dite « anti-tumorale » était significativement moins retrouvée chez les CCS sécrétants. (49)

Ces données ainsi que celles obtenues à partir de nos études complémentaires de survie (cf. fig. 22) corroborent les résultats de la littérature et suggèrent qu'une teneur élevée en mastocytes intra-tumoraux serait de bon pronostic. En retrouver des concentrations moins élevées dans les CCS sécrétants (connus pour être de moins bon pronostic) ne serait donc pas étonnant, et renforce également le caractère péjoratif de la sécrétion de glucocorticoïdes par ces tumeurs.

Autres populations cellulaires et glucocorticoïdes

Nous rapportions une association entre le caractère sécrétant et la teneur en lymphocytes B intra-tumoraux (CD20). Les tumeurs sécrétantes possédaient significativement moins de lymphocytes B en périphérie ($p = 0,034$), une tendance similaire non significative était observée en profondeur ($p = 0,058$)

A notre connaissance, le rôle des lymphocytes B dans les CCS n'a pas été étudié sur coupe histologique à ce jour. Les études *in silico* n'en font également pas mention. Ce résultat est néanmoins cohérent. En effet, l'activation lymphocytaire B dans l'immunité anti-tumorale est directement liée à l'activation lymphocytaire T *helper* CD4+ par le biais de signalisation cytokinique (cf. fig 11). Les CCS sécrétants possédant moins de TILs CD4+ que les non-sécrétants, il en résulterait une teneur intra-tumorale en lymphocytes B moindre chez ces tumeurs.

Nous rapportions également une absence de différence significative de la teneur en macrophages intra-tumoraux (TAMs) entre les CCS sécrétants et non-sécrétants ($p = 0,22$ en périphérie et $p = 0,32$ en profondeur)

Le rôle des TAMs dans les carcinomes corticosurrénaliens n'ayant pas été étudié à ce jour, il ne nous est pas possible de comparer ce résultat aux données de la littérature. De plus, l'étude des TAMs par l'immunohistochimie anti-CD68 révélait un marquage hétérogène de très nombreuses cellules, rendant son interprétation difficile (cf. fig 24). En effet, le CD68 est exprimé par d'autres cellules comme les fibroblastes, les cellules endothéliales, les macrophages et certains lymphocytes. (88)

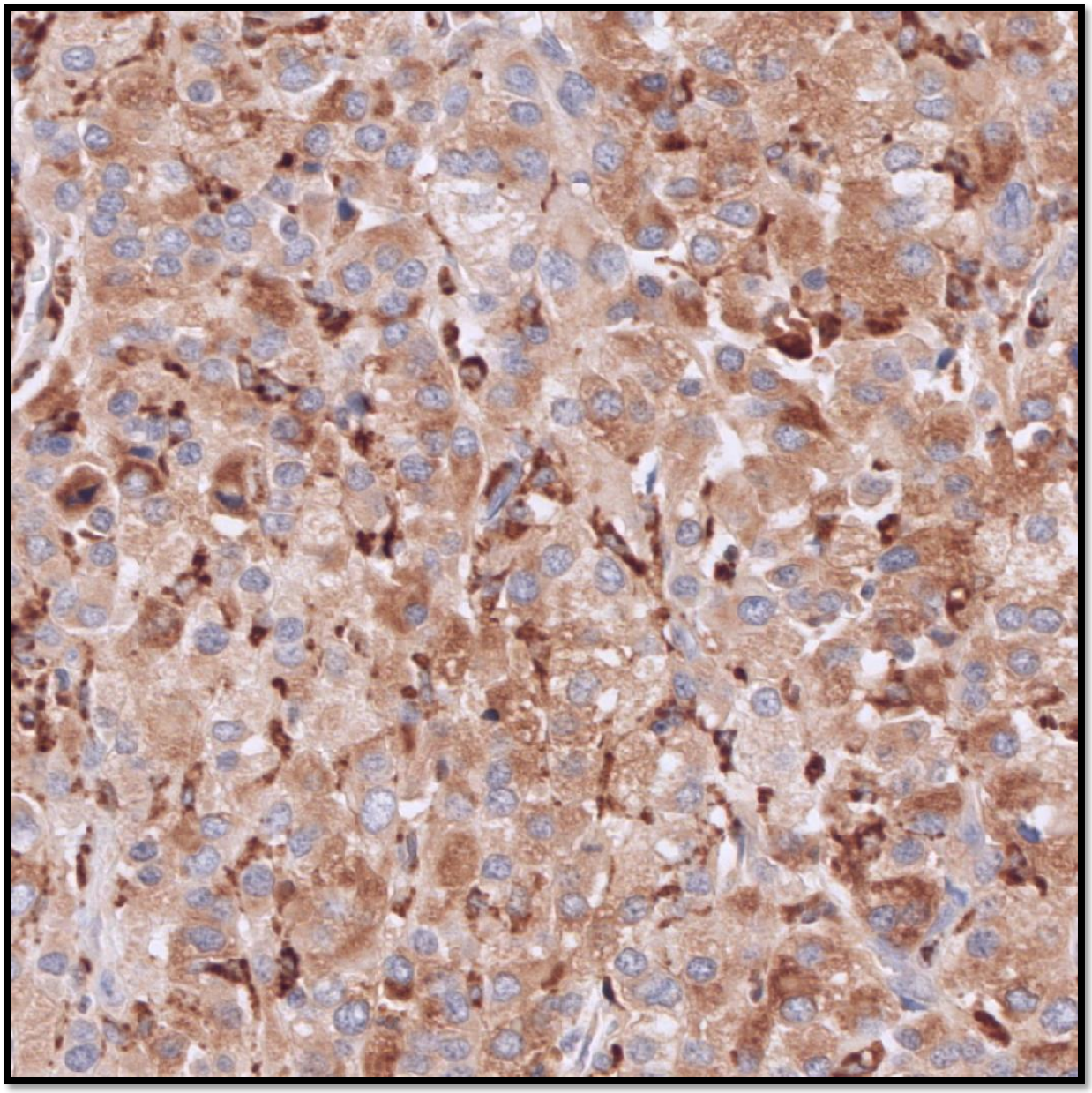


Figure 24. Exemple d'immunohistochimie par l'anticorps anti-CD68, révélant un marquage d'intensité hétérogène, parfois centré sur des noyaux difficilement identifiables.

Marqueurs théranostiques et glucocorticoïdes

Nous ne rapportions pas de différence significative de la proportion de cellules exprimant CTLA-4 et PD-1 entre les tumeurs sécrétantes et non-sécrétantes (p = 0,44(p) et 0,21(t) ; p = 0,091(p) et 0,52(t) respectivement)

Ces marqueurs n'ont pas fait l'objet d'étude sur coupe histologique dans les données de la littérature. L'étude *in silico* de Muzzi *et al*. sur 78 des CCS de la base de données du TGCA rapportait néanmoins une plus forte expression génique de *CTLA4* (codant pour CTLA-4) et *PDCD1* (codant pour PD-1) au sein des tumeurs « low steroid phenotype » comparativement aux tumeurs « high steroid phenotype ». (44) Ce résultat est contradictoire avec celui de notre étude, mais il est possible qu'il n'y ait pas de concordance entre l'expression d'un gène et l'expression de sa protéine en immunohistochimie.

La comparaison statistique n'a pas pu être réalisée pour l'expression immunohistochimique de PD-L1 via le score TPS ou CPS car trop peu de tumeurs (15,9%) présentaient une positivité pour celui-ci. Cette faible proportion de tumeurs exprimant PD-L1 est toutefois en accord avec les rares publications ayant étudié l'expression immunohistochimique de ce marqueur dans les CCS (68,69), et motive l'étude d'autres *checkpoints* immunitaires dans les carcinomes corticosurrénaliens.

Comparaison entre la périphérie et la profondeur des tumeurs

L'évaluation de l'infiltrat inflammatoire intra-tumoral en anatomopathologie, en particulier des TILs, a déjà commencé à être intégré en routine en tant que marqueur pronostique pour certains cancers. Elle est par exemple effectuée en pathologie mammaire, mais cela a nécessité une certaine standardisation (compte cellulaire effectué uniquement dans le stroma intra-tumoral, éviter les zones nécrotiques…) (89)

Cette évaluation n'est pas codifiée pour les CCS. Nous avons donc voulu établir s'il existait des différences dans la composition de l'infiltrat inflammatoire entre la profondeur des tumeurs, et leur périphérie (souvent sous la capsule lésionnelle). Les CCS de notre cohorte possédaient significativement plus de TILs CD8+ et granzyme B+ en leur périphérie (cf. Tableau 6), témoignant possiblement d'une activité cytotoxique anti-tumorale plus marquée à ce niveau. Une hypothèse est que l'interface entre la tumeur et le tissu sain périphérique serait plus propice à une activité anti-tumorale car plus accessible par les cellules immunitaires de l'hôte.

Dans la périphérie tumorale était également retrouvée une plus grande concentration en mastocytes. Le rôle de cette population leucocytaire dans le TME des CCS reste à être exploré.

Étude de survies globale et sans récidive

Influence des TILs CD4+ et CD8+

Nos études de survie préliminaires sont en accord avec la littérature (13). Les patients de notre cohorte avec CCS sécrétants exhibaient des survies globale et sans récidive abaissées par rapport aux patients aux tumeurs non fonctionnelles.

Comme discuté ci-dessus, notre analyse immunohistochimique ne révélait aucune tumeur dépourvue de TILs CD4+, et seulement une seule dépourvue de TILs CD8+. Contrairement à l'étude princeps de Landwehr *et al*. (42), il nous était donc impossible de résumer les TILs à une variable discrète (présence ou absence) pour effectuer une analyse de survie. Nous avons donc choisi de séparer notre cohorte en 2 populations en fonction du rapport CD4/CD8. L'une ayant un ratio supérieur 1 (donc possédant plus de TILs CD4+), et l'autre inférieur 1.

Dans notre étude, nous rapportons une tendance ($p = 0,0505$) à une survie globale moindre chez les patients possédant des tumeurs dont le rapport CD4/CD8 est supérieur à 1 (cf. fig. 21). Aucune différence significative n'était observée pour la survie sans récidive. Notre hypothèse serait qu'un ratio CD4/CD8 > 1 représente une plus faible proportion de lymphocytes T CD8+, et donc d'une activité cytotoxique (anti-tumorale) moindre.

Ce ratio a été peu étudié dans la littérature dans d'autres néoplasies, mais les données rapportées jusque-ici montrent un résultat inverse, avec un ratio CD4/CD8 < 1 associé à un pronostic plus péjoratif. (90–93). Cependant, notre analyse ne prenait en compte que le caractère quantitatif des TILs, et non les sous-populations de lymphocytes T CD4+ (T_H1, T_H2, T_{reg}…) et CD8+ (lymphocytes T cytotoxiques activés ou épuisés…). Il est possible que la population lymphocytaire T *helper* CD4+ des tumeurs que nous avons étudiées était de polarisation plutôt pro-tumorale, résultant en une survie globale moindre chez les patients présentant un rapport CD4/CD8 > 1. L'étude des TILs est néanmoins peu standardisée (*a fortiori* dans les CCS) et la répartition des sous-populations lymphocytaires T est différente en fonction du type de cancer considéré. Il est donc important de répliquer ou d'infirmer ce résultat à l'avenir, et de déterminer la pertinence d'autres façons d'évaluer les TILs dans les carcinomes corticosurrénaliens.

Influence des mastocytes intra-tumoraux

Le rôle des mastocytes au sein de l'immunité anti-tumorale est mal compris, apparaissant comme péjoratif pour certains cancers, favorables pour d'autres, dont les CCS. Notre étude des survies globale et sans récidive en fonction de leur présence ou absence (cf. fig. 22) corrobore cependant les résultats déjà disponibles dans la littérature et souligne leur valeur pronostique dans ces tumeurs.

L'évaluation de leur présence et de leur concentration intra-tumorale pourrait donc être réalisée et utilisée comme marqueur pronostique en anatomopathologie. A l'instar de l'évaluation des TILs, cette pratique nécessiterait une standardisation.

Limites de l’étude

Taille de la population étudiée

Avec 44 tumeurs étudiées, notre cohorte est de grande taille en comparaison avec la plupart des séries de la littérature. Néanmoins, ce nombre reste faible et réduit la puissance statistique des analyses effectuées. Un plus grand nombre de patients aurait rendu l’étude des leucocytes et de l’expression de PD-L1 et CTLA-4 en fonction du score S-GRAS (cf. Annexe 1) plus informative. Il en va de même pour l’analyse de survie en fonction du rapport CD4/CD8 et du caractère sécrétant (cf. Annexe 2) où une comparaison statistique n’a pas pu être effectuée. Nous rapportons tout de même une absence de décès dans le sous-groupe [CD4/CD8 < 1/Non-sécrétant], en comparaison avec le sous-groupe [CD4/CD8 > 1/Sécrétant] qui en présentait 66% (6 patients sur 9)

Une étude multivariée nous était également impossible. Ceci est pourtant crucial car les relations de cause à effet entre sécrétion de glucocorticoïdes, grade tumoral et altérations moléculaires sont mal connues dans les carcinomes corticosurrénaliens. Étudier l’intrication de ces paramètres histopronostiques avec les caractéristiques clinico-biologiques, de biologie moléculaire (profils mutationnels, méthylome, transcriptome, charge mutationnelle…) sur de plus grands effectifs est nécessaire.

Pertinence de l'étude immunohistochimique sur TMA

Au vu de la largeur du panel immunohistochimique utilisé, la réalisation de TMA nous a semblé la plus appropriée pour des raisons de logistique, de temps opérateur et de coût. Cependant, malgré un échantillonnage large des tumeurs, la surface tumorale étudiée sur coupe restait faible.

Nous estimons que les TMA offrent une représentativité correcte pour les populations leucocytaires les plus couramment retrouvées dans nos tumeurs (TILs CD4+, CD8+, CD20+, mastocytes, macrophages). En effet, les valeurs par mm^2 de celles-ci étaient peu variables d'un spot de TMA analysé à l'autre, pour une même tumeur.

En revanche, l'expérience nous a montré que certains types leucocytaires (lymphocytes T *helpers* FoxP3+ ou cytotoxiques granzyme B+, lymphocytes exprimant CTLA-4 ou PD-1) étaient très rares dans les CCS. Leur concentration intra-tumorale était donc constamment faible et peu variable d'une tumeur à l'autre. Ceci pourrait expliquer en partie l'absence de différence statistique retrouvée pour ces marqueurs. L'étude de l'expression immunohistochimique de PD-L1 sur TMA est également discutable car potentiellement hétérogène d'un secteur tumoral à l'autre (cf. fig. 25)

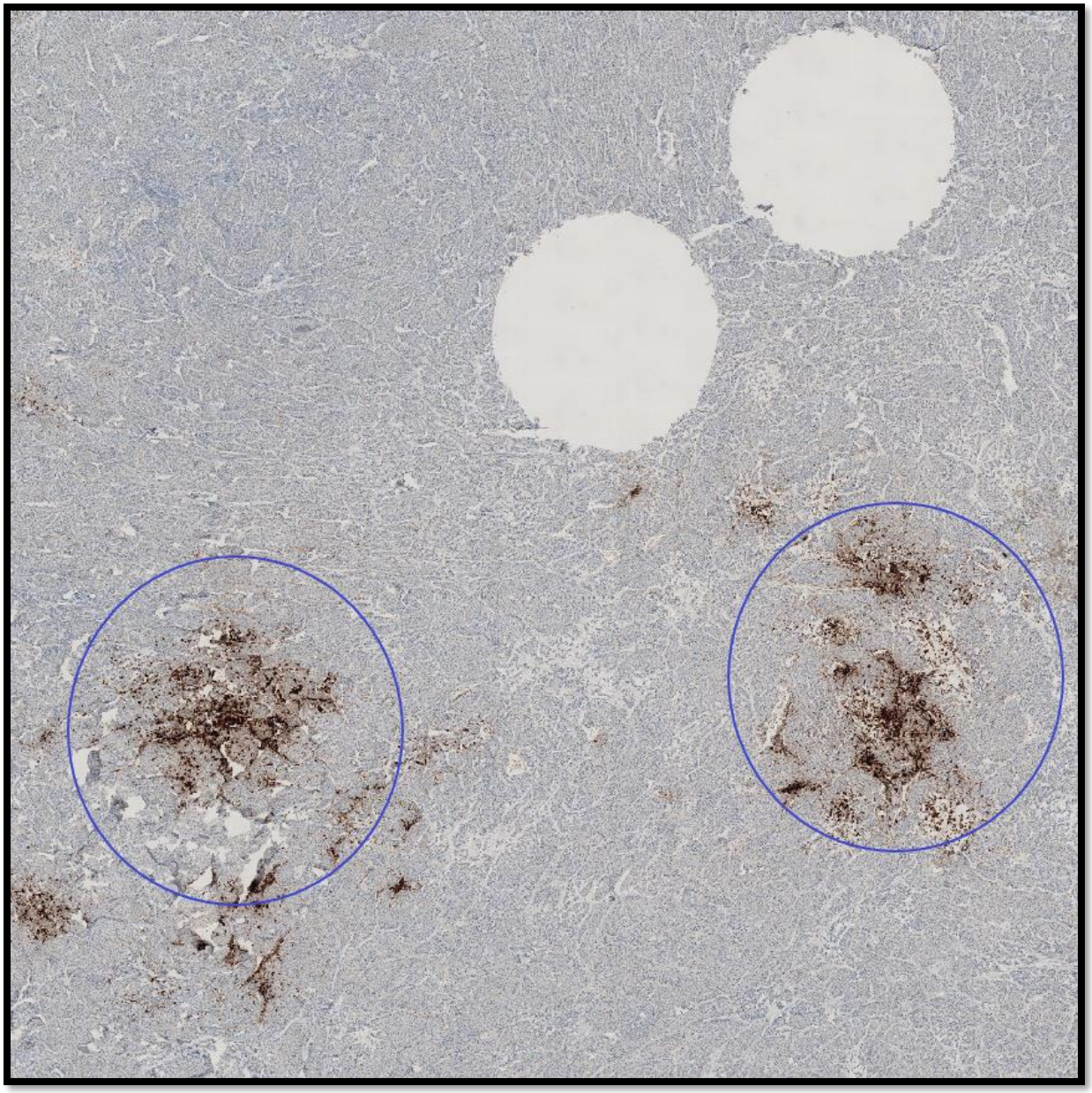


Figure 25. Exemple de l'hétérogénéité de l'expression de PD-L1 au sein d'une tumeur sur coupe entière. Présence de 2 zones d'expression (entourées en bleu) en dessous des empreintes du punch de TMA n'ayant pas révélé d'expression.

Pertinence de l'étude sur tumeur primitive

Il est largement documenté qu'il puisse exister des différences entre le site primitif d'une néoplasie et ses localisations secondaires ou récidives loco-régionales. Ces différences peuvent se trouver au niveau des cellules tumorales (différent clone, altérations moléculaires…), mais aussi du microenvironnement. Les métastases de certains cancers peuvent par exemple être plus immunologiquement « froides » que leur tumeur primitive. (94–97)

Cet aspect revêt une importance particulière dans l'étude du TME de tumeurs agressives comme les CCS. En effet, connaître l'environnement immunologique d'une localisation secondaire est d'autant plus pertinent pour des patients pouvant bénéficier d'une immunothérapie, là où une résection chirurgicale n'est plus envisageable.

Le service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU de Lille ne possédait que d'exceptionnels échantillons tissulaires de localisations métastatiques ou de récidives que nous n'avons pas inclus dans notre étude. La série de Landwehr *et al*. ne contenait que 16 échantillons de récidive et 23 de métastases pour 107 tumeurs primitives, n'ayant pas fait l'objet d'une comparaison entre elles dans cette publication. (42) Les localisations secondaires de CCS étant rarement biopsiées, il est donc difficile de dresser une cohorte comparative entre celles-ci et les tumeurs primitives.

Perspectives

A notre connaissance, l'étude sur coupe histologique de la polarisation macrophagique au sein du TME des CCS n'a pas encore été réalisée. Il s'agit pourtant d'un aspect important de l'immunité anti-tumorale. Similairement aux lymphocytes T, les macrophages subissent des phénomènes de polarisation. Ainsi, certains sous-types macrophagiques exercent une activité anti-tumorale, et d'autres, pro-tumorale. (98) Leur évaluation reste cependant difficile sur coupe histologique car peu de marqueurs sont spécifiques d'un type de polarisation. (99)

L'utilisation d'immunohistochimie ou immunofluorescence multiparamétrique pourrait palier à ces difficultés. Ces techniques permettent d'effectuer plusieurs marquages sur la même coupe histologique et d'identifier différents types cellulaires de manière plus spécifique (cf. fig. 26).

Cette technique pourrait également s'appliquer à l'évaluation des TILs et la rendrait plus standardisée. Des co-marquages CD3/CD4/FoxP3 et CD3/CD8/granzyme B permettraient par exemple d'identifier et de quantifier précisément différents sous-types de TILs CD4+ et CD8+. Ce type d'analyse a déjà été réalisé dans d'autres néoplasies. (100)

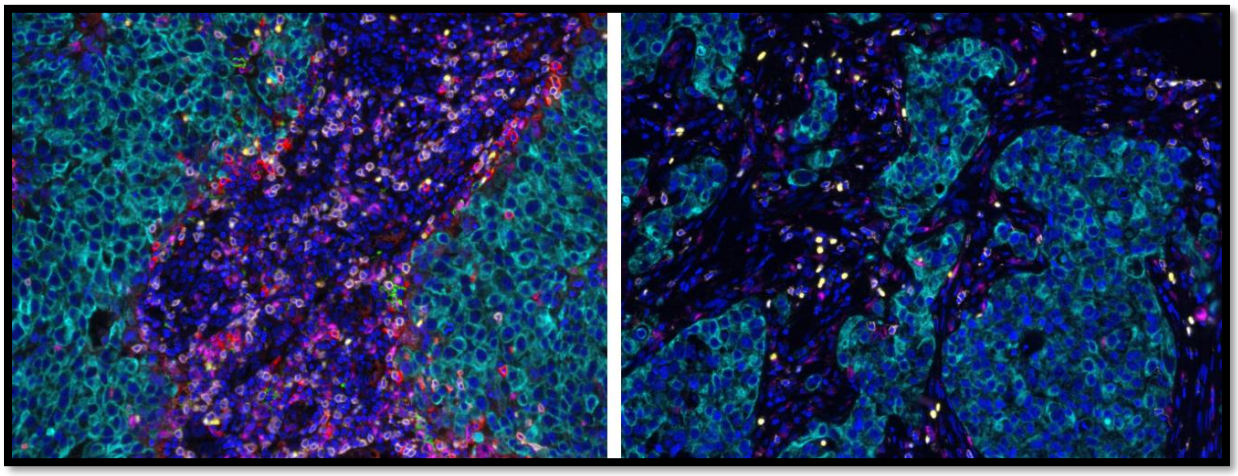


Figure 26. Exemple de 2 coupes histologiques en immunofluorescence multiparamétrique sur un échantillon de cancer du sein. Les noyaux sont contre-colorés en bleu. Le marquage CD8 est rose, CD68 magenta, FoxP3 jaune, PD-1 rouge, PD-L1 vert et pan-cytokératine aigue-marine.
Source : Zheng *et al*. *Understand immune phenotypes and their spatial relationships to breast adenocarcinoma in FFPE tissues. Conference AACR 2016.*

Enfin, l'expression d'autres marqueurs théranostiques comme PD-L2 et B7-H3 pourra être étudiée. Les quelques données de la littérature suggèrent que ceux-ci pourraient jouer un rôle plus important que PD-L1 dans les tumeurs corticosurrénaliennes. (68–70) Ces anticorps n'étaient pas disponibles au sein du laboratoire au moment de la réalisation de cette étude, mais leur mise au point et évaluation de leur expression pourront faire l'objet d'un travail ultérieur.

CONCLUSION

Cette étude rétrospective unicentrique portant une large série de carcinomes corticosurrénaliens (en considérant la rareté de cette pathologie) a permis de mieux caractériser leur microenvironnement tumoral et de consolider les données de la littérature sur le sujet.

Nous confirmons que la sécrétion de glucocorticoïdes par les CCS présente un impact pronostique et que celle-ci induit des changements dans la composition du microenvironnement par rapport aux tumeurs non-sécrétantes. Les lymphocytes intra-tumoraux CD4+ et CD8+ (acteurs centraux de l'immunité anti-tumorale) apparaissent moins nombreux au sein des CCS sécrétants.

Les glucocorticoïdes sécrétés semblent également réduire la teneur intra-tumorale en mastocytes comparativement aux tumeurs non-sécrétantes. Cette étude nous a aussi permis de souligner l'importance pronostique de ce sous-type leucocytaire dans les CCS. En effet, les patients atteints de tumeurs dépourvues de mastocytes étaient plus à risque de récidive ainsi que de décès.

Aucune différence d'expression de marqueurs théranostiques comme PD-1, PD-L1 et CTLA-4 n'était retrouvée entre les tumeurs sécrétantes et non-sécrétantes. Cependant, d'autres marqueurs tels que PD-L2 et B7-H3 méritent d'être explorés. La constitution de cette cohorte permettra la réalisation de travaux ultérieurs sur ce sujet.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. WHO classification of tumor of endocrine organs, 4th edition.

2. Else T. Association of adrenocortical carcinoma with familial cancer susceptibility syndromes. Mol Cell Endocrinol. mars 2012;351(1):66-70.

3. Aubert S, Buob D, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Do Cao C, et al. Le système de weiss : un outil toujours d'actualité pour le diagnostic de malignité des tumeurs de la corticosurrenale. Ann Pathol. déc 2005;25(6):545-54.

4. Weiss LM. Comparative histologic study of 43 metastasizing and nonmetastasizing adrenocortical tumors: Am J Surg Pathol. mars 1984;8(3):163-70.

5. Tissier F, Aubert S, Leteurtre E, Al Ghuzlan A, Patey M, Decaussin M, et al. Adrenocortical Tumors: Improving the Practice of the Weiss System Through Virtual Microscopy A National Program of the French Network INCa-COMETE. Am J Surg Pathol. août 2012;36(8):1194-201.

6. Aubert S, Wacrenier A, Leroy X, Devos P, Carnaille B, Proye C, et al. Weiss System Revisited: A Clinicopathologic and Immunohistochemical Study of 49 Adrenocortical Tumors. Am J Surg Pathol. déc 2002;26(12):1612-9.

7. Pennanen M, Heiskanen I, Sane T, Remes S, Mustonen H, Haglund C, et al. Helsinki score—a novel model for prediction of metastases in adrenocortical carcinomas. Hum Pathol. mars 2015;46(3):404-10.

8. Bisceglia M, Ludovico O, Di Mattia A, Ben-Dor D, Sandbank J, Pasquinelli G, et al. Adrenocortical Oncocytic Tumors: Report of 10 Cases and Review of the Literature. Int J Surg Pathol. juill 2004;12(3):231-43.

9. Wieneke JA, Thompson LDR, Heffess CS. Adrenal Cortical Neoplasms in the Pediatric Population: A Clinicopathologic and Immunophenotypic Analysis of 83 Patients. Am J Surg Pathol. juill 2003;27(7):867-81.

10. Fassnacht M, Johanssen S, Quinkler M, Bucsky P, Willenberg HS, Beuschlein F, et al. Limited prognostic value of the 2004 International Union Against Cancer staging classification for adrenocortical carcinoma: Proposal for a Revised TNM Classification. Cancer. 15 janv 2009;115(2):243-50.

11. TNM Classification of Malignant Tumours, 8th edition.

12. Libé R, Borget I, Ronchi CL, Zaggia B, Kroiss M, Kerkhofs T, et al. Prognostic factors in stage III–IV adrenocortical carcinomas (ACC): an European Network for the Study of Adrenal Tumor (ENSAT) study. Ann Oncol. oct 2015;26(10):2119-25.

13. Vanbrabant T, Fassnacht M, Assie G, Dekkers OM. Influence of hormonal functional status on survival in adrenocortical carcinoma: systematic review and meta-analysis. Eur J Endocrinol. déc 2018;179(6):429-36.

14. Abiven G, Coste J, Groussin L, Anract P, Tissier F, Legmann P, et al. Clinical and Biological Features in the Prognosis of Adrenocortical Cancer: Poor Outcome of Cortisol-Secreting Tumors in a Series of 202 Consecutive Patients. J Clin Endocrinol Metab. juill 2006;91(7):2650-5.

15. Libé R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. Front Cell Dev Biol [Internet]. 3 juill 2015 [cité 21 janv 2022];3. Disponible sur: http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fcell.2015.00045/abstract

16. Elhassan YS, Altieri B, Berhane S, Cosentini D, Calabrese A, Haissaguerre M, et al. S-GRAS score for prognostic classification of adrenocortical carcinoma: an international, multicenter ENSAT study. Eur J Endocrinol. 1 janv 2022;186(1):25-36.

17. Beuschlein F, Weigel J, Saeger W, Kroiss M, Wild V, Daffara F, et al. Major Prognostic Role of Ki67 in Localized Adrenocortical Carcinoma After Complete Resection. J Clin Endocrinol Metab. 1 mars 2015;100(3):841-9.

18. Lippert J, Appenzeller S, Liang R, Sbiera S, Kircher S, Altieri B, et al. Targeted Molecular Analysis in Adrenocortical Carcinomas: A Strategy Toward Improved Personalized Prognostication. J Clin Endocrinol Metab. 1 déc 2018;103(12):4511-23.

19. Zheng S, Cherniack AD, Dewal N, Moffitt RA, Danilova L, Murray BA, et al. Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. Cancer Cell. mai 2016;29(5):723-36.

20. Libè R, Groussin L, Tissier F, Elie C, René-Corail F, Fratticci A, et al. Somatic *TP53* Mutations Are Relatively Rare among Adrenocortical Cancers with the Frequent 17p13 Loss of Heterozygosity. Clin Cancer Res. 1 févr 2007;13(3):844-50.

21. Jouinot A, Assie G, Libe R, Fassnacht M, Papathomas T, Barreau O, et al. DNA methylation is an independent prognostic marker of survival in adrenocortical cancer. J Clin Endocrinol Metab. 14 déc 2016;jc.2016-3205.

22. Mytareli C, Delivanis DA, Athanassouli F, Kalotychou V, Mantzourani M, Kassi E, et al. The Diagnostic, Prognostic and Therapeutic Role of miRNAs in Adrenocortical Carcinoma: A Systematic Review. Biomedicines. 20 oct 2021;9(11):1501.

23. Lippert J, Fassnacht M, Ronchi CL. The role of molecular profiling in adrenocortical carcinoma. Clin Endocrinol (Oxf). 8 nov 2021;cen.14629.

24. Fassnacht M, Assie G, Baudin E, Eisenhofer G, de la Fouchardiere C, Haak HR, et al. Adrenocortical carcinomas and malignant phaeochromocytomas: ESMO–EURACAN Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann Oncol. nov 2020;31(11):1476-90.

25. Kerkhofs TMA, Ettaieb MHT, Hermsen IGC, Haak HR. Developing treatment for adrenocortical carcinoma. Endocr Relat Cancer. déc 2015;22(6):R325-38.

26. Megerle F, Kroiss M, Hahner S, Fassnacht M. Advanced Adrenocortical Carcinoma – What to do when First-Line Therapy Fails? Exp Clin Endocrinol Diabetes. févr 2019;127(02/03):109-16.

27. Amodru V, Garcia ME, Libe R, Brue T, Reznik Y, Castinetti F. Medical management of adrenocortical carcinoma: Current recommendations, new therapeutic options and future perspectives. Ann Endocrinol. févr 2021;82(1):52-8.

28. Altieri B, Ronchi CL, Kroiss M, Fassnacht M. Next-generation therapies for adrenocortical carcinoma. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab. mai 2020;34(3):101434.

29. Kiesewetter B, Riss P, Scheuba C, Mazal P, Kretschmer-Chott E, Haug A, et al. Management of adrenocortical carcinoma: are we making progress? Ther Adv Med Oncol. janv 2021;13:175883592110384.

30. Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the Vascular Endothelial Growth Factor Pathway in Tumor Growth and Angiogenesis. J Clin Oncol. 10 févr 2005;23(5):1011-27.

31. Sledge GW. VEGF-Targeting Therapy for Breast Cancer. J Mammary Gland Biol Neoplasia. oct 2005;10(4):319-23.

32. Kerr DJ. Targeting angiogenesis in cancer: clinical development of bevacizumab. Nat Clin Pract Oncol. nov 2004;1(1):39-43.

33. Basu A, Ramamoorthi G, Albert G, Gallen C, Beyer A, Snyder C, et al. Differentiation and Regulation of TH Cells: A Balancing Act for Cancer Immunotherapy. Front Immunol. 3 mai 2021;12:669474.

34. Howitt BE, Shukla SA, Sholl LM, Ritterhouse LL, Watkins JC, Rodig S, et al. Association of Polymerase e–Mutated and Microsatellite-Instable Endometrial Cancers With Neoantigen Load, Number of Tumor-Infiltrating Lymphocytes, and Expression of PD-1 and PD-L1. JAMA Oncol. 1 déc 2015;1(9):1319.

35. Strickland KC, Howitt BE, Shukla SA, Rodig S, Ritterhouse LL, Liu JF, et al. Association and prognostic significance of BRCA1/2-mutation status with neoantigen load, number of tumor-infiltrating lymphocytes and expression of PD-1/PD-L1 in high grade serous ovarian cancer. Oncotarget. 22 mars 2016;7(12):13587-98.

36. Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. Nat Rev Cancer. avr 2012;12(4):252-64.

37. Lee C, Collichio F, Ollila D, Moschos S. Historical review of melanoma treatment and outcomes. Clin Dermatol. mars 2013;31(2):141-7.

38. Seth R, Messersmith H, Kaur V, Kirkwood JM, Kudchadkar R, McQuade JL, et al. Systemic Therapy for Melanoma: ASCO Guideline. J Clin Oncol. 20 nov 2020;38(33):3947-70.

39. Francisco LM, Salinas VH, Brown KE, Vanguri VK, Freeman GJ, Kuchroo VK, et al. PD-L1 regulates the development, maintenance, and function of induced regulatory T cells. J Exp Med. 21 déc 2009;206(13):3015-29.

40. Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer. Eur Soc Med Oncol. 2020;71.

41. Thorsson V, Gibbs DL, Brown SD, Wolf D, Bortone DS, Ou Yang TH, et al. The Immune Landscape of Cancer. Immunity. avr 2018;48(4):812-830.e14.

42. Landwehr LS, Altieri B, Schreiner J, Sbiera I, Weigand I, Kroiss M, et al. Interplay between glucocorticoids and tumor-infiltrating lymphocytes on the prognosis of adrenocortical carcinoma. J Immunother Cancer. mai 2020;8(1):e000469.

43. Baechle JJ, Hanna DN, Sekhar KR, Rathmell JC, Rathmell WK, Baregamian N. Integrative computational immunogenomic profiling of cortisol-secreting adrenocortical carcinoma. J Cell Mol Med. nov 2021;25(21):10061-72.

44. Muzzi JCD, Magno JM, Cardoso MA, de Moura J, Castro MAA, Figueiredo BC. Adrenocortical Carcinoma Steroid Profiles: In Silico Pan-Cancer Analysis of TCGA Data Uncovers Immunotherapy Targets for Potential Improved Outcomes. Front Endocrinol. 14 juin 2021;12:672319.

45. Tian X, Xu W, Wang Y, Anwaier A, Wang H, Wan F, et al. Identification of tumor-infiltrating immune cells and prognostic validation of tumor-infiltrating mast cells in adrenocortical carcinoma: results from bioinformatics and real-world data. OncoImmunology. 1 janv 2020;9(1):1784529.

46. Liu J, Zhang Y, Zhao J, Yang Z, Li D, Katirai F, et al. Mast cell: insight into remodeling a tumor microenvironment. Cancer Metastasis Rev. juin 2011;30(2):177-84.

47. Derakhshani A, Vahidian F, Alihasanzadeh M, Mokhtarzadeh A, Lotfi Nezhad P, Baradaran B. Mast cells: A double-edged sword in cancer. Immunol Lett. mai 2019;209:28-35.

48. Rigoni A, Colombo MP, Pucillo C. The Role of Mast Cells in Molding the Tumor Microenvironment. Cancer Microenviron. déc 2015;8(3):167-76.

49. Baechle JJ, Hanna DN, Sekhar KR, Rathmell JC, Rathmell WK, Baregamian N. Multiplatform computational analysis of mast cells in adrenocortical carcinoma tumor microenvironment. Surgery. janv 2022;171(1):111-8.

50. Luke JJ, Bao R, Sweis RF, Spranger S, Gajewski TF. WNT/β-catenin Pathway Activation Correlates with Immune Exclusion across Human Cancers. Clin Cancer Res. 15 mai 2019;25(10):3074-83.

51. Spranger S, Bao R, Gajewski TF. Melanoma-intrinsic β-catenin signalling prevents anti-tumour immunity. Nature. juill 2015;523(7559):231-5.

52. β-Catenin-driven adrenocortical carcinoma is characterized with immune exclusion.

53. Vatrano S, Volante M, Duregon E, Giorcelli J, Izzo S, Rapa I, et al. Detailed genomic characterization identifies high heterogeneity and histotype-specific genomic profiles in adrenocortical carcinomas. Mod Pathol. août 2018;31(8):1257-69.

54. Blagih J, Zani F, Chakravarty P, Hennequart M, Pilley S, Hobor S, et al. Cancer-Specific Loss of p53 Leads to a Modulation of Myeloid and T Cell Responses. Cell Rep. janv 2020;30(2):481-496.e6.

55. Araujo-Castro M, Pascual-Corrales E, Molina-Cerrillo J, Alonso-Gordoa T. Immunotherapy in Adrenocortical Carcinoma: Predictors of Response, Efficacy, Safety, and Mechanisms of Resistance. Biomedicines. 16 mars 2021;9(3):304.

56. Karwacka I, Obołończyk Ł, Kaniuka-Jakubowska S, Sworczak K. The Role of Immunotherapy in the Treatment of Adrenocortical Carcinoma. Biomedicines. 20 janv 2021;9(2):98.

57. Le Tourneau C, Hoimes C, Zarwan C, Wong DJ, Bauer S, Claus R, et al. Avelumab in patients with previously treated metastatic adrenocortical carcinoma: phase 1b results from the JAVELIN solid tumor trial. J Immunother Cancer. déc 2018;6(1):111.

58. Carneiro BA, Konda B, Costa RB, Costa RLB, Sagar V, Gursel DB, et al. Nivolumab in Metastatic Adrenocortical Carcinoma: Results of a Phase 2 Trial. J Clin Endocrinol Metab. 1 déc 2019;104(12):6193-200.

59. Habra MA, Stephen B, Campbell M, Hess K, Tapia C, Xu M, et al. Phase II clinical trial of pembrolizumab efficacy and safety in advanced adrenocortical carcinoma. J Immunother Cancer. déc 2019;7(1):253.

60. Raj N, Zheng Y, Kelly V, Katz SS, Chou J, Do RKG, et al. PD-1 Blockade in Advanced Adrenocortical Carcinoma. J Clin Oncol. 1 janv 2020;38(1):71-80.

61. Maeda N, Maruhashi T, Sugiura D, Shimizu K, Okazaki I mi, Okazaki T. Glucocorticoids potentiate the inhibitory capacity of programmed cell death 1 by up-regulating its expression on T cells. J Biol Chem. déc 2019;294(52):19896-906.

62. Xia M, Gasser J, Feige U. Dexamethasone enhances CTLA-4 expression during T cell activation. Cell Mol Life Sci CMLS. 2 oct 1999;55(12):1649-56.

63. Head L, Kiseljak-Vassiliades K, Clark TJ, Somerset H, King J, Raeburn C, et al. Response to Immunotherapy in Combination With Mitotane in Patients With Metastatic Adrenocortical Cancer. J Endocr Soc. 1 déc 2019;3(12):2295-304.

64. Fiorentini C, Grisanti S, Cosentini D, Abate A, Rossini E, Berruti A, et al. Molecular Drivers of Potential Immunotherapy Failure in Adrenocortical Carcinoma. J Oncol. 1 avr 2019;2019:1-7.

65. Georgantzoglou N, Kokkali S, Tsourouflis G, Theocharis S. Tumor Microenvironment in Adrenocortical Carcinoma: Barrier to Immunotherapy Success? Cancers. 9 avr 2021;13(8):1798.

66. Zappasodi R, Wolchok JD, Merghoub T. Strategies for Predicting Response to Checkpoint Inhibitors. Curr Hematol Malig Rep. oct 2018;13(5):383-95.

67. Bai R, Lv Z, Xu D, Cui J. Predictive biomarkers for cancer immunotherapy with immune checkpoint inhibitors. Biomark Res. déc 2020;8(1):34.

68. Fay AP, Signoretti S, Callea M, Teló GH, McKay RR, Song J, et al. Programmed death ligand-1 expression in adrenocortical carcinoma: an exploratory biomarker study. J Immunother Cancer. déc 2015;3(1):3.

69. Tierney JF, Vogle A, Poirier J, Min IM, Finnerty B, Zarnegar R, et al. Expression of programmed death ligand 1 and 2 in adrenocortical cancer tissues: An exploratory study. Surgery. janv 2019;165(1):196-201.

70. Liang J, Liu Z, Pei T, Xiao Y, Zhou L, Tang Y, et al. Clinicopathological and Prognostic Characteristics of CD276 (B7-H3) Expression in Adrenocortical Carcinoma. Dis Markers. 11 janv 2020;2020:1-10.

71. High B7-H3 expression is linked to increased risk of prostate cancer progression.

72. Kontos F, Michelakos T, Kurokawa T, Sadagopan A, Schwab JH, Ferrone CR, et al. B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy. Clin Cancer Res. 1 mars 2021;27(5):1227-35.

73. Sinha N, Sinha S, Valero C, Schäffer AA, Aldape K, Litchfield K, et al. Immune determinants of the association between tumor mutational burden and immunotherapy response across cancer types. :20.

74. Colli LM, Machiela MJ, Myers TA, Jessop L, Yu K, Chanock SJ. Burden of Nonsynonymous Mutations among TCGA Cancers and Candidate Immune Checkpoint Inhibitor Responses. Cancer Res. 1 juill 2016;76(13):3767-72.

75. Gara SK, Lack J, Zhang L, Harris E, Cam M, Kebebew E. Metastatic adrenocortical carcinoma displays higher mutation rate and tumor heterogeneity than primary tumors. Nat Commun. déc 2018;9(1):4172.

76. Xu F, Guan Y, Zhang P, Xue L, Ma Y, Gao M, et al. Tumor mutational burden presents limiting effects on predicting the efficacy of immune checkpoint inhibitors and prognostic assessment in adrenocortical carcinoma. BMC Endocr Disord. déc 2022;22(1):130.

77. Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, Miya J, Wing MR, Chen HZ, et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. JCO Precis Oncol. nov 2017;(1):1-15.

78. Le DT, Durham JN, Smith KN, Wang H, Bartlett BR, Aulakh LK, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade. Science. 28 juill 2017;357(6349):409-13.

79. Fassnacht M, Arlt W, Bancos I, Dralle H, Newell-Price J, Sahdev A, et al. Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. Eur J Endocrinol. août 2016;175(2):G1-34.

80. Kulangara K, Zhang N, Corigliano E, Guerrero L, Waldroup S, Jaiswal D, et al. Clinical Utility of the Combined Positive Score for Programmed Death Ligand-1 Expression and the Approval of Pembrolizumab for Treatment of Gastric Cancer. Arch Pathol Lab Med. 1 mars 2019;143(3):330-7.

81. Schteingart DE. Urine Steroid Metabolomics as a Biomarker Tool for Detecting Malignancy in Adrenal Tumors. Yearb Endocrinol. janv 2012;2012:255-6.

82. Chortis V, Bancos I, Nijman T, Gilligan LC, Taylor AE, Ronchi CL, et al. Urine Steroid Metabolomics as a Novel Tool for Detection of Recurrent Adrenocortical Carcinoma. J Clin Endocrinol Metab. 1 mars 2020;105(3):e307-18.

83. Suzuki S, Minamidate T, Shiga A, Ruike Y, Ishiwata K, Naito K, et al. Steroid metabolites for diagnosing and predicting clinicopathological features in cortisol-producing adrenocortical carcinoma. BMC Endocr Disord. déc 2020;20(1):173.

84. Mills JK, Khalil M, Pasieka J, Kong S, Xu Y, Harvey A. Oncocytic subtypes of adrenal cortical carcinoma: Aggressive in appearance yet more indolent in behavior? Surgery. oct 2019;166(4):524-33.

85. Minner S, Schreiner J, Saeger W. Adrenal cancer: relevance of different grading systems and subtypes. Clin Transl Oncol. juill 2021;23(7):1350-7.

86. Wong DD. Oncocytic adrenocortical neoplasms—a clinicopathologic study of 13 new cases emphasizing the importance of their recognition. :11.

87. Mantero F, Terzolo M, Arnaldi G, Osella G, Masini AM, Alı A, et al. A Survey on Adrenal Incidentaloma in Italy. 2000;85(2):8.

88. Gottfried E, Kunz-Schughart LA, Weber A, Rehli M, Peuker A, Müller A, et al. Expression of CD68 in Non-Myeloid Cell Types. Scand J Immunol. mai 2008;67(5):453-63.

89. Dieci MV, Radosevic-Robin N, Fineberg S, van den Eynden G, Ternes N, Penault-Llorca F, et al. Update on tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer, including recommendations to assess TILs in residual disease after neoadjuvant therapy and in carcinoma in situ: A report of the International Immuno-Oncology Biomarker Working Group on Breast Cancer. Semin Cancer Biol. oct 2018;52:16-25.

90. Wang K, Shen T, Siegal GP, Wei S. The CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes at the tumor-host interface has prognostic value in triple-negative breast cancer. Hum Pathol. nov 2017;69:110-7.

91. Shah W, Yan X, Jing L, Zhou Y, Chen H, Wang Y. A reversed CD4/CD8 ratio of tumor-infiltrating lymphocytes and a high percentage of CD4+FOXP3+ regulatory T cells are significantly associated with clinical outcome in squamous cell carcinoma of the cervix. Cell Mol Immunol. janv 2011;8(1):59-66.

92. Sheu BC, Hsu SM, Ho HN, Lin RH, Torng PL, Huang SC. Reversed CD4/CD8 ratios of tumor-infiltrating lymphocytes are correlated with the progression of human cervical carcinoma. Cancer. 15 oct 1999;86(8):1537-43.

93. Jackute J, Zemaitis M, Pranys D, Sitkauskiene B, Miliauskas S, Bajoriunas V, et al. The prognostic influence of tumor infiltrating Foxp3+CD4+, CD4+ and CD8+ T cells in resected non-small cell lung cancer. J Inflamm. déc 2015;12(1):63.

94. Ikarashi D, Okimoto T, Shukuya T, Onagi H, Hayashi T, Sinicropi-Yao SL, et al. Comparison of Tumor Microenvironments Between Primary Tumors and Brain Metastases in Patients With NSCLC. JTO Clin Res Rep. oct 2021;2(10):100230.

95. Lee H, Na KJ, Choi H. Differences in Tumor Immune Microenvironment in Metastatic Sites of Breast Cancer. Front Oncol. 18 mars 2021;11:649004.

96. Szekely B, Bossuyt V, Li X, Wali VB, Patwardhan GA, Frederick C, et al. Immunological differences between primary and metastatic breast cancer. Ann Oncol. nov 2018;29(11):2232-9.

97. Cacho-Díaz B, García-Botello DR, Wegman-Ostrosky T, Reyes-Soto G, Ortiz-Sánchez E, Herrera-Montalvo LA. Tumor microenvironment differences between primary tumor and brain metastases. J Transl Med. déc 2020;18(1):1.

98. Boutilier AJ, Elsawa SF. Macrophage Polarization States in the Tumor Microenvironment. Int J Mol Sci. 29 juin 2021;22(13):6995.

99. Jayasingam SD, Citartan M, Thang TH, Mat Zin AA, Ang KC, Ch'ng ES. Evaluating the Polarization of Tumor-Associated Macrophages Into M1 and M2 Phenotypes in Human Cancer Tissue: Technicalities and Challenges in Routine Clinical Practice. Front Oncol. 24 janv 2020;9:1512.

100. Qiao B, Huang J, Mei Z, Lam AK yin, Zhao J, Ying L. Analysis of Immune Microenvironment by Multiplex Immunohistochemistry Staining in Different Oral Diseases and Oral Squamous Cell Carcinoma. Front Oncol. 8 déc 2020;10:555757.

ANNEXES

Annexe 1. Comparaison du nombre de leucocytes par mm² en périphérie (p) et en profondeur (t), ainsi que du nombre de TILs exprimant CTLA-4, PD-1 par mm² en périphérie et en profondeur, du TPS et du CPS en fonction du score S-GRAS

	S-GRAS = 0-1 n = 14 (31.8)	**S-GRAS = 2-3** n = 10 (22.7)	**S-GRAS = 4-5** n = 9 (20.5)	**S-GRAS = 6-9** n = 11 (25)	**Comparaison des groupes (*p-value*)**
CD4p	70.1 ± 78.2[a] 40 (19 ; 84)b 7 | 284[c]	35.0 ± 63.2 14 (7 ; 22) 3 | 201	12.2 ± 7.6 12 (5 ; 17) 3 | 23	20.6 ± 23.2 9 (4 ; 41) 2 | 73	**0.015**
Comparaison 2 à 2	S-GRAS = 0-1	S-GRAS = 2-3			0.16
	S-GRAS = 0-1		**S-GRAS = 4-5**		**0.024**
	S-GRAS = 0-1			S-GRAS = 6-9	0.066
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.95
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.98
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	1.00
CD4t	42.2 ± 54 19 (9 ; 38) 5 | 181	52.7 ± 85.1 22.5 (12 ; 41) 3 | 284	20.9 ± 22.8 11 (9 ; 23) 2 | 72	16.3 ± 11.0 15 (6 ; 28) 2 | 31	0.40
CD8p	122.4 ± 131.7 54.5 (36 ; 213) 6 | 395	48.7 ± 51.5 36 (18 ; 43) 6 | 152	15.8 ± 9.3 16 (9 ; 22) 3 | 32	20.9 ± 34.4 6 (4 ; 13) 2 | 112	**0.001**
Comparaison 2 à 2	S-GRAS = 0-1	S-GRAS = 2-3			0.32
	S-GRAS = 0-1		**S-GRAS = 4-5**		**0.011**
	S-GRAS = 0-1			**S-GRAS = 6-9**	**0.012**
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.31
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.12
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	0.59

[a] : Moyenne ± écart-type

[b] : Médiane (Q1 ; Q3)

[c] : Minimum | Maximum

Annexe 1. (suite)

	S-GRAS = 0-1 n = 14 (31.8)	**S-GRAS = 2-3** n = 10 (22.7)	**S-GRAS = 4-5** n = 9 (20.5)	**S-GRAS = 6-9** n = 11 (25)	**Comparaison des groupes (*p-value*)**
CD8t	55.8 ± 49.9 41 (14 ; 111) 1 | 142	38.1 ± 31.2 38 (12 ; 46) 1 | 93	13.1 ± 17.4 6 (3 ; 14) 1 | 56	12.6 ± 9.5 14 (7 ; 15) 0 | 36	**0.018**
Comparaison 2 à 2	S-GRAS = 0-1	S-GRAS = 2-3			0.88
	S-GRAS = 0-1		S-GRAS = 4-5		0.078
	S-GRAS = 0-1			S-GRAS = 6-9	0.085
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.26
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.20
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	0.84
Rapport CD4/CD8p	1 ± 1.1 0.6 (0.4 ; 1.2) 0.1 | 3.8	0.8 ± 0.7 0.4 (0.3 ; 1.1) 0.2 | 2.3	1.1 ± 0.8 0.8 (0.7 ; 1.7) 0.1 | 2.4	2.6 ± 4.1 1.5 (0.4 ; 2.3) 0.2 | 14.6	0.39
Rapport CD4/CD8t	1.5 ± 2.4 0.7 (0.6 ; 0.9) 0.3 | 9	2.2 ± 3.6 0.8 (0.6 ; 2) 0.3 | 12	3.3 ± 3.6 1.6 (1 ; 3.5) 0.4 | 11	1.8 ± 1.4 1.5 (0.6 ; 2.8) 0.3 | 4	0.38
Rapport granzyme/CD8	0.1 ± 0.1 0 (0 ; 0.1) 0 | 0.3	0.2 ± 0.3 0.1 (0 ; 0.3) 0 | 0.9	0.3 ± 0.2 0.2 (0.1 ; 0.4) 0.1 | 0.5	0.2 ± 0.2 0.2 (0.1 ; 0.4) 0 | 0.6	Non applicable
Rapport FoxP3/CD4	0.1 ± 0.2 0.1 (0 ; 0.1) 0 | 0.7	0.2 ± 0.2 0.1 (0 ; 0.2) 0 | 0.7	0.1 ± 0.1 0.1 (0.1 ; 0.2) 0 | 0.3	0.3 ± 0.3 0.3 (0 ; 0.3) 0 | 1.0	0.20
CD20p	33.3 ± 99.7 1.5 (0 ; 15) 0 | 378	3.6 ± 5.8 1 (0 ; 4) 0 | 18	1.0 ± 1.3 0 (0 ; 2) 0 | 3	2 ± 3.6 1 (0 ; 2) 0 | 12	0.31

Annexe 1. (suite)

	S-GRAS = 0-1 n = 14 (31.8)	**S-GRAS = 2-3** n = 10 (22.7)	**S-GRAS = 4-5** n = 9 (20.5)	**S-GRAS = 6-9** n = 11 (25)	**Comparaison des groupes (*p-value*)**
CD20t	6.8 ± 13.6 1 (0 ; 4) 0 | 41	1.1 ± 1.5 1 (0 ; 1) 0 | 5	3.4 ± 7 1 (1 ; 2) 0 | 22	0.7 ± 1.3 0 (0 ; 1) 0 | 4	0.26
CD68p	565.9 ± 301.7 528 (358 ; 696) 146 | 1144	538.3 ± 381.1 479 (334 ; 523) 238 | 1509	362.7 ± 159.7 317 (254 ; 424) 193 | 674	371.5 ± 143.6 352 (258 ; 436) 218 | 700	0.15
CD68t	560.9 ± 264.8 536 (360 ; 824) 154 | 1018	627.2 ± 359.4 567 (488 ; 778)	343.3 ± 209.7 308 (141 ; 508)	360.7 ± 140 364 (243 ; 453)	**0.037**
Comparaison 2 à 2	S-GRAS = 0-1	S-GRAS = 2-3			1.00
	S-GRAS = 0-1		S-GRAS = 4-5		0.23
	S-GRAS = 0-1			S-GRAS = 6-9	0.22
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.17
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.093
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	0.99
CD117p	42.2 ± 98.2 6 (2 ; 22) 0 | 365	1.2 ± 1.8 0 (0 ; 2) 0 | 5	0.1 ± 0.3 0 (0 ; 0) 0 | 1	0.6 ± 1.2 0 (0 ; 1) 0 | 3	**<0.001**
Comparaison 2 à 2	**S-GRAS = 0-1**	**S-GRAS = 2-3**			**0.040**
	S-GRAS = 0-1		**S-GRAS = 4-5**		**0.003**
	S-GRAS = 0-1			**S-GRAS = 6-9**	**0.005**
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.34
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.85
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	0.76

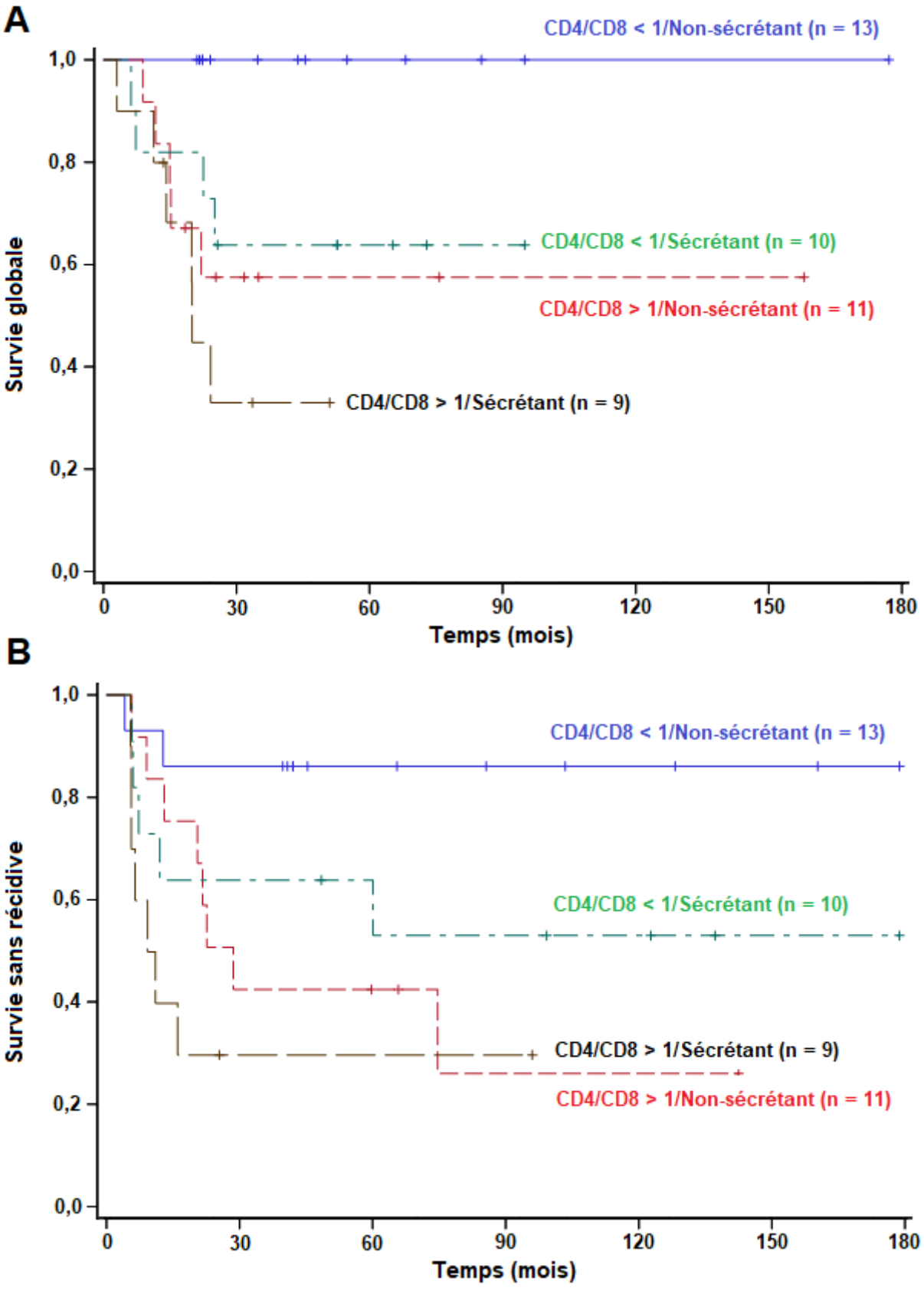
Annexe 1. (suite)

	S-GRAS = 0-1 n = 14 (31.8)	**S-GRAS = 2-3** n = 10 (22.7)	**S-GRAS = 4-5** n = 9 (20.5)	**S-GRAS = 6-9** n = 11 (25)	**Comparaison des groupes (*p-value*)**
CD117t	20.9 ± 66.3 2. (0 ; 7) 0 | 251	2.5 ± 4.1 0.5 (0 ; 3) 0 | 11	0.2 ± 0.4 0 (0 ; 0) 0 | 1	0.3 ± 0.9 0 (0 ; 0) 0 | 3	**0.014**
Comparaison 2 à 2	S-GRAS = 0-1	S-GRAS = 2-3			0.81
	S-GRAS = 0-1		S-GRAS = 4-5		0.087
	S-GRAS = 0-1			**S-GRAS = 6-9**	**0.036**
		S-GRAS = 2-3	S-GRAS = 4-5		0.46
		S-GRAS = 2-3		S-GRAS = 6-9	0.19
			S-GRAS = 4-5	S-GRAS = 6-9	0.91
CTLA-4p	2.2 ± 3.4 0 (0 ; 4) 0 | 11	0.2 ± 0.4 0 (0 ; 0) 0 | 1	2.8 ± 7.2 0 (0 ; 1) 0 | 22	3.1 ± 5.4 0 (0 ; 6) 0 | 17	0.51
CTLA-4t	3.2 ± 5.1 1 (0 ; 5) 0 | 17	2 ± 3 1 (0 ; 2) 0 | 10	1 ± 2 0 (0 ; 1) 0 | 6	1.8 ± 3 0 (0 ; 4) 0 | 9	0.57
PD-1p	5.1 ± 10.6 0.5 (0 ; 2) 0 | 37	0.6 ± 1.3 0 (0 ; 0) 0 | 4	1.2 ± 2.7 0 (0 ; 0) 0 | 8	2.5 ± 7.5 0 (0 ; 1) 0 | 25	0.42
PD-1t	2.2 ± 4.5 1 (0 ; 2) 0 | 17	0.7 ± 1.1 0 (0 ; 1) 0 | 3	0.7 ± 1 0 (0 ; 1) 0 | 3	1.5 ± 4.8 0 (0 ; 0) 0 | 16	0.32

Annexe 1. (suite)

	S-GRAS = 0-1 n = 14 (31.8)	**S-GRAS = 2-3** n = 10 (22.7)	**S-GRAS = 4-5** n = 9 (20.5)	**S-GRAS = 6-9** n = 11 (25)	**Comparaison des groupes (*p-value*)**
TPS					
- < 1 %	12 (85.7)	8 (80)	7 (77.8)	10 (90.9)	Non applicable
- 1-49 %	1 (7.1)	2 (20)	2 (22.2)	1 (9.1)	
- ≥ 50 %	1 (7.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
CPS					
- < 1	12 (85.7)	10 (100)	7 (77.8)	10 (90.9)	Non applicable
- ≥ 1	2 (14.3)	0 (0)	2 (22.2)	1 (9.1)	

Annexe 2. Survies globale **(A)** et sans récidive **(B)** des patients opérés d'un carcinome corticosurrénalien en fonction du rapport des TILs CD4+/CD8+ et du statut sécrétant.



AUTEUR : Nom : GIOANNI **Prénom : Thibaut**

Date de soutenance : jeudi 29 septembre 2022

Titre de la thèse : Étude immunohistochimique du microenvironnement tumoral d'une série de 44 carcinomes corticosurrénaliens

Thèse - Médecine – Lille 2022
Cadre de classement : *Anatomie et Cytologie Pathologiques*
DES + FST/option : *Anatomie et Cytologie Pathologiques*
Mots-clés : carcinome corticosurrénalien, microenvironnement, immunothérapie

Contexte
Les carcinomes corticosurrénaliens (CCS) sont des tumeurs rares, de pronostic défavorable, souvent diagnostiquées à un stade avancé. Après chirurgie, le taux de récidive reste élevé et l'arsenal thérapeutique après récidive ou lésion métastatique reste limité. L'immunothérapie a révolutionné la prise en charge de certains cancers (mélanome, poumon…), tandis que les essais sur les patients atteints de CCS se sont révélés décevants. Une partie du problème est que l'interaction de ces tumeurs avec leur micro-environnement est mal connue. La sécrétion de glucocorticoïdes par les CCS (environ la moitié des cas) semble également jouer un rôle immunosuppresseur au niveau loco-régional. L'objectif de ce travail est donc de mieux caractériser le microenvironnement de ces tumeurs et d'évaluer l'impact de la sécrétion de glucocorticoïdes sur celui-ci.

Méthode
Une analyse rétrospective a été menée sur les CCS opérés au CHU de Lille durant la période de 2014 à 2021. Une étude immunohistochimique après réalisation de *tissue microarrays* a été effectuée sur 44 CCS, permettant la quantification intra-tumorale de plusieurs populations leucocytaires et l'évaluation de l'expression de marqueurs théranostiques.

Résultats
Les CCS sécrétants possédaient significativement moins de lymphocytes intra-tumoraux (TILs) CD4+ ($p = 0,014$), CD8+ ($p = 0,017$), CD20+ ($p = 0,034$) ainsi que de mastocytes intra-tumoraux ($p < 0,001$) que ceux non-sécrétants. Le caractère sécrétant tumoral était associé à des survies globale et sans récidive moindres. Un rapport de TILs CD4/CD8 > 1 était associé à une survie globale moindre, et l'absence de mastocytes intra-tumoraux était associée à des survies globale et sans récidive abaissées.

Conclusion
Nos résultats sont concordants avec les données de la littérature. Non seulement la sécrétion de glucocorticoïdes par les CCS a un impact péjoratif sur la survie, mais elle induit aussi des changements dans la composition de leur microenvironnement tumoral avec notamment des concentrations en TILs CD4+ et CD8+ abaissées. Nos résultats suggèrent également un rôle pronostique favorable de la présence de mastocytes intra-tumoraux. L'étude des marqueurs théranostiques (PD-1, PD-L1 et CTLA-4) n'a pas démontré de différence d'expression statistiquement significative entre les deux groupes.

Composition du Jury :

Président : Madame le Professeur Emmanuelle LETEURTRE

Assesseurs :
Madame le Docteur Christine DO CAO
Monsieur le Docteur Arnaud JANNIN

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Sébastien AUBERT