

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE  
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université BLIDA 1  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie (S N V)  
Filière de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études  
En vue de l'obtention du diplôme de Master

Option : Génétique - physiologie

Thème

## Thérapeutique ciblée dans le cancer du sein

*Présenté par :*

**HAMMANI KHADIDJA  
TOUARI IMENE**

*Soutenu le 18/12/2014 devant le jury composé de :*

M. Mohamed Said Ramadan	Maitre assistant A à l'université de Blida	Président
M. Ben ali	Maitre assistant B à l'Université de Blida	Examinatrice
M <sup>me</sup> Guessaïbi	Maitre de conférences B à l'Université de Blida	Promotrice
M <sup>me</sup> Benkhedda	Maitre conférences A à l'Université de Blida	Co-Promotrice

Promotion **2013-2014**

## **REMERCIEMENTS**

*La réalisation de ce mémoire a été possible grâce au concours de plusieurs personnes à qui nous voudrais témoigner toute notre reconnaissance.*

*En premiers lieu, nous tenons à remercier notre promotrice Dr GuessaibiaNadia, pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieuxconseils, qui ont contribué à alimenter nos réflexion.*

*Nos remerciements vont également aux membres du jury pour avoir accepté d'évaluer ce travail.*

*Nous tenons aussi à remercier notre co-promotrice Dr Ben khedda et touts l'équipe du laboratoire Anatomo-Pathologie CHU Blida.*

*Nos sincères remerciements s'adressent à professeur Smaili et touts les médecins de service l'oncologie.*

*Nous tenons àremercier spécialement Dr Hidach qui nous aider vraiment.*

*Nous tenons à remercier les enseignants d'avoir enrichi nos connaissances et de nous avoir guidés durant toutes ces années*

***Je dédie ce mémoire à :***

*· Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes frères et ma tante (fazo) et ma sœur Nessrine qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance et de générosité.*

*Mon fiancé qui m'a aidé et toujours soutenu et encouragé au cours de la réalisation de ce mémoire.*

*Mes amies qui m'ont toujours encouragé et soutenu psychologiquement.*

*Tous ceux qui ont contribué de près ou de loin à la réussite de ce travail.*

## *HAMMANI KHADIDJA*

*✿ Je dédie ce Mémoire à ... ✍*

A ma très chère mère

Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.

Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.

Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.

Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.

A mon chère père

Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour,

l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous.

Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être.

Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.

A mon mari : la personne qui a su guider mes pas égarés vers un horizon plus clair, plus joyeux.

A Mes chères frères et ma chère sœur pour leur affections, compréhension et patience

Ma chère binôme « HAMMANI KHADIDJA » et à toute sa famille

**Résumé :**

Le cancer du sein représente le cancer le plus fréquent dans le monde .Il est devenu l'une des causes principales de décès en Algérie .Notre travail composé de deux parties essentielles.

D'une part, nous avons effectué l'étude immunohistochimique de blocs comportant des échantillons de carcinomes mammaires de 40 patientes afin d'évaluer l'expression de la protéine HER2 et d'autre part , nous avons mené une enquête génétique concernant les patientes issues de familles présentant plusieurs membres atteints de cancers.

Nos résultats ont montré que l'expression de la protéine HER2 présente un pourcentage de 5% par rapport à la population étudiée, ce qui est eu accord avec la littérature.

L'enquête génétique a fait ressortir un mode de transmission autosomique récessif commun aux 6 généalogies étudiées.

Nous avons également montre l'existence d'une relation entre différents types de cancer.

Une meilleure connaissance de ces mécanismes tumoraux permettra d'établir une thérapie moléculaire ciblée.

Mots clés :cancer du sein , HER2,immunohistochimie ,enquête génétique.

## **ABSTRACT**

The breast cancer represents the most frequent cancer in the world. It became one of the main causes of death in Algeria. Our work made up of two essential parts. On the one hand, we carried out the immunohistochemic study of blocks comprising of the mammary samples of carcinomata of 40 patients in order to evaluate the form of protein HER2 and on the other hand, we conducted a genetic investigation concerning the patients resulting families introducing several members reached from cancers.

Our results have watch which the form of protein HER2 presents a percentage of 5% compared to the studied population, which is had agreement with the literature. The genetic investigation emphasized a recessive autosomic mode of transmission common to the 6 studied genealogies. We also have watch exists it of a relation between various types of cancer.

The best knows these tumoral mechanisms will make it possible to establish a targeted molecular therapy.

Keywords: HER2, breast cancer, immunohistochemistry, genetic investigation.

## ملخص

سرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطان شيوعا في العالم ولقد أصبح واحدا من الأسباب للوفاة في الجزائر

بحثنا يتكون من جزئين رئيسيين.

أولاً، أجرينا دراسة مناعية نسيجية كيميائية لتقييم تعبير البروتين من عينات مريضة مصابة بسرطان الثدي ومن ناحية أخرى قمنا بتحقيق وراثي على مرضى ينتمون إلى اسر يعاني عدد من أفرادها من سرطان الثدي.

وأظهرت نتائجها أن نسبة التعبير عن البروتين تمثل من المجتمع الدراسة، وهو يتوافق مع دراسات أخرى وابرر التحقيق الوراثي إن الانتقال هو جسمي متنحي مشترك عند الأنساب المدروسة .

ولقد أظهرنا أيضا وجود علاقة بين أنواع مختلفة من السرطان

المعرفة الجيدة لآليات الورم تكمن من وضع علاج جزئي مستهدف .

كلمات المفتاح : سرطان الثدي، مناعية نسيجية كيميائية ،التحقيق الوراثي

## LISTE DES FIGUERS

**Figure N°1** : Anatomie du sein.

**Figure N°2** : Acinus ou alvéole mammaire.

**Figure N°3** : une image qui présente un carcinome in situ.

**Figure N°4** : Le passage d'un carcinome mammaire de l'in situ à l'infiltrant.

**Figure 5** :Relation possible entre le modèle de développement hiérarchique des cellules épithéliales de la glande mammaire et les différents sous-types de tumeurs mammaires

**Figure 6** : l'organisation du gène ESR1

**Figure 7** : l'organisation du gène ESR2

**Figure 8** :Structure déterminée au rayons X du domaine liaison au ligand du RE $\alpha$

**Figure9**:Les domaines structuraux et les domaines fonctionnels des protéines RE $\alpha$  et RE $\beta$  .

**Figure10**. Séquence consensus de l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE)

**Figure 11** : modèle d'action classique (voie génomique ERE dépendante)

**Figure12** :. Représentation schématique des 3 modes par lesquels les ER modulent la transcription des gènes cibles

**Figure13** :Les différentes voies de signalisation des oestrogènes

**Figure 13** : isoforme du récepteur du progestérone.

**Figure 14** : Voies de signalisation de PR

**Figure 15** : localisation du gène HER2

**Figure 16** : La localisation chromosomique d'erbb2 et son amplification dans le génome des cellules en provenance de la glande mammaire cancéreuse

**Figure 17:** Structure du récepteur ERBB

**Figure 18 :**Voie d'activation de signalisation ErbB

**Figure N°19 :**Suppression de la synthèse des œstrogènes d'origine ovarienne

**Figure N°20 :** Mode d'action des anti –aromatases

**Figure N°21 :**Représentation schématique de l'activité aromatase

**Figure N°22 :** Représentation schématique de l'action des deux types d'anti-aromatase

**Figure N°23 :** Représentation schématique de mode d'action des anti-œstrogène

**Figure N°24:** Hormonothérapie de cancer du sein

**Figure N° 25:** Mode d'action de bévacizumab

**Figure N° 26:** Mode d'action de Trastuzumab

**Figure N° 27:**Mode d'action du lapatinib

**Figure N°28:** Images représentatives de l'amplification (A) et de la surexpression (B) de Her2/*neu* dans un cancer du sein, mis en évidence par hybridation in situ (A) et par immunohistochimie (B)

**Figure N°29 :** A- pièce mastectomie avec curage axillaire B-Pièce de mastectomie montre la d'une tumeur

**FigureN°30 :** la réaction immuno-enzymatique catalysée par peroxydase de raifort.

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADCC: Antibody-Dependent Cell-mediated Cytotoxicity.

ADN :AcideDésoxyruboNucléïque

AF : Activation Functiondomain

AP-1: ActivatorProtéin 1.

ARNm : AcideRibo-Nucléaiquemessenger

BRCA 1: BReast Cancer 1.

BRCA2: BReast Cancer 2.

C : Carcinom

CCI : Carcinome Canalaire Infiltrant

CDK : Cyclin –Dépendent Kinase.

CISH : Chromogenic In Situ Hybridisation

CLI : Carcinome Lobulaire Infiltrant

DAB : Tétrahydrochorure de 3,3-diAminoBenzidine.

DBD: DNA Binding Domain.

DDT: DichloroDiphénylTrichoroéthane.

EDC : Extracellular Domain ou domaine extracellulaire

EGFR : Epidermal growth factor receptor

ELISA : Enzyme-linked Immunosorbent assays

ER : EstrogenReceptor.

ERE : Élément de réponse à l'œstrogène

ERP : Élément de Réponse de la Progestérone.

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

HER2: Human Epidermal Growth factor 2.

HSP90 : HeatShockProteins ou protéines de choc thermique .

IGF1 : Insulin-like Growth Factor

IHC :Immutohistochimie .

LBD : Ligand Binding Domain .

LH-RH: Luteinizing Hormone Releasing Hormone.

MAP K: Mitogen-Activated Protein Kinase

NLS : Séquence de Localisation Nucléaire.

NRG: Neuréguline.

PI3K : Phosphatidyl-Inositol3'-Kinase

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBS :Phosphate Buffered Saline

PCR : Polymerase Chain Reaction

RE : Récepteur à l'œstrogène

RH : Récepteurs hormonaux

SERM : Selective Estrogen Receptor Modulator.

SP1: Specificity Protein 1.

TGFβ: Transforming Growth Factor beta.

TNM: Tumor,Node,Metastasis.

## SOMMAIRE

Liste des abréviations

Liste des figures

Résumé

Introduction .....01

### CHAPITRE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I-1 Anatomie du sein .....02

I-2 Histologie de la glande mammaire .....03

I-3 Structure de l'épithélium mammaire.....03

I-4 Définition du cancer du sein .....04

I-5 Les types du cancer sein .....04

I-5-1 Les carcinomes in situ .....04

I-5-2 Les carcinomes infiltrants .....05

I-5-3 De l'in situ à l'infiltrant .....05

I-6- Les sous-types moléculaires des cancers du sein :.....05

I- I-6-1-Basal .....05

I-6-2-HER2 .....	06
I-6-3-Luminal .....	06
I-7classifications d'usage dans le cancer du sein .....	06
I-8 -Facteurs de risque du cancer du sein .....	07
I-8-1 Facteurs hormonaux endogènes .....	07
I-8-2 Facteurs hormonaux exogènes .....	07
I-8-3Facteurs génétiques, environnementaux, démographiques et sanitaires ...	07
I-9 Régulation, dysrégulation et traitement du cancer du sein : rôle des récepteurs hormonaux et l'oncogène HER2 .....	08
I-9-1 RECEPTEURS HORMONAUX ET CANCER DU SEIN.....	08
I-9- I-9-1-1-2 Régulation de l'expression des REs .....	08
1-1récepteur à l'œstrogène (RE) .....	08
I-9-1-1-3 Structure du REs .....	09
I-9-1-1-4 Mécanismes d'action des ER .....	11
A-I-Régulation de la transcription par la voie génomique.....	11
B-Régulation de la transcription par la voie non génomique .....	14
I-9-1-2 récepteur à la progestérone .....	15
I-9-1-2 1-Structure et isoformes .....	15
I-9-1-2 -2 Mécanismes d'action des PR .....	17
I-9-2HER2 ET CANCER DU SEIN .....	18
I-9-2-1- Le récepteur HER2 .....	18
I-9-2-2-L'oncogène HER2 .....	18
I-9-2-3Étude structurale du récepteur d'ERBB2 .....	19
I-9-2-4Mécanismes d'activation .....	20
I-9-2-5 Récepteur Her2 et cancer du sein .....	21
I-10 Traitement du cancer du sein.....	22

I-10-1 Hormonothérapie.....	22
I-10-2 Thérapie ciblée Anti HER2.....	27
I-11 Détermination de statut Her2 .....	30
I-11-1- L'immunohistochimie .....	30
I-11 -2 L'hybridation fluorescente in situ (FISH).....	31
CHAPITRE II :MATERIEL ET METHODES .....	32
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION .....	38
CONCLUSION .....	56
REFERENCE BIBLIOGREPHIQUE.....	57
ANNEXE.....	62

## **Introduction :**

Le cancer constitue l'un des problèmes de santé publique à l'échelle mondiale et l'un des préoccupations majeures en matière de recherche dans toute les régions du monde .L'ampleur de cette morbidité n'a fait qu'accroître au cours de ces dernières années. Le cancer est devenu l'une des causes essentielles des décès en Algérie.(anonym).

Le cancer du sein est le premier cancer féminin dans le monde, mais aussi en Algérie. 10000 nouveaux cas de cancer du sein sont enregistrés, 4500 cas sont près en charge par les structures de santé publique ,3500 personnes touchées par la maladie meurent chaque année.

(anonym).

Les facteurs cliniques et pathologiques comme la taille tumorale, le type histologique, le grade histologique, les métastases ganglionnaires, les embolies vasculaires, la prolifération, la présence d'une composante in situ et l'âge peuvent servir comme facteurs pronostiques et prédictifs de la réponse à une thérapie adjuvante.

Cependant, les nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs sont nécessaires pour distinguer des sous-groupes de carcinomes qui paraissent homogènes selon les critères cliniques et pathologiques classiques, mais qui ont des aspects biologiques différents.

Parmi ces facteurs les récepteurs à l'œstrogène et à la progestérone et l'HER-2 dont l'expression est extrêmement importante dans la biologie du cancer du sein vu qu'elle apporte au clinicien une information d'ordre pronostique et thérapeutique. (HAMMAS 2009)

Ces nouvelles thérapeutique, dites « thérapeutique ciblées », désignent des traitements dirigés contre des molécules supposées jouer un rôle dans l'acquisition du phénotype tumoral.

Elles se caractérisent donc par une activité ciblée sur les cellules cancéreuses et ,plus spécifiquement , sur les voies complexes de signalisation de la multiplication cellulaire , altérée dans les processus néoplasiques . (Gennigens et al ... 2007)

Notre objectif est de mettre en évidence une classification moléculaire grâce, principalement aux techniques d'immunohistochimie dans le but d'appliquer la thérapeutique ciblée dans le cancer du sein.

# CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

## I-1 Anatomie du sein :

Le sein est composé d'une glande mammaire, de fibres de soutien (ligaments de Cooper) et de graisse (tissu adipeux); le tout est recouvert par la peau. La quantité de chacune de ses composantes peut varier d'une femme à l'autre. Le sein est situé par-dessus le muscle pectoral. On trouve également dans le sein des nerfs, des vaisseaux sanguins et lymphatiques. La glande mammaire est divisée en 15 à 20 sections qu'on appelle lobes, composés de lobules. Ceux-ci sont reliés à des canaux qui se rendent sous le mamelon (situé au centre du sein). On peut également observer des chaînes de ganglions lymphatiques qui filtrent les microbes et protègent le corps contre l'infection et la maladie. Le cancer du sein peut se développer tant au niveau d'un canal galactophore que d'un lobule et il peut également se retrouver au niveau des ganglions lymphatiques. (fig 1).(société canadienne du cancer 2014).

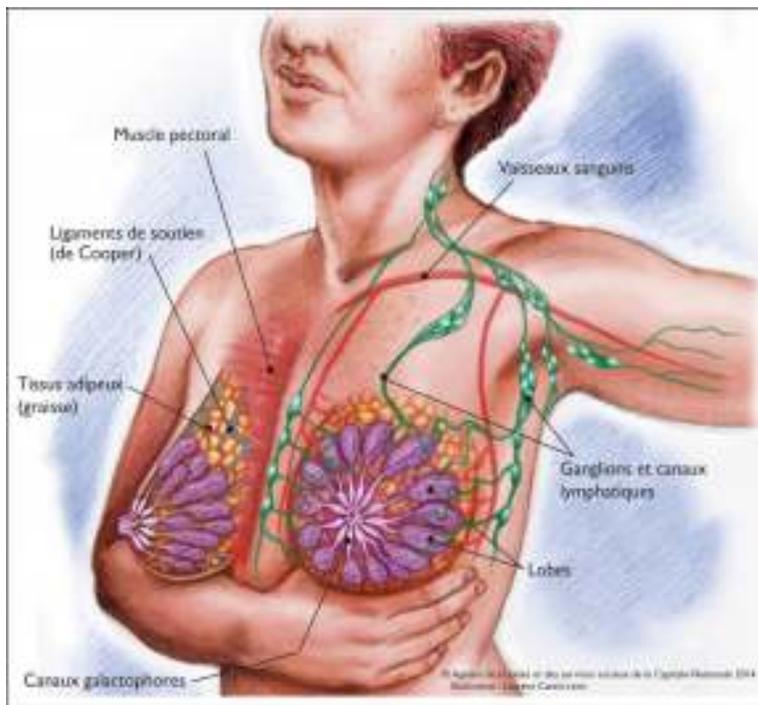
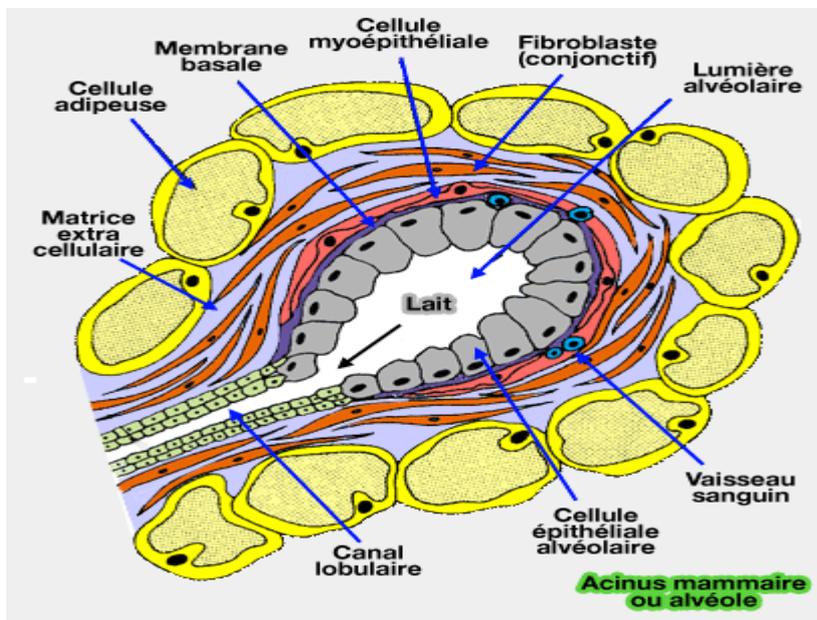


Figure 1 : Anatomie du sein(société canadienne du cancer 2014).

## I-2 Histologie de la glande mammaire :

La glande mammaire est formée d'une part de tubes glandulaires ou galactophores, bordés d'une double couche cellulaire : une couche interne de cellules épithéliales cylindriques (les cellules luminales) et une couche externe de cellules pavimenteuses unistratifiées (les cellules myoépithéliales). Le tout est entouré de la membrane basale. D'autre part, la glande mammaire est formée de tissu conjonctif. Ce tissu conjonctif se différencie au moment de la puberté en deux parties, le tissu interstitiel banal qui constitue le support des lobes et comporte de nombreuses cellules adipeuses, immunitaires, et des fibrocytes et le tissu conjonctif lâche ou tissu palléal (encore appelé stroma) qui comporte des fibres de collagène, de réticuline et d'élastine, des protéoglycanes, et une substance amorphe à la fois élastique et résistante. (Dubard, 2013)



**Figure 2 :** Acinus ou alvéole mammaire  
(Martinet J., Houdebine L.-M, 2002)

## I-3 Structure de l'épithélium mammaire :

Pour comprendre l'oncogenèse mammaire et la classification actuelle des cancers du sein, il faut connaître l'histologie de l'épithélium mammaire normal. Ce dernier comprend deux types de cellules différenciées, les cellules luminales et les cellules myoépithéliales. A cela il faut ajouter les cellules souches et les progéniteurs plus ou moins engagés sur une voie de différenciation. Les cellules luminales bordent la lumière des canaux et des lobules. Les cellules myoépithéliales entourent les cellules luminales et sont en contact avec la lame basale et le stroma environnant. Les cellules souches, plus rares, sont situées en position basale ou

supra-basale, probablement au niveau de niches spécialisées. Les cellules luminales expriment des marqueurs associés aux récepteurs hormonaux (récepteurs des œstrogènes et de la progestérone), certaines cytokératines (CK8, CK18) ainsi que des facteurs de transcription spécifiques comme *GATA3* et *FOXA1*. Les cellules myoépithéliales expriment D'autres cytokératines (CK14) et, à l'état très différencié, des marqueurs du muscle lisse (actine du muscle lisse). (Afsset-Inserm 2008).

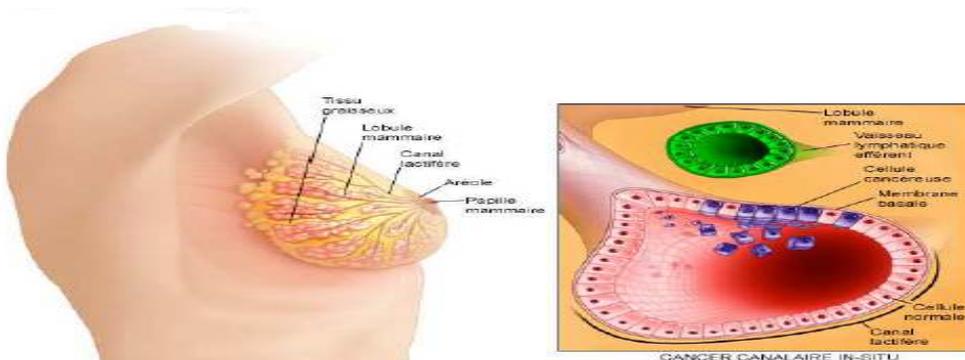
#### **I-4 Définition du cancer du sein :**

Le cancer du sein ou « carcinome mammaire » se définit comme une prolifération anarchique et incontrôlée des cellules épithéliales du sein. Qu'il s'agisse des cellules des canaux galactophores « carcinome canalaire » ou de celles des lobules « carcinome lobulaire », on parle « d'adénocarcinome » c'est-à-dire d'un cancer du tissu glandulaire. (Goudfelet Badis 2013).

#### **I-5 Les types du cancer du sein :**

##### **I-5-1 Les carcinomes in situ :**

Prolifération carcinomateuse qui se développe dans la lumière des canaux et des lobules, sans franchir la membrane basale et sans envahir le tissu conjonctif. (Yolande Maisonnète, Jean-loupsautière)



**Figure 3** : une image qui présente un carcinome in situ. (Yolande Maisonnète, Jean-loupsautière)

I-5-2 Les carcinomes infiltrants : Les cellules tumorales ont envahi le tissu conjonctif et peuvent donner des métastases..( YolandeMaisonnette,Jean-loupsautière)

I-5-3 De l'in situ à l'infiltrant :

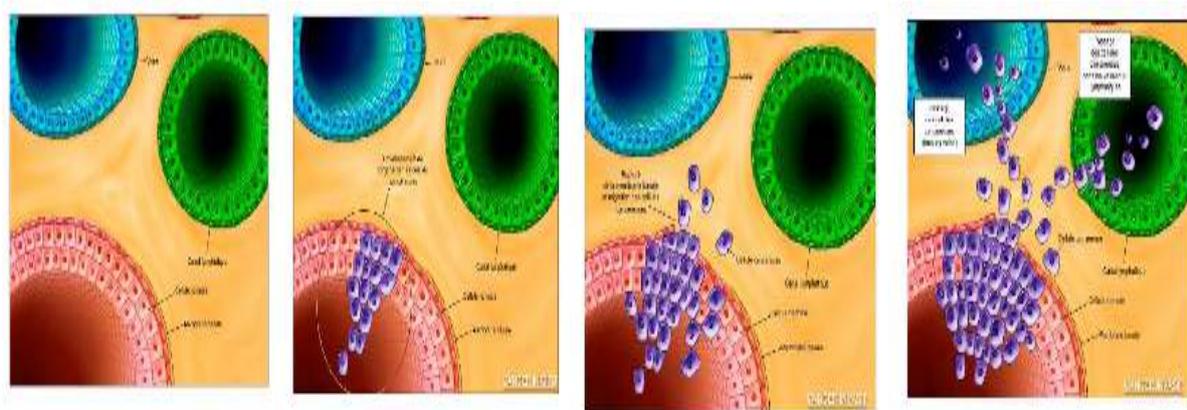


Figure 4 :le passage du carcinome mammaire de type in situ à l'infiltrant.(YolandeMaisonnette,Jean-loupsautière)

### I-6 Les sous-types moléculaires des cancers du sein :

récemment, l'étude des profils d'expression génique de plusieurs centaines de tumeurs mammaires permet de proposer une nouvelle classification dite "moléculaire" en classes ou sous types dans le cancer du sein. On a quatre sous-types bien individualisés : luminal, basal, HER2+, normal. Pour chaque sous-classe, les marqueurs biologiques exprimés ainsi que les types histologiques des tumeurs ont été étudiés. Ces catégories moléculaires ont des pronostics différents ce qui apporte un intérêt majeur dans le traitement de cancers du sein.

#### I-6-1 Basal :

Les tumeurs de type basal ou *basal-like* sont caractérisées par l'expression de gènes identiques à ceux exprimés par des lignées de cellules myoépithéliales. Les tumeurs ont un phénotype particulier et reproductible : récepteurs aux œstrogènes (RE) -, HER2-, expression d'au moins un marqueur de cellules basales (CK5/6, EGFR, vimentine, actine musculaire lisse, c-kit). Récepteurs à la progestérone (RP) -, présentent un taux plus élevé de mutation de p53 ; leur grade histopronostique est de III avec une activité mitotique élevée. On parle de **tumeurs "triple négatif"** (RE- RP- HER2-) Ces tumeurs ont un pronostic particulièrement mauvais et

des essais thérapeutiques se mettent en place pour cette catégorie de tumeurs représentant moins de 15 % des tumeurs du sein.

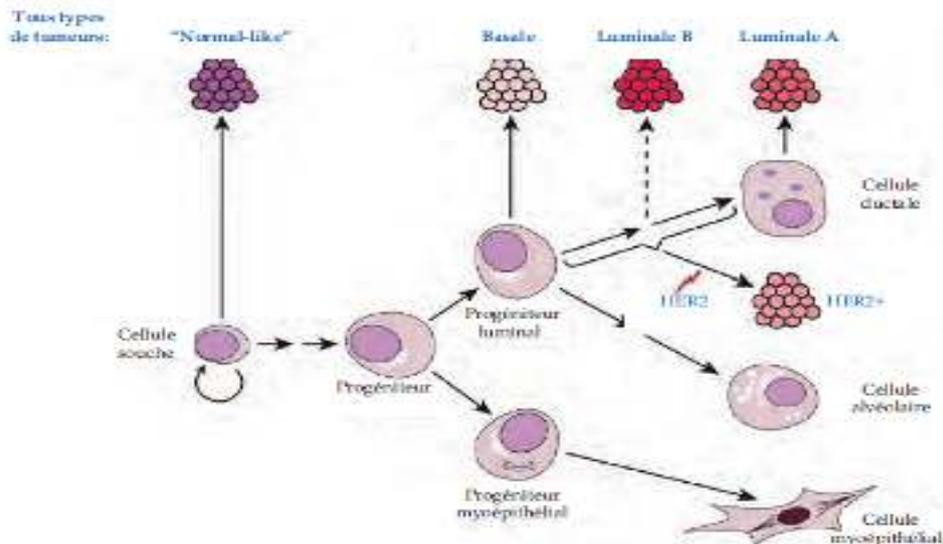
### I-6-2HER2 :

Ce groupe est le plus souvent défini comme incluant toutes les tumeurs HER2 + quelle que soit leur expression des récepteurs hormonaux. Un progéniteurluminal serait à l'origine de ces tumeurs. Leur phénotype est HER2+, CK8/18/19+. Ce groupe comprend les tumeurs de type canalaire infiltrant de grades II et III. Leur pronostic est défavorable. Environ 15 % des cancers du sein sont des HER2+.

### I-6-3Luminal :

Ce groupe comprend des tumeurs RE+ dont l'expression génique est proche de celle des cellules épithéliales luminales dont le profil immunohistochimique est caractérisé par l'expression de CK8/18 et CK19 qui comprend des tumeurs de faible grade.

Certaines études distinguent deux groupes : luminal A avec le pronostic le plus favorable (une forte expression de RE) et luminal B avec un pronostic moins bon que celui du groupe luminal A (une faible expression de RE). Le type "luminal" A (25 à 40 % des cas) et B (20 à 25 % des cas). (M.C. Mathieu, 2007)



**Figure5:** Relation possible entre le modèle de développement hiérarchique des cellules épithéliales de la glande mammaire et les différents sous-types de tumeurs mammaires. (Dupont, 2011).

**I-7 classifications d'usage dans le cancer du sein : (voir annexe I et I et III).**

**I-8 -Facteurs de risque du cancer du sein :**

**I-8-1 Facteurs hormonaux endogènes :**

▪ **Age précoce des premières menstruations :**

De nombreuses études montrent que la survenue des premières règles avant l'âge de 12 ans augmente le risque de cancer du sein. Le fondement biologique de cette association correspond à l'exposition précoce et prolongée à l'imprégnation hormonale qui existe durant la période d'activité des ovaires.

▪ **Ménopause tardive :**

Le risque de cancer du sein augmente d'environ 3 %, pour chaque année supplémentaire, à partir de l'âge présumé de la ménopause 50 ans.

**I-8-2 Facteurs hormonaux exogènes :**

▪ **Contraceptifs oraux :**

Le risque est augmenté d'environ 25 % chez les femmes utilisant couramment les contraceptifs oraux. Cependant, cet accroissement de risque chute dès l'arrêt de la consommation, de sorte que, 10 ans après l'arrêt de l'utilisation

▪ **Traitement hormonal substitutif (THS) :**

Le THS de la ménopause est prescrit pour pallier la diminution du niveau des hormones ovariennes circulantes. Les femmes sous THS présentent un risque augmenté de cancer du sein, si on les compare aux femmes qui ne l'ont jamais utilisé et le risque de cancer du sein augmente avec la durée d'utilisation. Cependant, le risque attribuable (effet réel du THS) diminue dès l'arrêt du traitement. Par ailleurs, l'effet du THS varie selon la composition des produits.

- **I-8-3 Facteurs génétiques, environnementaux, démographiques et sanitaires :**
- **Histoire familiale et mutations génétiques**

L'histoire familiale est associée, de manière régulière, à un risque accru de cancer du sein chez les femmes plus jeunes et lorsque la maladie s'est développée chez une proche parente (mère, fille ou sœur), avant l'âge de 50 ans . Par ailleurs, certaines mutations génétiques sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer du sein. Deux gènes, *BRC1* et *BCR2*, semblent les plus impliqués. Par rapport à la population générale, les femmes porteuses des mutations sur ces gènes présentent un risque accru de cancer du sein. Il est estimé que le risque associé aux mutations de ces gènes dépasse 80 % pour les femmes et 6 % pour les hommes,

- **Radiations ionisantes :**

Un suivi intensif de plusieurs groupes de population a montré que le sein est l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations L'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes.

Les radiations ionisantes augmentent le risque de cancer du sein dans la mesure où elles endommagent l'ADN et ses constituants.

- **Age :**

L'âge est le facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein. La maladie est rare chez les femmes de moins de 30 ans. Le risque augmente entre 50 et 75 ans (près des deux tiers des cancers du sein). (Nkondjock, Ghadirian 2005).

- **I-9 Régulation, dysrégulation et traitement du cancer du sein : rôle des récepteurs hormonaux et l'oncogène HER2**

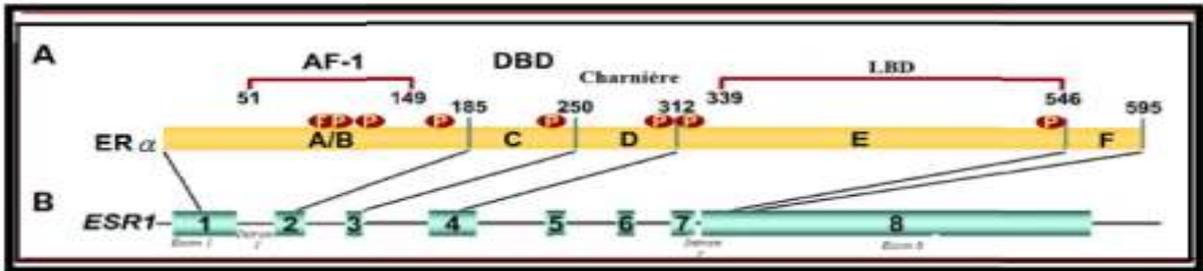
## **I-9-1 RECEPTEURS HORMONAUX ET CANCER DU SEIN:**

### **I-9-1-1 récepteur à l'œstrogène (RE) :**

Le récepteur à l'œstrogène fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires. Il agit comme un régulateur de la transcription nucléaire. le récepteur aux œstrogènes alpha ( $RE\alpha$ ) a été identifié par E. Jensen en 1960 à l'aide de ligands radioactifs.(Jensen,Jacobson 1962) Il a par la suite été cloné à partir de cellules cancéreuses mammaires MCF7 .Les REs existent sous deux formes :  $\alpha$  et  $\beta$ . ( SANCHEZ-DENEUX,2003)

### I-9-1-1-2 Régulation de l'expression des REs :

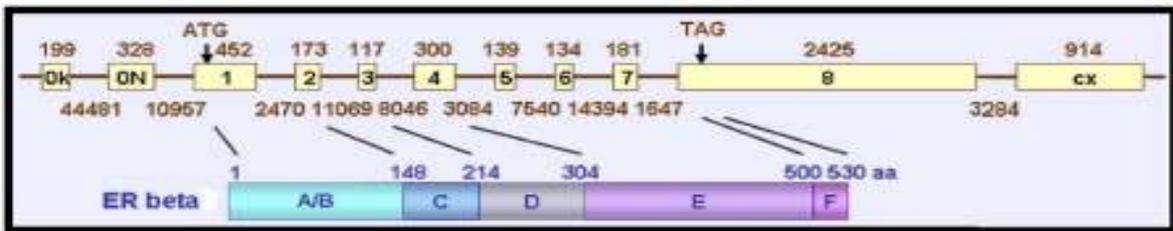
Le gène de RE $\alpha$ , nommé ESR1, est situé sur le bras long de chromosome 6 chez l'homme. Ce gène, du 14 Kpb, est constitué de 8 exons codants séparés par 7 introns (Fig), il est donc transcrit à partir de 7 promoteurs alternatifs donnant naissance à plusieurs isoformes d'ARNm possibles variant dans leur région 5'. Cette dernière n'étant généralement pas traduite on aboutit à une protéine de 66 Kpd (RE $\alpha$ ) (Reid et al., 2002). (Fig6).



**Figure 6 :** l'organisation du gène ESR1 (Reid et al., 2002).

Le gène du RE $\beta$  est nommé ESR2 est situé sur le chromosome 14 l'homme. Ce gène d'environ 63,2 Kb est organisé comme ESR1 en 8 exons séparés par 7 introns codant une protéine d'environ 60 Kd à (530 acides aminés)

Les exons « ON » et « OK » en position 3' ne sont pas traduits. un épissage alternatif peut intervenir, il en résulte des variantes tel que ER  $\beta$ cx qui ne lie pas l'œstradiol et se comporte comme un dominant négatif du RE $\alpha$  cet isoforme est retrouvée dans les cellules cancéreuses mammaires. (Zaho et al, 2007).



**Figure 7 :** l'organisation du gène ESR2. (Kos et al., 2001).

Il existe une régulation épigénétique qui est un mécanisme par lequel l'environnement influence sur l'expression des gènes sans altération des séquences nucléotidique. La méthylation de l'ADN entraîne une réduction de l'expression des RE $\beta$  et/ou RE $\alpha$ . c'est le cas des cellules tumorales mammaires RE $\alpha$  négatif.

### I-9-1-1-3 Structure du REs :

Les REs présentent une structure protéique et une organisation modulaire comportant des régions distinctes de A à F (figure) avec les domaines suivants :

- Le domaine A/B « N-terminal » comporte une fonction de Trans-activation ligand indépendante AF1 (Metzger et al., 1995). Ce domaine est l'un des moins bien conservés, avec seulement 23% de similarité entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$ . La région N-terminale contenant le domaine AF1 est également très peu conservée entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  (18% d'identité de séquence). Cette disparité de séquence entre les RE $\alpha$  et  $\beta$  au niveau de la région N-terminale pourrait expliquer les différences de réponse entre le RE $\alpha$  et le RE $\beta$  selon, le promoteur, le type cellulaire ou le ligand du RE (Sylvain, 2007).
- -le domaine C représente le domaine le plus conservé (97% d'homologie entre ER $\alpha$  et ER $\beta$ ) c'est le domaine de liaison à l'ADN (DNA Binding Domain DBD) .il reconnaît des séquences spécifiques d'ADN dites éléments de réponse aux œstrogène (ERE) .

Le DBD révèle deux doigts de zinc avec quatre cystéines conservées ,qui jouent un rôle important dans la dimérisation du récepteur , l'ion zinc sert à stabiliser le motif sous forme de doigt .( Goudfel et Badis., 2013).

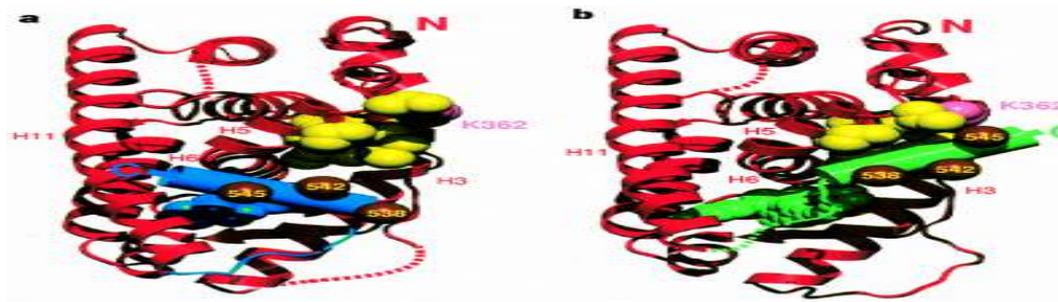
- Le domaine D est le domaine intermédiaire (« hingeregion ») entre le DBD et le LBD. Il permettrait des changements conformationnels du récepteur pendant l'activation grâce à une bonne flexibilité de sa structure.

C'est dans ce domaine que sont localisées les régions qui vont déterminer la localisation sub-cellulaire du récepteur, telles que le NLS (Signal de Localisation Nucléaire, petite séquence qui permet le transport du récepteur du cytoplasme vers le noyau ) .(SANCHEZ, 2003).

- Le domaine E :

Le domaine E (acides aminés 303 à 553 dans hER $\alpha$ ) contient le LBD, composé de 12 hélices  $\alpha$  qui forment une poche hydrophobe, permet la liaison de l'hormone. (SANCHEZ, 2003).le hélice H12 permet la dimérisation du récepteur et la transactivation des gènes ciblés via la fonction AF2 ligand dépendante. En effet la fixation d'œstradiol sur le récepteur entraîne un basculement de l'hélice H12 de ce dernier induisant une compaction de LBD et donc la stabilisation du dimère de récepteur sur les promoteurs .Il y aura alors dissociation des corépresseurs qui laisseront place aux coactivateurs .Le positionnement de l'hélice H12 est

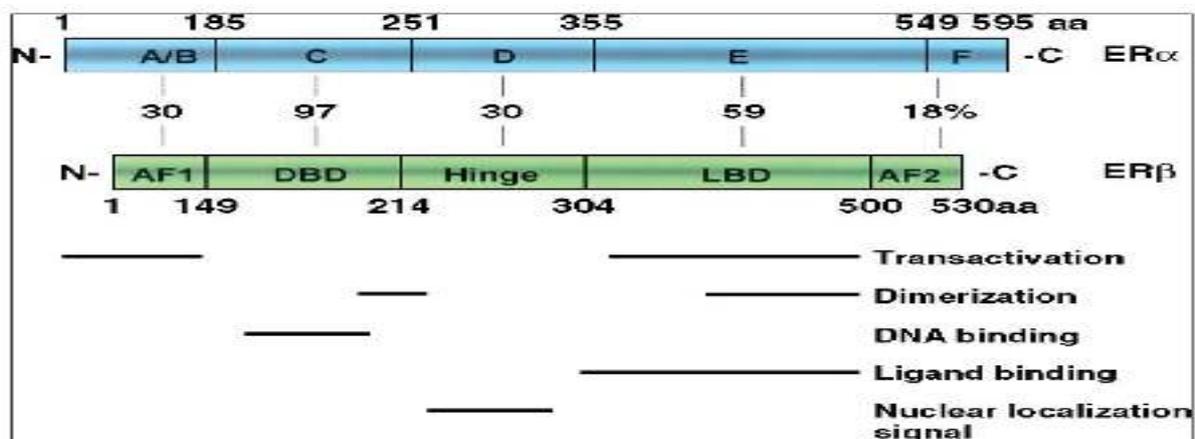
alors à l'origine des effets agonistes ou antagonistes des œstrogènes



**Figure 8** :Structure déterminée au rayons X du domaine liaison au ligand du RE $\alpha$  . l'hélice H12 dont la position varie en fonction est représentée par un cylindre bleu dans le cas de la liaison à l'œstradiol (a) et en vert dans le cas de la liaison à l'anti œstrogène partiel Raloxifène (b) .(Brzozowski,1997).

Le domaine F :

Le domaine F (acides aminés 554 à 595 dans ER $\alpha$ ) aurait un rôle dans la spécificité de reconnaissance de la liaison du récepteur à un ligand agoniste ou antagoniste , mais c'est un domaine mal connu.



**Figure 9** :Les domaines structuraux et les domaines fonctionnels des protéines RE $\alpha$  et RE $\beta$  . ( Speirs et Walker, 2007).

### I-9-1-1-4 Mécanismes d'action des ER :

Les récepteurs ER $\alpha$  et ER $\beta$  présentent des mécanismes d'activation transcriptionnelle

similaires selon différentes voies : la voie dite génomique et la voie dite non génomique.(Lecomte ,2009).

## **A-I-Régulation de la transcription par la voie génomique :**

La voie d'activation de la transcription dite génomique implique la fixation du ligand sur les ER (Lectome 2009) , cette voie peut être classifiée en classique ( ERE dépendante) et non classique ( ERE indépendante) .

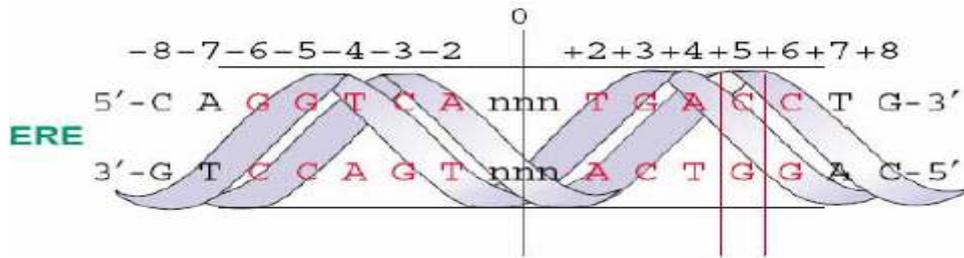
### **A-1 voie génomique classique (ERE dépendante) :**

Elle représente le mode d'action général des récepteurs hormonaux. en absence de stimulation oestrogénique, les RE sont sous forme monomérique et localisés dans cytoplasme ou` ils ont été synthétisés, ils sont maintenus sous cette forme inactive grâce à des interactions protéines-protéines qui s'opèrent entre le LBD libre de récepteur et un complexe multi protéique de protéine auxiliaires .ces protéines incluent les protéines de choc thermique

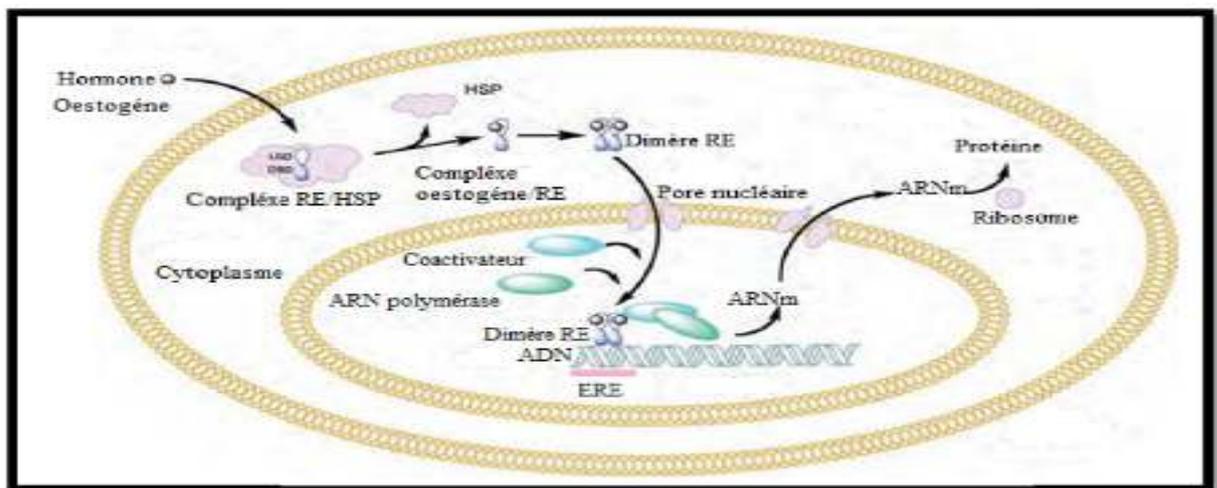
( HeatShockProteins) HSP90 ,HSP70 et la protéine p59,une protéine de la famille des immunophiline (prolyl-isomérase) ;le tout forme un complexe Apo-récepteur prêt à répondre au signal .(Sylvain, 2007)

Le domaine de liaison à l'hormone (le LBD) du REchange de conformation suite à sa liaison à l'hormone . Ce changement se traduit par le repositionnement de l'hélice 12 en C terminal du LBD et permet le passage à une forme transcriptionnellement active du RE(Sylvain 2007). cette forme active permettant la dissociation des corépresseurs et la dimérisation du récepteurs (homo-dimère  $ER\alpha$  / $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ / $ER\beta$  ou hétéro-dimère  $ER\alpha$  / $ER\beta$  ) d'une part, ainsi que la création d'une surface hydrophobe qui permettra des interaction avec les coactivateurs de la transcription d'autrepart ,le coactivateurs qui sont recrutés dans le noyau ont des activités histone acétylase et méthyl transférase qui permettront le remodelage et l'ouverture de la chromatine.(Dupont,2011).

Les dimères de récepteurs vont lier aux ERE (estrogenresponseelements ou éléments de réponse aux oestrogènes) , situées dans les régions régulatrices des gènes cibles, contrôlant leur niveau de transcription.ERE est constitué de deux demi-sites (AGGTCA) configurés de façon palindromique et séparés par trois nucléotides (AGGTCAnnnTGACCT) **(Figure.10)(lecomte,2009)**



**Figure 10.** Séquence consensus de l'élément de réponse aux oestrogènes (ERE) dérivant des gènes de la vitellogénine A1, A2, B1 et B2 de *Xenopus laevis*. Il s'agit d'une séquence palindromique en répétition inversée de 13 paires de bases présentant un espace de 3 paires de bases variables (en rouge)(d'après Gruber *et al.*, 2004).

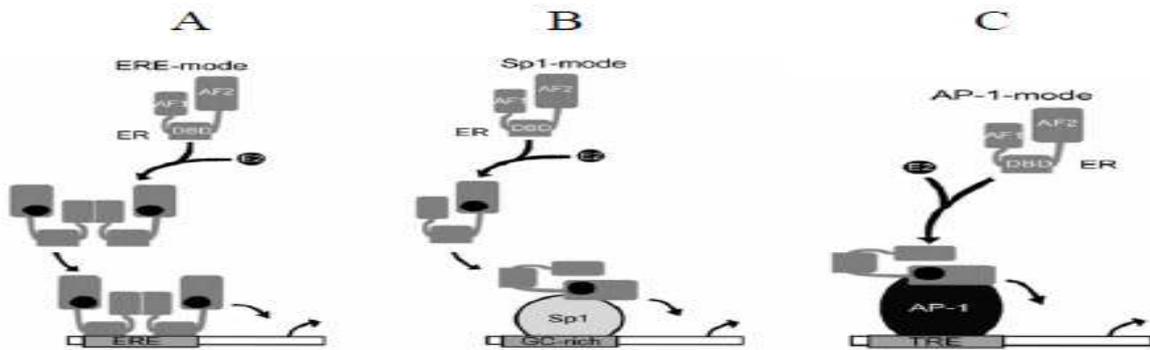


**Figure 11 :** modèle d'action classique (voie génomique ERE dépendante) .(heldring et al.,2007)

### A-2 voies génomiques EREindépendante :

Il existe des gènes ne contenant pas dans leur promoteur des ERE mais dont la régulation est oestrogéno-dépendante. Ce cas est expliqué par le fait que les RE ont la propriété de pouvoir interagir indirectement avec ERE des facteurs de transcription inhibant ou stimulant la transcription de gènes cibles, tel que SP1 (specificityprotein 1)(Kushner et al.,2000) qui a la capacité de se lier sur les promoteurs des gènes œstrogène-régulés ou AP1 (activatorprotein 1) est un complexe transcriptionnel soit des homodimèresc-jun, soit des hétérodimèresc-jun /c-fos. l'induction de l'activité AP1 par l'oestradiol suite à la liaison de RE avec la sous unité c-

jun induit la transcription des gènes cibles impliqués dans la croissance cellulaire, la différenciation et le développement. (Lecomte 2009), (Sanchez 2003)



**Figure 12 :** Représentation schématique des 3 modes par lesquels les ER modulent la transcription des gènes cibles. La voie classique en A représente l'interaction des ER avec un élément de réponse (ERE) consensus. Les 2 autres modèles (B et C) représentent les fixations indirectes des ER via des interactions avec des protéines sur les sites Sp-1 et AP-1 de l'ADN. (Ascenzi *et al.*, 2006).

## **B-Régulation de la transcription par la voie non génomique :**

### **B-1 Les récepteurs membranaires :**

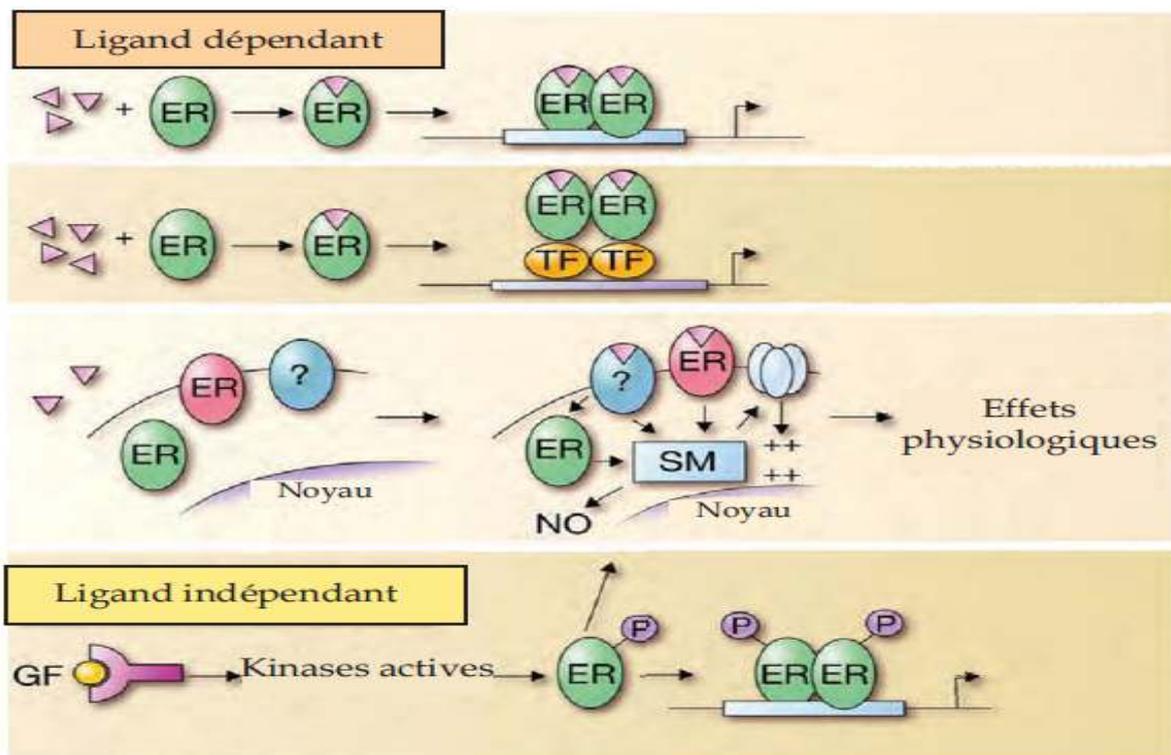
De nombreux travaux ont permis de mettre en évidence une action non génomique des œstrogènes par la présence d'ER membranaires. La nature exacte de ces récepteurs est très controversée mais les ER membranaires pourraient être de même nature que les ER nucléaires.

Par ailleurs, les ER ne contiennent pas de domaine transmembranaire donc leur association de avec la membrane plasmique est peut être dû à une interaction avec des protéines membranaires telle que la cavéoline, ou/et à l'addition post-traductionnelle de lipide aux ER. Cette voie de signalisation est fréquemment associée à l'activation de diverses cascades de protéines kinases. Or plusieurs études ont établi qu'un autre type de récepteur appelé GPR30 (récepteur orphelin couplé à une protéine G) apparaissait comme un effecteur de l'activité œstrogénique. En effet, dans les cellules MCF-7 et SKBR-3, l'activation de GPR30 par l'E2 est associée à des fonctions prolifératives en stimulant l'expression de l'oncogène *c-fos* ou en

inhibant l'expression du TGF- $\beta$  Les effets de l'E2 médiés par GPR30 sont très rapides. (lecomte.,2009).

## B-2Activation de la transcription en absence de ligand :

ER $\alpha$  peut activer la transcription de certains gènes cibles en absence d'E2 via la phosphorylation du récepteur. Peu d'études sur ce mécanisme ont été réalisées sur ER $\beta$ . La phosphorylation de ER $\alpha$  est réalisée par les voies de signalisation PI3K/Akt, PKC, AMPc/PKA et MAPK. Ces voies correspondent à des cascades de réaction dont la dernière étape consiste à activer ER $\alpha$  par phosphorylation de certains de ses résidus . La présence de certains facteurs de croissance peut déclencher ces réactions. Par exemple, IGF-1 est capable de stimuler l'activité transcriptionnelle d'ER $\alpha$ . L'EGF peut aussi stimuler ER $\alpha$  par phosphorylation par les MAPK permettant le recrutement de co-régulateurs transcriptionnels. Une concentration élevée en AMPc stimule l'activité de ER $\alpha$ . Il n'est pas clairement défini si les voies de signalisation ligand-indépendantes sont impliquées dans la progression tumorale indépendante des œstrogènes ou dans la résistance aux hormonothérapies mais il apparaît qu'une forte activité de la voie AMPc/PKA est associée à une forme de résistance aux traitements actuels. En effet, la PKA peut phosphoryler ER $\alpha$  sur induisant un changement de conformation du récepteur expliquant la résistance au tamoxifène .(lecomte.,2009).



**Figure13** : Les différentes voies de signalisation des oestrogènes(DUPONT ,2011)

### **I-9-1-2 récepteur à la progestérone :**

Le récepteur de la progestérone ou PR est une protéine de la superfamille des récepteurs nucléaires qui sont des facteurs de transcription dont l'activité transcriptionnelle dépend le plus souvent de leur liaison à un ligand ..(Xiaojiang Cui ,2005).

le RP a été décrit pour la première fois dans l'utérus en 1970 ,le groupe d'Edwin Milgrom s'est occupé de sa description puis de son clonage.

### **I-9-1-2 1-Structure et isoformes :**

Le récepteur de la progestérone est composé de 933 acides aminés et agit sous forme d'un dimère .Plusieurs isoformes de PR ont été décrites dans l'espèce humaine, dont les 2 principales sont hPRA et hPRB . La distribution tissulaire et leur fonction ne sont pas identiques . Ces isoformes sont codées par le même gène situé sur le chromosome 11. L'utilisation de 2 promoteurs distincts aboutit à la synthèse de 2 ARN messagers différents. L'hPRA, la forme la plus courte, ne contient pas 164 acides aminés du domaine N terminal de hPRB. L'hPRB, la forme longue, contient dans son domaine N-terminal un 3ème domaine de transactivation AF3. La 3ème isoforme décrite, hPRC, serait impliquée dans le déclenchement de la parturition. Cette isoforme de 60 kDa est tronquée en N-terminale et ne comporte qu'une partie du domaine de liaison à l'ADN . Cette isoforme ne possède pas le premier doigt de zinc et ne peut se lier à l'ADN mais a la capacité de lier la progestérone. Sa distribution est essentiellement cytoplasmique et sa fonction hypothétique

serait de séquestrer la progestérone, l'empêchant de se fixer aux autres isoformes

Le récepteur de la progestérone contient comme les différents membres de la super famille des récepteurs nucléaires, une extrémité N-terminale, un domaine central de liaison à l'ADN, et une extrémité C-terminale permettant la fixation du ligand. Le LBD, contient, outre le domaine de liaison à l'hormone, des déterminants de dimérisation (DI) liant des protéines chaperonnes comme les protéines de chocs thermiques (HSPs) en l'absence de ligand. Le LBD contient également une séquence de localisation nucléaire (NLS) qui contrôle le trafic nucléocytoplasmique des récepteurs nucléaires .Un domaine d'activation de la transcription AF1 est localisé dans l'extrémité N-terminale et le domaine d'activation AF2, hautement conservé, est situé dans l'extrémité C-terminale .(PINTIAUX , 2009)

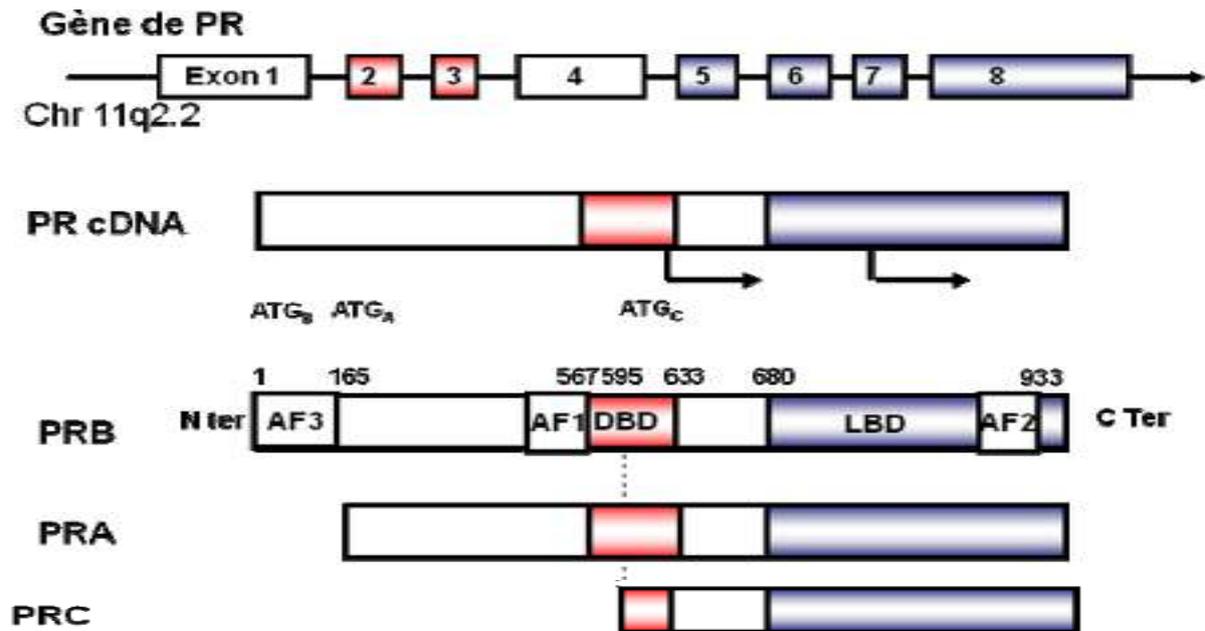


Figure 13 : isoforme du récepteur du progestérone.(PINTIAUX ,2009)

### I-9-1-2 -2 Mécanismes d'action des PR :

Les récepteurs PE présentent des voies d'activation transcriptionnelles différentes :

La voie dite génomique et la voie dite non génomique

#### A-La voie dite génomique :

Lorsqu'il n'est pas lié à la progestérone, le récepteur de la progestérone se situe dans le cytoplasme de la cellule et est associé à des protéines HSP, Dans cet état, il est inactif. Après la liaison de la progestérone au LBD, il y a dissociation des protéines HSP du récepteur, dimérisation des monomères, et translocation dans le noyau de la cellule. Une fois que le complexe est entré dans le noyau, il y a recrutement des coactivateurs et fixation au niveau des ERP sur le promoteur des gènes cibles régulant ainsi leurs transcription via la fonction de transactivation AF2 ligand dépendante. Le RP peut aussi agir sur la transcription des gènes cibles via la fonction de transactivation AF1 ligand indépendante (située de coté N-terminal) cette dernière se déclenche dès que le RP est fixé sur l'ADN. elle ne nécessite donc ni ligand, ni cofacteurs. L'activation de la transcription par les récepteurs RP peut se faire indirectement

par l'intervention des facteurs de transcription AP-1 et SP-1 (comme pour les RE).

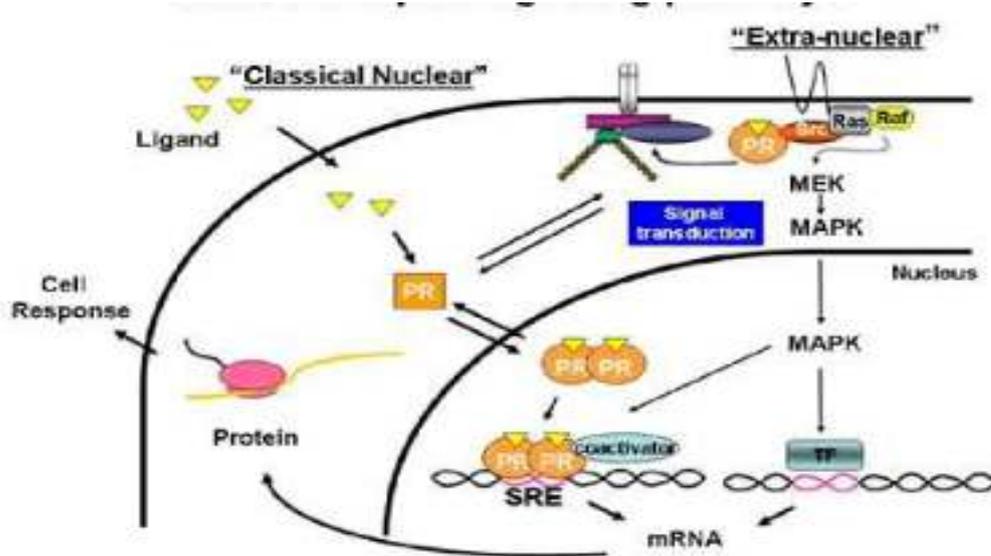


Figure 14 : Voies de signalisation de PR (PINTIAUX ,2009)

### B-la voie non génomique :

Il existe de plus des effets rapides de la progestérone indépendants du phénomène de Transcription, Il s'agit de mécanismes d'action extranucléaire de la progestérone. PR ,liée à la membrane plasmique est distincts des RP classiques existent en faible pourcentage. ces dernier ont la capacité de favoriser la voie des facteurs de croissance en stimulant la production d'EGF-R et d'IGF-1

### I-9-2HER2 ET CANCER DU SEIN :

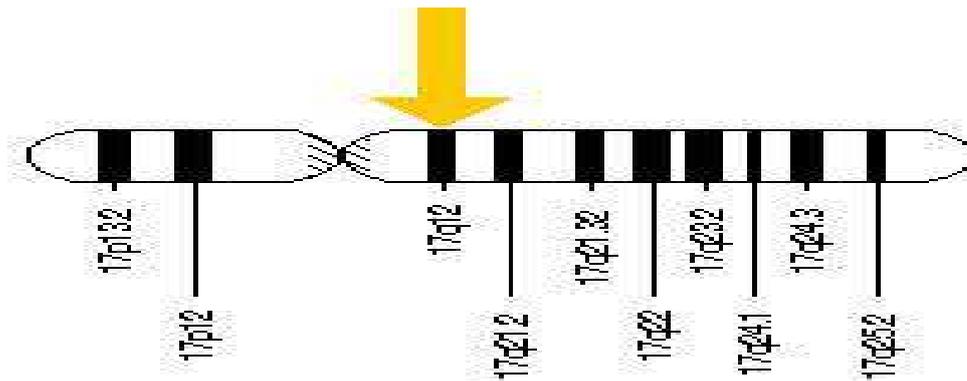
#### I-9-2-1- Le récepteur HER2 :

Le récepteur HER2 est aussi appelé erbB2 en raison de sa similarité de séquence avec l'oncogène viral v-erbB (virus de l'érythroblastose aviaire) . C'est un récepteur de 185kDa, codé par le proto-oncogène neu (autre dénomination possible du récepteur : HER2/neu) situé sur le chromosome 17q21. Il fait partie des quatre récepteurs homologues qui composent ensemble la famille HER (ou erbB) des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (EGFR/ERBB1, ERBB2, ERBB3 et ERBB4) .

L'Her2 a été identifié la première fois en 1981 et c'est en 1987 que

Slamon et autres ont décrit la première fois son importance biologique dans le cancer du sein.

Il est normalement exprimé dans toutes les cellules et intervient dans la différenciation cellulaire, l'embryogenèse et le développement, notamment de la partie lobulaire du réseau ductolobulaire du sein. (P.Fumoleau et al .,2007).

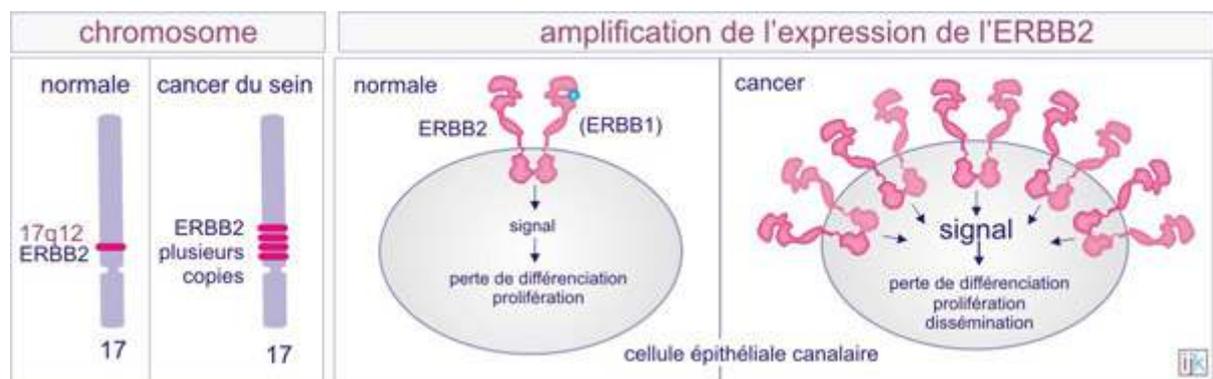


**Figure 15** : localisation du gène HER2 (anonyme).

### I-9-2-2-L'oncogène HER2 :

La transformation de ce proto-oncogène en oncogène qui initie la survenue du cancer.

Dans 95% des cas subit une amplification génique c'est-à-dire une surexpression due à la production de plusieurs copier du gène. Quelques dizaines de milliers de récepteurs membranaires sont normalement présents à la surface cellulaire. Ce nombre augmente pour atteindre plusieurs millions lorsque le gène est amplifié. (Slamon et al.,1989)



**Figure 16** : La localisation chromosomique d'erbB2 et son amplification dans le génome des cellules en provenance de la glande mammaire cancéreuse. Un excès d'expression d'ERBB2 amène à une signale forte de croissance cellulaire.anonym

D'autres altérations génétiques peuvent être à l'origine de cette activation telle que la mutation du gène (dans 5% des cas). Touts les mutations sont localisées dans le domaine kinase avec des insertions en phase dans l'exon 20 (principalement des insertions de 12pb au niveau du codon 775 entrainant une duplication des acides aminés Tyr-Val-Met-Ala ) . elles entrainent une activation constitutive d'HRE2 .

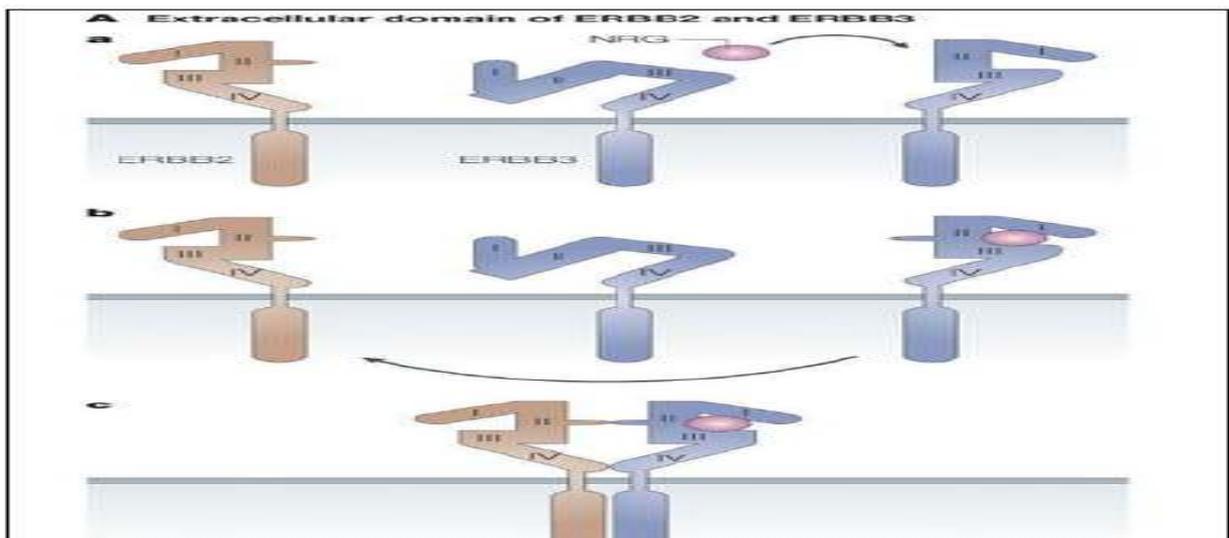
Une altération au niveau transcriptionnel, troncation de la protéine ....etc. peuvent être aussi à l'origine de cette transformation.(Merlin.,2014)

### I-9-2-3 Étude structurale du récepteur d'ERBB2 :

Les membres de la famille des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase sont composés :

-une région intra-cytoplasmique à activité tyrosine kinase, une région transmembranaire composée d'un segment lipophile qui permet l'ancrage du récepteur aux membranes cellulaires et une région extracellulaire composée de 4 sous-unité (I à IV) liant le ligand, cependant aucun ligand ayant une grande affinité pour HER2 n'a été découvert (récepteur orphelin).

De plus la conformation de son domaine extracellulaire est fixe et ressemble à celle de l'état active par le ligand son activation peut être alors expliquée par fait qu'il soit le partenaire de choix dans les hétérodimères, il est donc trans-activé par le ligand reconnu par l'autre sous unité. (Manner et al.,2004).



**Figure 17:** Structure du récepteur ERBB. (Garrett et al .,2002).

La région extracellulaire de chaque ERBB est composée de 4 domaines (I-IV). En absence de ligand, l'ERBB3 a une structure particulière (a). Quand les domaines I et III lient la neureguline (NRG), le bras de dimérisation du domaine II est exposé (b) ce qui entraîne une réaction récepteur-récepteur (c). L'ERBB2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état du ERBB3 activé par le ligand.

#### I-9-2-4 Mécanismes d'activation :

- *L'interaction avec un ligand :*

Elle induit une dimérisation du récepteur, élément critique pour l'initiation du signal intracellulaire. Les récepteurs dimérisés sont alors activés via à la fois une autophosphorylation et une transphosphorylation transmoléculaire des résidus clés de type tyrosine kinase au niveau des domaines cytoplasmiques (5). Ces phosphorylations des résidus tyrosines servent de sites de liaisons pour d'autres molécules d'amont intervenant dans la transduction du signal à travers des kinases additionnelles. Des molécules adaptatrices possédant un domaine d'homologie Src (SH2 domaine) et un domaine de fixation à tyrosine sont à leur tour activées. Deux grandes voies de la transduction du signal sont privilégiées : la voie Ras/Raf/MEK/ERK, la voie des phospho-inositol/PI3Kinase/AKT, mais aussi les voies passant par la phospholipase C et la voie STATS (PAK-JNK-K/JNK). Elles vont induire la phosphorylation de facteurs de transcription, Jun, Fos, myc, cycline D1, induisant la transcription de protéines impliquées dans les mécanismes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse, de migration, de différenciation cellulaire ou bien encore dans la survie cellulaire. (P. Fumoleau et al., 2007)

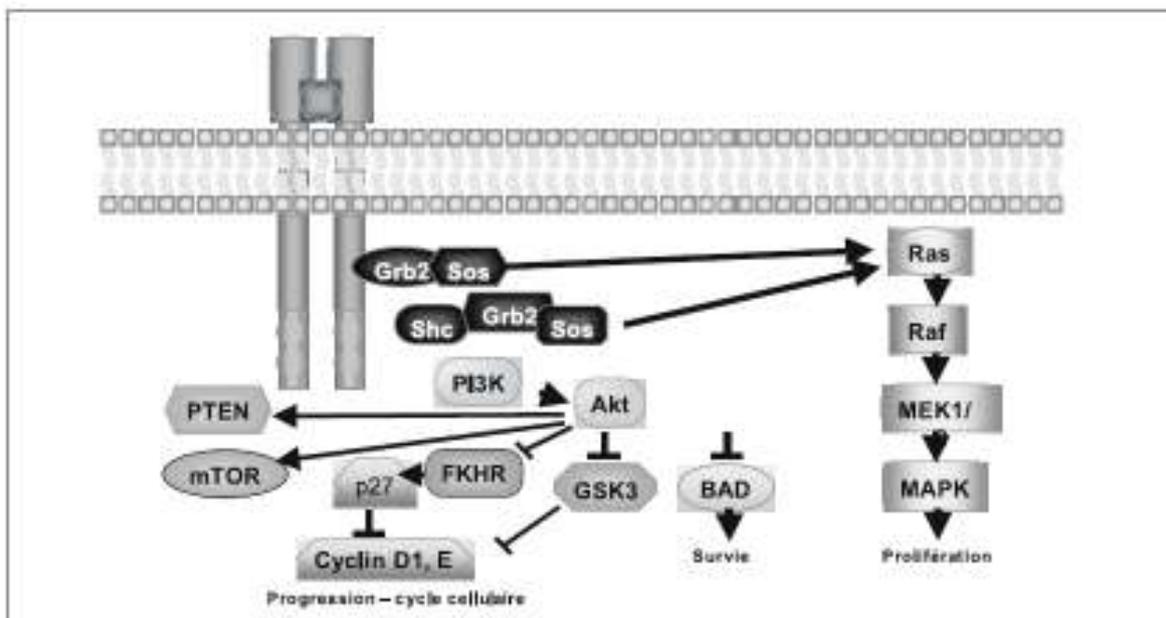


Figure 18 : Voie d'activation de signalisation ErbB (P. Fumoleau et al., 2007)

### **I-9-2-5 Récepteur Her2 et cancer du sein :**

La surexpression de l'HER2 joue un rôle dans la carcinogenèse et la progression du cancer du sein. Elle apparaît tôt et reste stable durant l'histoire naturelle de la maladie.

Les signaux transmis par le biais des hétérodimères contenant HER2 sont beaucoup plus puissants car HER2 diminue la vitesse de la dissociation du ligand prolongeant ainsi la durée du signal d'une part et ralentit l'internalisation du complexe favorisant son recyclage à la surface cellulaire au lieu de sa dégradation d'autre part, cela est dû à un couplage inefficace entre HER2 et la ligase Cbl1-E3 qui permet la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine. (Goudfel et Badis.,2013).

un clivage protéolytique à la surface cellulaire et aboutissant au relargage d'un fragment ECD (*extra cellular domain*) et à la persistance d'un fragment de 95-kD contenant les domaines transmembranaires et cytoplasmiques. Il a été montré que ce fragment 95-kD gardait une activité kinase *in vitro*, suggérant qu'il pouvait être constitutivement actif avec augmentation *in vivo* du potentiel de transformation. Les cancers HER2+ sont donc plus agressifs et ce par la formation de nombreux hétéro-dimères contenant HER2 dont déclenchent des signaux mitotiques très puissants. (P. Fumoleau et al.,2007)

### **I-10 Traitement du cancer du sein**

Différents types de traitements peuvent être utilisés pour traiter un cancer du sein : la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie, la chimiothérapie et les thérapies ciblées.

Selon les cas, les traitements peuvent avoir différents objectifs :

- supprimer la tumeur ou les métastases
- réduire le risque de récurrence
- ralentir le développement de la tumeur ou des métastases
- améliorer le confort et la qualité de vie de la personne malade, en traitant les symptômes engendrés par la maladie.

Le choix de traitements dépend des caractéristiques suivantes :

- du type de cancer dont vous êtes atteinte et de l'endroit où il est situé dans le sein
- de son caractère unifocal (un foyer cancéreux) ou multifocal (plusieurs foyers cancéreux)
- de son stade au moment du diagnostic
- de son grade
- du statut des récepteurs hormonaux ou de HER2

- des éventuelles contre-indications aux traitements
- de état de santé général, d'âge, de antécédents personnels médicaux et chirurgicaux et d'antécédents familiaux(INC France,2013)

Dans cette étude on intéresse aux l'hormonothérapie et la thérapie ciblée

## **I-10-1Hormonothérapie**

Le traitement hormonal en cancérologie est basé sur le principe de l'hormonodépendance de certaines tumeurs, le sein et l'endomètre chez la femme, la prostate chez l'homme. Les cellules tumorales dites hormonosensibles expriment des récepteurs pour certaines hormones stéroïdes, notamment les œstrogènes et les androgènes. Lorsque l'hormone se fixe sur ce récepteur, il se forme un complexe hormone-récepteur qui va agir au niveau du noyau, stimulant la synthèse protéique et entraînant une division cellulaire. D'une façon générale, les tumeurs les plus hormonosensibles, et donc celles qui offrent la meilleure probabilité de réponse favorable à l'hormonothérapie, sont celles qui :

- expriment le plus grand nombre de récepteurs hormonaux
- sont les plus différenciées histologiquement
- ont le taux de division cellulaire le plus bas.

La réponse thérapeutique dépend également du statut hormonal de la patiente (ménopausée ou non) ainsi que du stade du cancer (avec dissémination métastatique ou non), ce qui influence les indications.

Pour exercer un effet inhibiteur sur la prolifération tumorale, l'hormonothérapie peut, schématiquement, faire appel à trois types de stratégie :

### **-hormonothérapie suppressive :**

en diminuant la production des stéroïdes impliqués, oestrogènes ou androgène

### **- hormonothérapie compétitive :**

en réalisant un blocage compétitif des récepteurs hormonaux.

## I-10-1 -1- HORMONOTHERAPIE SUPPRESSIVE :

### a) Analogues de la LHRH :

La suppression de la production ovarienne d'œstrogène peut se faire par castration irréversible (chirurgicale ou radiothérapeute) ou par castration réversible (castration médicale). Celle-ci est réalisée grâce à l'utilisation des analogues de la LHRH (Luteinizing Hormone-Releasing Hormone"). L'administration régulière de fortes doses d'analogues de la LHRH entraîne une saturation des récepteurs membranaires de la LHRH dans l'hypothalamus, une suppression de la pulsativité de la sécrétion, une inhibition de la sécrétion des gonadotrophines et, in fine, un arrêt de la sécrétion par les gonades des hormones sexuelles, les œstrogènes chez la femme, les androgènes chez l'homme. Le principal avantage de cette approche est qu'elle réalise une castration réversible. Le désavantage est son coût relativement élevé et le mode d'administration (peptides non résorbés par voie orale, devant donc être administrés par voie sous cutanée ou, éventuellement, par voie nasale).

Plusieurs analogues de la LHRH sont commercialisés :

- goséréline (ZoladexR)
- buséréline (SuprefactR)

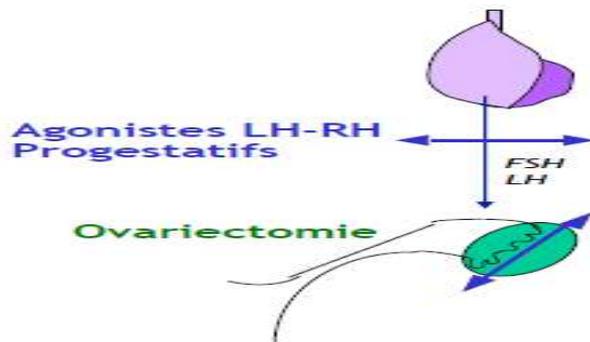
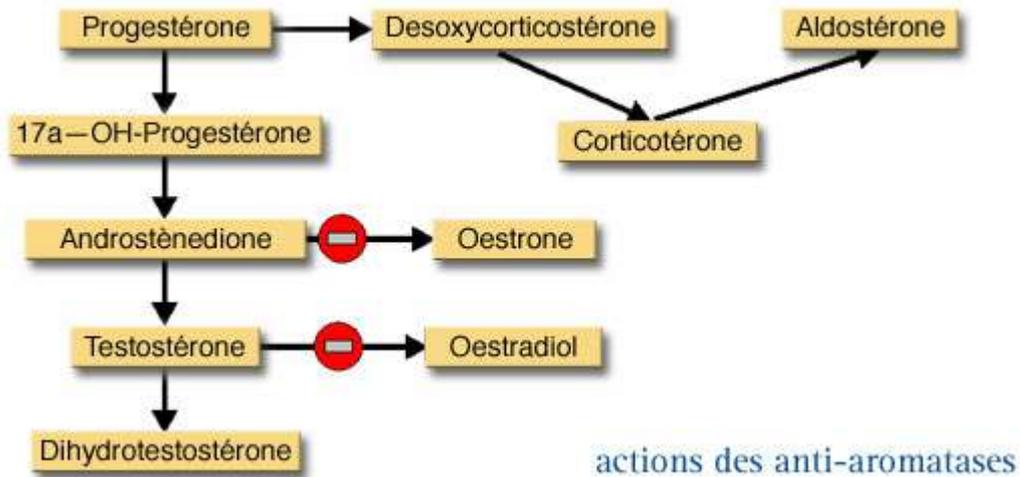


Figure N°19 :Suppression de la synthèse des œstrogènes d'origine ovarienne (Céroline,2006)

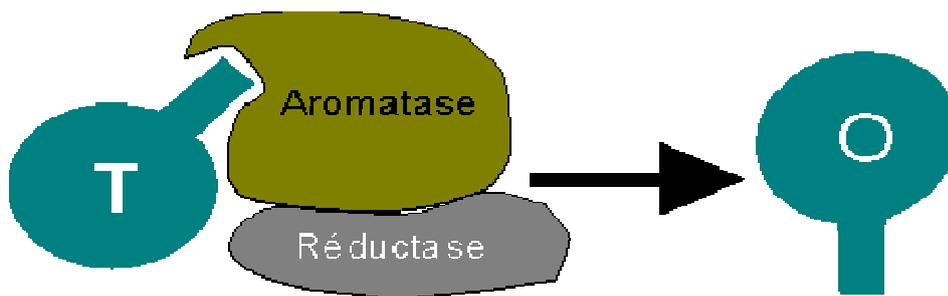
### b) Inhibiteurs de l'aromatase

Après la ménopause, les androgènes d'origine surrénalienne (adostenedione et testostérone) sont convertis en œstrogènes par l'aromatase présente dans le foie, le muscle , les follicules pileux ,le tissu adipeux et les cellules tumorales .Les inhibiteurs de l'aromatase suppriment cette activité . (HERON et al.,2009).



**Figure N°20 :** Mode d'action des anti -aromatases (HERON et al.,2009).

L'activité aromatase est le fruit d'un enzymes (l'aromatase) qui se combine à l'androgène(T) , et un coenzymes (réductase) ;le complexe est transforme en œstrogène (O).



**FigureN°21 :**Représentation schématique de l'activité aromatase.(HERON et al.,2009)

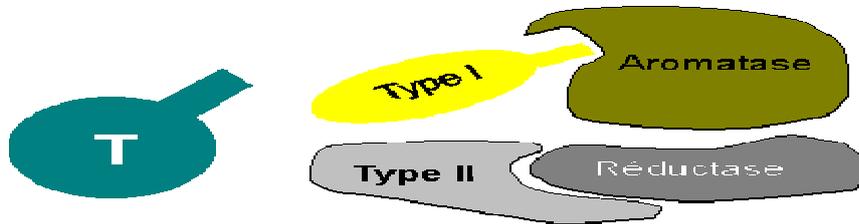
Deux types d'inhibiteurs de l'aromatase sont définis, en fonction de leur structure et de leur mode d'action : les inhibiteurs stéroïdiens (type I) et non stéroïdiens (type II)

- **Les inhibiteurs de type I, stéroïdiens :**

Sont des analogues structuraux du substrat, l'androstènedione ; ils entrent en compétition avec le substrat naturel de l'enzyme. Ils se lient au niveau du site catalytique de l'enzyme de façon irréversible (inhibiteurs suicides). Ils lient de façon covalente le site actif, sont spécifiques et ont un effet durable *in vivo*. On les appelle inhibiteurs suicides. Ex : **Le formestane (4-hydroxyandrostènedione, CGP 32349, Lentaron®)**(Cremoux et Extra,2000) .

- **Les inhibiteurs de type II, non stéroïdiens :**

Ils agissent sur la réductase du cytochrome P450, qui constitue le coenzyme du complexe enzymatique de façon réversible et temporaire Ex : *L'aminoglutéthimide (Orimétène®)* (HERON et al., 2009)



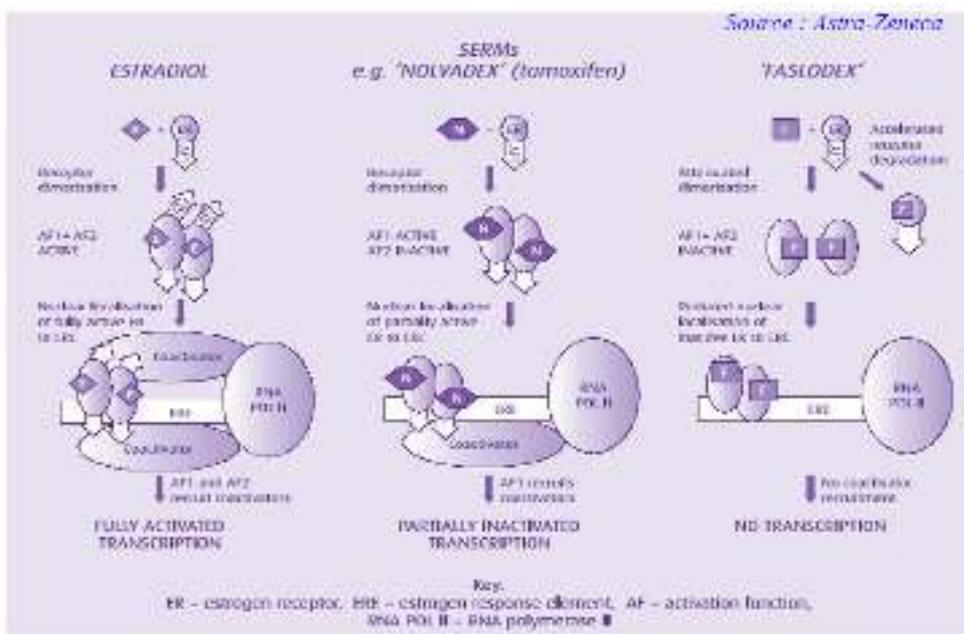
**Figure N°22 :** Représentation schématique de l'action des deux types d'anti-aromatase (HERON et al., 2009)

## I-10-1 -2-HORMONOTHERAPIE COMPETITIVE

### a) Anti-oestrogènes

Les antioestrogènes peuvent avoir selon l'organe cible des propriétés agonistes ou antagonistes. Ils rentrent dans le nouveau concept de SERM ("Selective Estrogen Receptor Modulators"). Dans le cas particulier, les anti-oestrogènes sont des produits qui inhibent spécifiquement l'action des oestrogènes dans leur tissu cible (sein, utérus, vagin) en empêchant la fixation de l'oestradiol sur son récepteur. Le tamoxifène (NolvadexR) est actuellement l'anti-oestrogène le plus utilisé. La fixation du tamoxifène sur le récepteur d'oestradiol entraîne des modifications conformationnelles du récepteur, des anomalies de la transcription et une diminution de la prolifération cellulaire.

Les effets indésirables consistent en bouffées vasomotrices et faible risque de thrombophlébite. Il est intéressant de noter que ces médicaments peuvent avoir des effets positifs sur l'os (augmentation du contenu minéral) et sur les facteurs de risque cardiovasculaire (diminution de la cholestérolémie (Bergerat, 2006)).



**Figure N°23** : Représentation schématique de mode d'action des anti-œstrogène (Céroline, 2006).

### b) Anti-androgènes :

Ils bloquent la conversion de la testostérone en dihydrotestostérone

Il existe deux grands types de médicaments anti-androgènes :

- les anti-androgènes stéroïdiens : possédant des effets hormonaux multiples dont l'effet anti-androgène recherché : l'exemple type est l'acétate de cyprotérone (AndrocurR)

- les anti-androgènes non stéroïdiens : dépourvus de toute autre activité hormonale ou antihormonale : l'exemple type est le flutamide (EulexinR) (Céroline,2006).

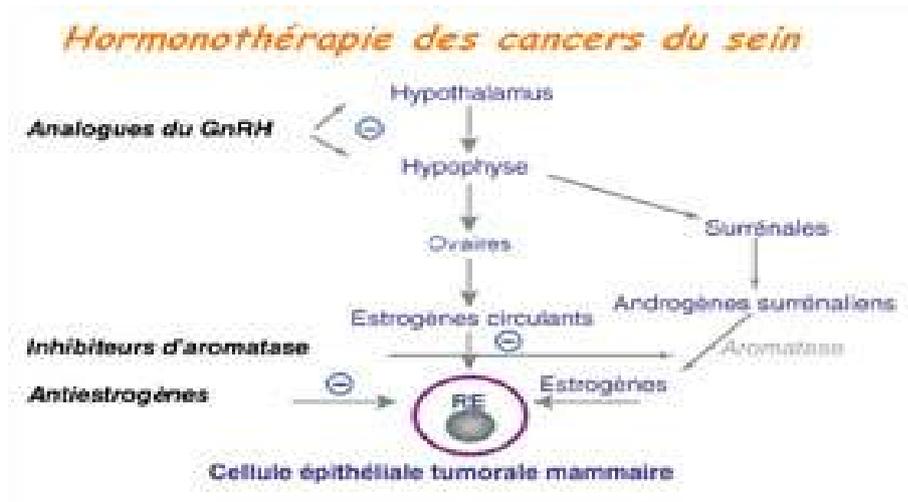


Figure N°24: Hormonothérapie de cancer du sein(cottu ,2012)

## I-10-2 Thérapie ciblée Anti HER2

La détection d'une surexpression du récepteur de facteur de croissance HER2 dans certains cancers du sein a conduit au développement d'un traitement ciblé.

Le développement des thérapies ciblées est guidé par des principes rationnels, permettant de bloquer le fonctionnement d'une ou plusieurs protéines dans la cellule cancéreuse. D'une manière générale, toutes ces nouvelles thérapeutiques reposent sur les notions de récepteurs (membranaires ou intracytoplasmiques), de ligands, et d'activation des protéines, le plus souvent par phosphorylation via une enzyme kinase.

La thérapie ciblée repose sur trois stratégies différentes :

-Bloquer les ligands des récepteurs membranaires.

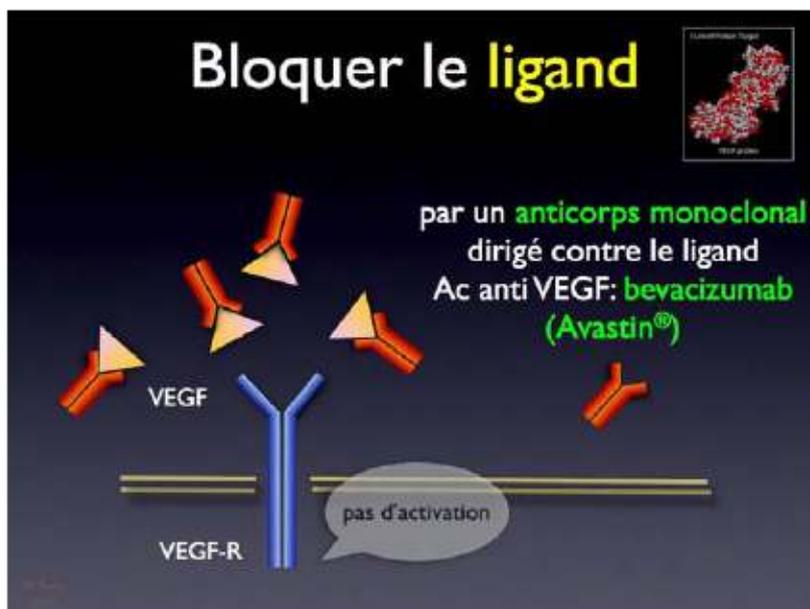
-Bloquer les récepteurs membranaires.

-Empêcher l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase(Krutz ,)

### **I-10-2-1 Bloquer les ligands des récepteurs membranaires.**

L'exemple de Bevacizuma (Avastin) :

Le Bevacizumab ou Avastin™ est un anticorps monoclonal de type IgG1 recombinant qui se lie au VEGF dont il reconnaît toutes les isoformes. Le mécanisme d'action d'Avastin est basé sur l'inhibition de la liaison entre le VEGF et ses récepteurs (Flt-1 et KDR) à la surface des cellules endothéliales des néovaisseaux des tumeurs dont la survie est VEGF dépendante. Bloquer la fixation du VEGF sur ses récepteurs permet une involution des ces vaisseaux et donc une asphyxie de la tumeur (Debandt, 2007).



**Figure N° 25:** Mode d'action de bévacizumab (Krutz, 2005)

### **I-10-2-2 Bloquer les récepteurs membranaires :**

L'exemple de trastuzumab (Herceptin)

Le trastuzumab anticorps monoclonal humanisé recombinant de classe IgG1 dirigé contre le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) (Frédérique P et al.,)

Le mécanisme d'action de trastuzumab est basé sur :

- la régulation négative de la synthèse du récepteur HER2 (protéine p185<sup>HER2</sup>) et l'inhibition secondaire de la signalisation intracellulaire normalement activée, en particulier la voie des protéines PI3K-Akt ;
- l'inhibition du clivage de HER2 (shedding) ;
- l'induction de l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et de l'inhibiteur de cdk2 p27<sup>kip1</sup> ;
- l'inhibition de l'angiogenèse ;
- l'induction de mécanismes immuns de type ADCC . (Kruz,2005 )

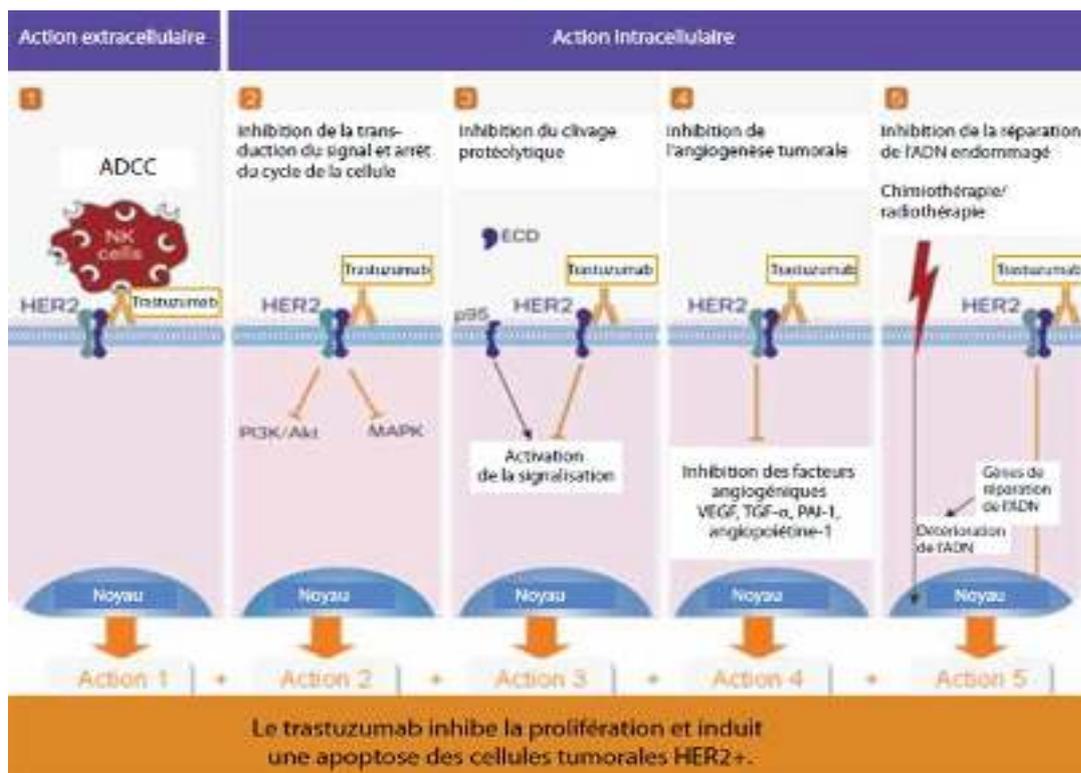
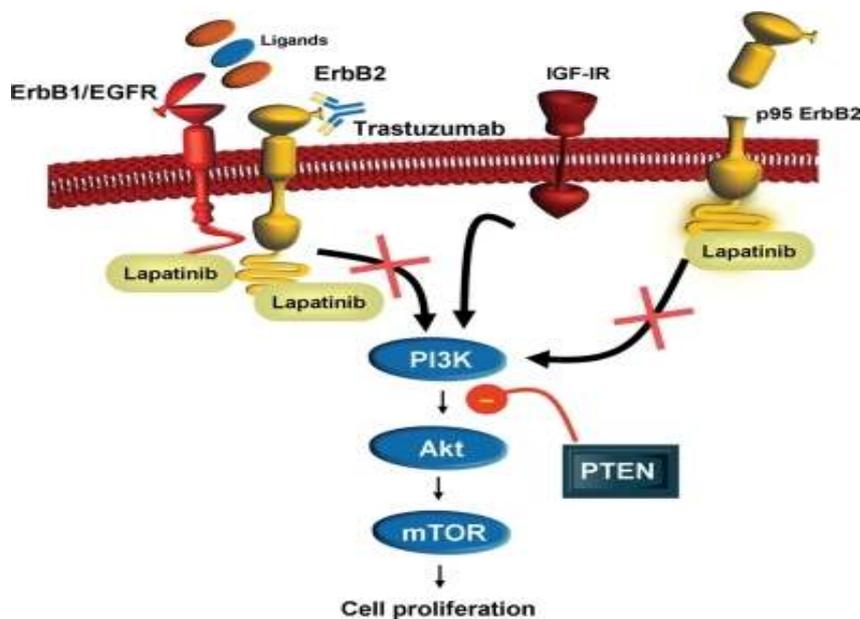


Figure N° 26: Mode d'action de Trastuzumab( Journal International de Médecine) .

### I-10-2-3-Empêcher l'activation des récepteurs à activité tyrosine kinase

L'exemple de lapatinib

Le lapatinib (Tyverb<sup>®</sup>) est une petite molécule administrée par voie orale inhibant de façon réversible les domaines tyrosines-kinases de HER1 et HER2 ; il agit également sur Akt et inhibe l'activation des MAP-kinases. Dans les lignées cellulaires dépendantes d'EGFR et d'HER2, le lapatinib est capable de provoquer un arrêt de la prolifération et une apoptose par réduction de la phosphorylation des kinases et inhibition de l'activation d'Erk1/2 et d'Akt qui sont les effecteurs de la prolifération et de la survie cellulaire(Coudert et *al.*,2012)



FigureN° 27:Mode d'action du lapatinib(Vogel et *al.*,2010).

## I-11 Détermination de statut Her2 :

Depuis le premier rapport de slamon et al (Slamon et *al.*,1987) montrant que la surexpression de l'Her2 dans le cancer du sein est associée à un mauvais pronostic , la détermination du statut Her2 est devenue de plus en plus importante .

Le statut Her2 peut être évalué à l'échelle de l'ADN (en utilisant la FISH ,la CISH ,la PCR, ou le Southern Blot) ,à l'échelle de l'ARNm (en utilisant le Northern Blot ou RT-PCR) ou à l'échelle de la protéine (en utilisant l'IHC ou l'ELISA) .Les deux méthodes les plus utilisées sont l'IHC et la FISH(Shahla et Marily ,2002)

### I-11-1- L'immunohistochimie :

La technique immunohistochimique mesure la surexpression de la protéine HER2 de façon semi-quantitative en se basant sur l'intensité et le pourcentage de cellules positives(Dansereau et Ferron,2006). Le but de la technique IHC va être de ne détecter que les cellules tumorales qui surexpriment fortement l'Her-2.

L'immunoréactivité Her2/*neu* est scorée sur une échelle arbitraire, le score le plus élevé (+++ ; immunomarquage fort, circonférentiel, dans un minimum de 30% des cellules

tumorales) étant considéré comme positif, alors que n'importe quel autre résultat est considéré comme négatif (score 0 ou +) ou ambigu (++) (Hans et al., 2009).

Principe :

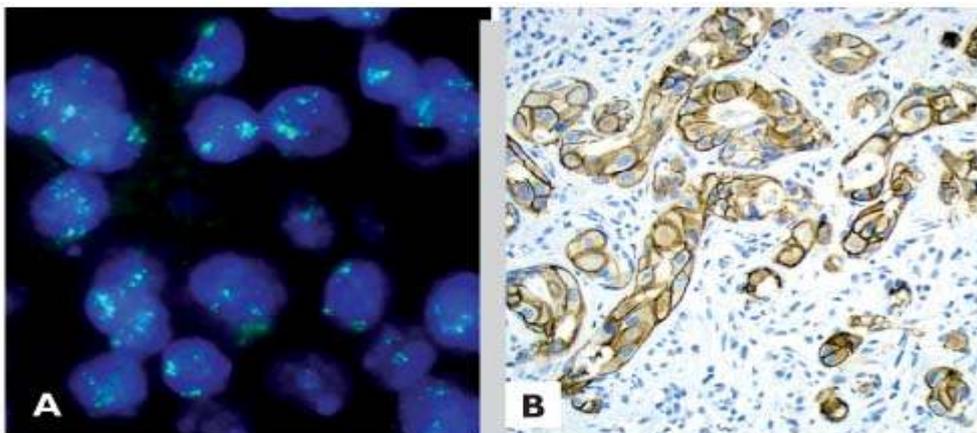
L'immunohistochimie est une méthode morphologique permettant de localiser des antigènes dans les tissus ou les cellules, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré. Un antigène peut être défini comme toute substance induisant une réponse immunitaire spécifique, et comporte plusieurs épitopes (déterminants antigéniques)

L'immunohistochimie permet de déterminer de façon fiable la surexpression de HER2/neu à condition que la technique soit bien standardisée, contrôlée par des témoins, que l'expérience du pathologiste soit suffisante. Elle doit être complétée par l'étude de l'amplification du gène par hybridation in situ en fluorescence FISH quand la surexpression de HER2/neu est faible. (Mathieu, 2002).

### **I-11 -2L'hybridation fluorescente in situ (FISH)**

Pour l'hybridation in situ en fluorescence, on utilise une sonde d'ADN marquée d'un colorant fluorescent, afin de savoir si l'ADN ne contient pas de copies supplémentaires de Her2/neu. Cette détermination de l'amplification du gène Her2/neu, quantifiant le nombre de copies du gène pour Her2/neu sur le chromosome 17.

Le résultat est positif quand plus de six copies du gène Her2/neu sont détectées par cellule (Hans et al., 2009).



**Figure N°28:** Images représentatives de l'amplification (A) et de la surexpression (B) de Her2/*neu* dans un cancer du sein, mis en évidence par hybridation in situ (A) et par immunohistochimie (B) (Hans et *al.*, 2009).

## **Chapitre II :Matériel et méthodes :**

### **I-1Matériel :**

#### **I-1-1Matériel biologique :**

Le cancer de sein est une maladie hétérogène multigénique, de ce fait, les facteurs clinique et pathologique comme l'âge ,grade de tumeur ,type histologique ..... ne sont pas des indicateurs suffisantes pour déterminer certains sous-groupes de cancer. L'évaluation des facteurs pronostiques (RE,RP,HER2) s'impose donc d'elle-même pour ce but nous avons réalisé une étude immunohistochimique sur 40 patiente au sein de service d'anatomie-pathologie CHU Blida .

En parallèle nous avons réalisé une enquête génétique familiale au service oncologie CAC Blida sur des patientes présentant au mois deux cas carcinome mammaire héréditaire.

#### **I-1-2 Réactifs**

##### **I-1-2-1Les réactifs nécessaires pour l'étude histologique :**

-Formol tamponné (formaldéhyde à 10%)

- solutions d'alcool à différentes concentrations(50% ,70%,95%,100%)
- Xylène(solvant organique)
- Paraffine(fondue)
- Eau courante
- Eau distillée
- Hématoxyline de harris
- Lithium carbonate
- Eosine
- EKIT

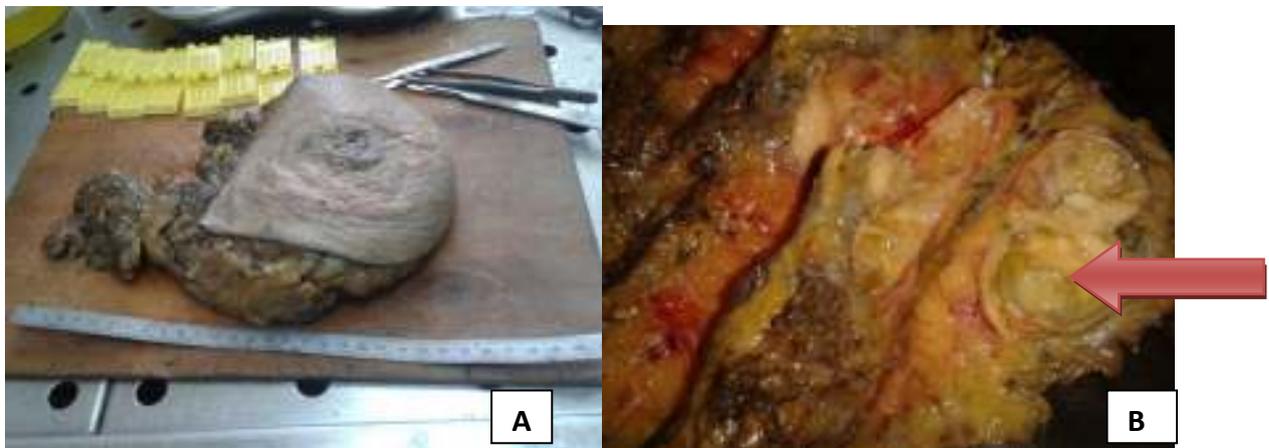
## I-1-2-2 Les réactifs nécessaires pour l'étude immunohistochimie (voir l'Annexe V)

### II-2 Méthode :

#### II-2-1 Etude macroscopique:

L'étude macroscopique est précédée d'une étape de fixation au formol tamponné (formaldéhyde à 10%) pendant idéalement 24 heures. Le but de ce prétraitement est de conserver les structures. En effet, le prélèvement des tissus provoque leur mort : les cellules déversent leurs enzymes, ce qui provoque une auto-digestion du tissu. De plus, à l'air ambiant, les prélèvements peuvent être contaminés par des bactéries, ce qui entraîne une putréfaction des tissus. L'examen macroscopique est essentiel pour déterminer le choix du prélèvement à examiner. La prise en charge macroscopique se fait par un médecin anatomo-pathologiste et consiste en une macro-description (figure N°31)

- La pièce examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée. Suite à la coupe, le médecin extrait de petits fragments qu'il dépose dans des cassettes qui seront étiquetées en écrivant le numéro du patient, puis plongées dans du formol à 10%.



**Figure N°29:** A- pièce mastectomie avec curage axillaire B- Pièce de mastectomie montrant la présence d'une tumeur (flèche).

#### II-2-2 Etude histologique:

Elle passe par plusieurs étapes dans le but d'obtenir des coupes de tissu très minces pour l'observation microscopique. Les étapes sont :

**1- circulation** (toutes ces étapes sont réalisées grâce à un circulateur automatique (autotechnicon) qui comporte un ensemble de 12 bains disposés en cercle, qui permet un

transfert automatique toutes les 2h,d'un bain à un autre avec agitation constante de panier contenant les cassettes)

- Elle permet d'obtenir une rigidité au prélèvement pour que l'on puisse manipuler sans risquer de l'abimer .La circulation dure 24 heures et réalise en 3 phases

- **Déshydratation**

les cassettes sont plongées dans 5 bains d'éthanol (agent déshydratant )de concentration croissante de70%à 100% pour éviter l'apparition trop rapide d'une distorsion des structures du tissu .Ainsi l'éthanol miscible à l'eau va pénétrer dans les tissue tout en chassant l'eau tissulaire.

- **Eclaircissement**

Les cassettes sont immergées dans 4 bains de xylène (agents éclaircissant)

- **Imprégnation**

les cassettes sont trempés dans 2 derniers bains de paraffine à60°C point de fusion de la paraffine .cette dernière a pour rôle de remplir les pores tissulaires préalablement vidés de leur eau lors de la déshydratation .le but de ne pas obtenir un tissu exsudé.

- **Inclusion (enrobage):**

elle consiste à inclure notre pièce imprégné dans un bloc de paraffine qui facilite la manipulation , l'entreposage de notre pièce et lui fournit un support externe

- **La microtomie**

Elle consiste en l'utilisation d'un microtome lequel, grâce à sa lame ,permet de couper les blocs de paraffine préalablement préparés . on obtient ainsi des rubans très minces de 3 à5 microns .on dépose les rubans obtenus dans un bain marie (37°C) et on les récupérer rapidement en les étalant sur des lames .

- **Étalement**

L'étalement des coupes consiste à aplanir le tissu sur la lame .Il se fait sur la lame. Il se fait sur eau chaude à environ 37°C.En effet ,les rubans préalablement obtenus et placés dans le bain marie sont étalés sur des lames comme suit :

- On enlève les plis qui rincent sur les coupes en les étirant délicatement
- On dépose nos coupes sur des lames en prenant soin de bien les centrer,
- On étiquette nos lames en écrivant le numéro du patient avec un crayon,
- On laisse sécher les lames à l'aire libre.

## ▪ **Etapes préparatoires à la coloration**

elle servant à préparer la coupe à recevoir les colorants qu'on veut lui imprégner ; ce sont le déparaffinage et l'hydratation le déparaffinage sert à retirer la paraffine des tissus ; pour cela ,le xylène dissout le mieux la paraffine .L'hydratation a pour objectif de retirer le xylène du tissu et de le remplacer par l'eau.

## ▪ **Coloration à l'Hématoxyline et à l'Eosine:**

Pour la coloration ,une batterie de colorants et de réactifs est utilisée ,constituée respectivement d'un bac d'Hématoxyline de Harris, un bac d'eau acidifiée ,un bac d'eau ammoniacal ,un bac d'éosin Y, un bac d'éthanol à 95% et bac de xylène.

Les lames sont d'abord plongées dans le bac à hématoxyline de Harris durant 3 à 4 mn, rincées dans un bain d'eau du robinet puis plongées 1 à 2 fois dans l'eau acidifiée et rincées à l'eau du robinet pendant 2 mn. Elles sont plongées 1 à 2 fois dans l'eau ammoniacale puis rincées à l'eau du robinet pendant 2 mn . Les lames sont colorées à l'éosine Y pendant 2 mn ,rincées à l'eau du robinet , puis plongées 1 à 2 fois dans l'éthanol absolu pour la déshydratation des coupes ,en suite dans le xylène pendant 30 s pour leur éclaircissement .Enfin, les lames sont séchées à l'étuve.

La déshydratation et l'éclaircissement constituent les étapes préparatoires au montage.

## ▪ **Montage des lames**

Le montage des lames consiste à protéger définitivement le tissu étalé sur la lame par une lamelle de verre ,collé à l'aide d'un produit synthétique transparent qui se polymérise à l'air ,appelé \*EKIT\*

## **II-2-2 Etude Immunohistochimique(IHC)**

IHC est une méthode de localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu , par la détection d'antigènes au moyen d'anticorps .

L'immunohistochimie exploite le fait qu'un anticorps se lie spécifiquement à des antigènes dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine polyclonale ou monoclonale.

## ▪ **Principe :**

L'immunohistochimie est une méthode morphologique permettant de localiser des antigènes dans les tissus ou les cellules, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon

spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré. Un antigène peut être défini comme toute substance induisant une réponse immunitaire spécifique, et comporte plusieurs épitopes (déterminants antigéniques)

L'immunohistochimie permet de déterminer de façon fiable la surexpression de HER2/neu à condition que la technique soit bien standardisée, contrôlée par des témoins, que l'expérience du pathologiste soit suffisante. Elle doit être complétée par l'étude de l'amplification du gène par hybridation in situ en fluorescence FISH quand la surexpression de HER2/neu est faible (Mathieu.,2002)

#### ▪ **Déparaffinage et réhydratation:**

Le déparaffinage consiste en l'incubation des lames dans une étuve à 37°C pendant 24 heures. Elles passeront par la suite dans une batterie contenant du xylène (2 fois 5 minutes), de l'alcool à concentration décroissantes (alcool 100% 10mn, alcool 90% 5mn, alcool 70% 1mn ensuite dans l'alcool 50% 1mn) et dans l'eau distillée 5mn. Cette étape permet de se débarrasser de la paraffine, de réhydrater et de bien nettoyer le tissu.

#### ▪ **Démasquage**

Les lames sont immergées dans un bac de solution démasquage (tampon de citrate à pH=6) pendant 40mn puis chauffées à 97°C par un bain marie pendant 50min. Le but de cette étape est de démasquer le site de fixation antigène et aussi pour éliminer les liaisons covalentes.

On laisse les lames refroidir pendant 20min. On les transfère dans un bac de l'eau de robinet pendant 20 min ensuite dans un bac de l'eau distillée pendant 5mn.

On cerclé les lames par DAKOpen qui empêche les anticorps de diffuser.

#### ▪ **Réduction des bruits de fond**

On ajoute la peroxydase dans la zone délimitée par DAKOpen pendant 10mn pour bloquer les sites endogènes ensuite on les passe dans un bain de l'eau distillée pendant 5mn

#### ▪ **Anticorps primaire**

On dispose les lames dans la chambre humide et on ajoute des anticorps primaires par utilisation d'une micropipette de façon à immerger la zone entourée par le DAKOpen pendant 40mn. On les

fait passer dans un bain de solution de lavage ( 1 litre de l'eau distillée + 1sachet de poudre)  
3fois 5 mn

### **Anticorps secondaire**

On applique la solution d'anticorps secondaire sur les lames de même façon que l'anticorps primaire et on laisse incuber pendant 10mn .On rince avec la solution de lavage 3 fois 5mn .On ajoute le HRP pendant 10 mn et on rince 3 fois 5mn.

#### ▪ **Révélation**

on verse sur les lames quelques gouttes de DAB( chromogène de peroxydase) .On incube pendant 10mn.On rince les lames à l'eau robinet.

#### ▪ **Contre coloration**

Elle est réalisée à l'hématoxyline pendant 7min .On rince les lames dans l'eau distillée, on fait passer les lames dans un bain d'alcool puis de xylène pour la décoloration des cytoplasmes et tissu conjonctif.

#### ▪ **Montage des lames**

Le montage lame-lamelles est réalisé par l'EKIT

### III Résultats et discussion :

#### III-1 Lecture des résultats de la coloration hématoxyline-éosine :

Coloration histologique topographique, associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration des cytoplasmes et du collagène par l'éosine Y. La double coloration hématoxyline-éosine aboutit à la coloration des différents éléments cellulaires :

Les noyaux sont bleus violets

- Les cytoplasmes sont roses
- Les hématies sont rouges clairs à jaunes
- Les fibres de collagène sont roses – orangées

#### III-2 Lecture des résultats de l'immunohistochimie :

Un couple anticorps-antigène peut être visualisé de plusieurs façons. Dans la plupart des cas, un anticorps est conjugué à une enzyme peroxydase qui peut catalyser une réaction de production de couleur. : Coloration immunoperoxydase. Le marquage du site d'interaction antigène-anticorps est en brun figure.

L'évaluation de la réaction est faite à l'aide d'un microscope optique au faible grossissement (Gx40) puis le score est confirmé au fort grossissement (Gx1000).

L'évaluation est effectuée par le anatomo-pathologiste.

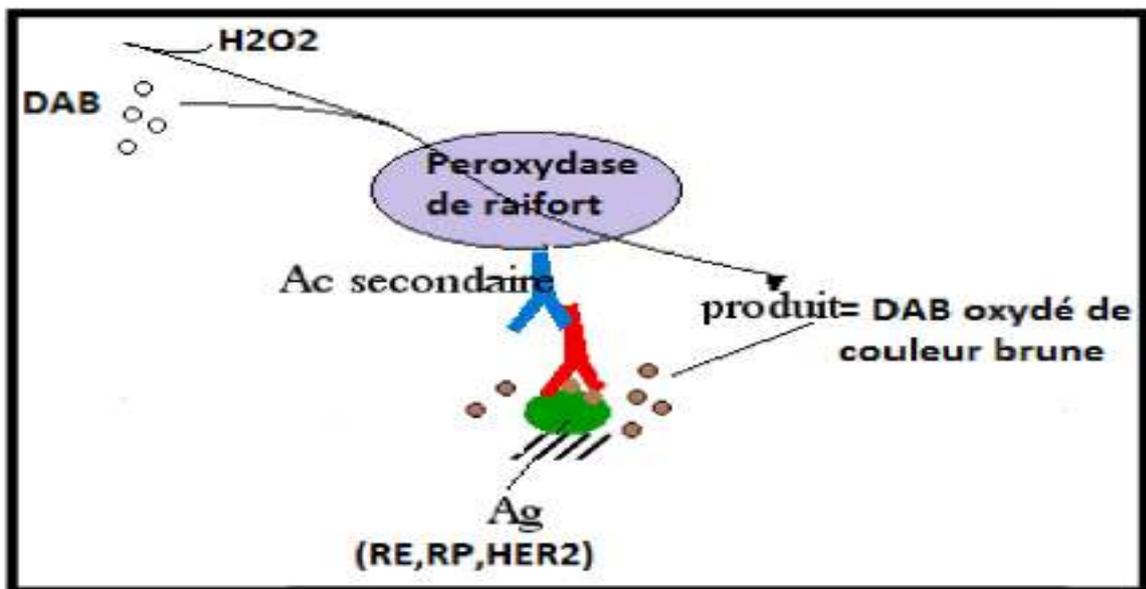


Figure N°30 : la réaction immuno-enzymatique catalysée par peroxydase de raifort.

### **III-3 Lecture des résultats de l'oncogène HER2 :**

L'étude immunohistochimique est réalisée sur coupe de tissu fixé et inclus en paraffine avec un anticorps antiHER2/neu. Les plus utilisés sont l'anticorps monoclonal NCB11 et le sérum polyclonal DA485.

Le marquage est située sur la membrane entourant le cytoplasme et donne un aspect en "maille de filet". Il est, en général, présent sur 100 % des cellules carcinomateuses. Un marquage cytoplasmique est parfois observé ; il est non spécifique et ne doit pas être pris en compte.

Le type de marquage membranaire doit être décrit par :

- son intensité (faible, modérée, intense)
- son caractère continu ou discontinu. Seuls les marquages membranaires continus sont significatifs ;
- le pourcentage de cellules marquées.

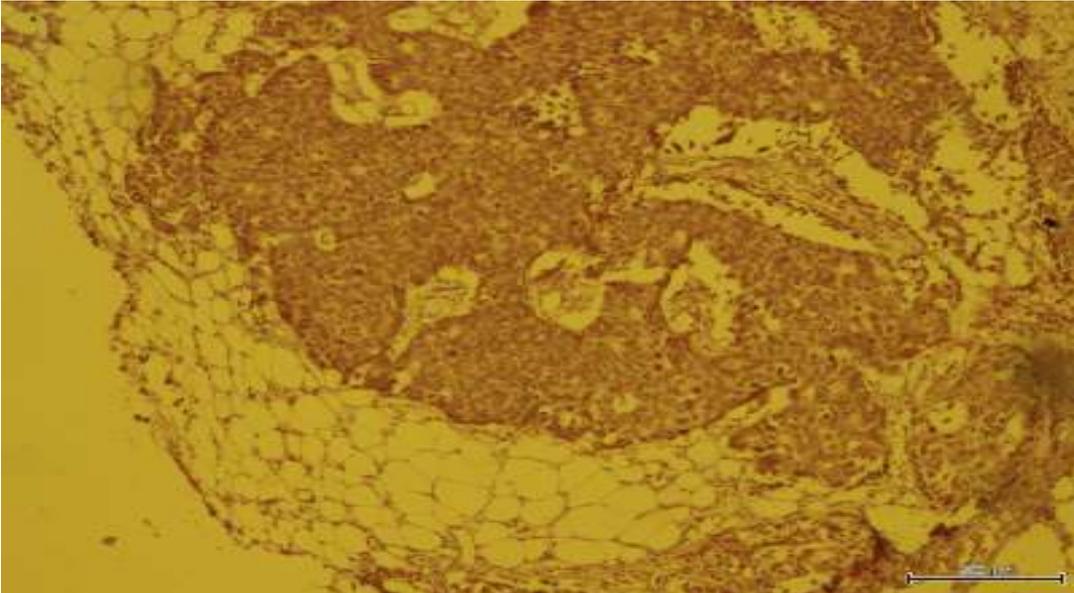
Cette technique est très sensible et peut conduire à des faux positifs. Des témoins sont utilisés pour vérifier la qualité de la technique :

- le témoin interne constitué par les glandes mammaires normales doit être négatif et rapporté dans le compte rendu ;
- un témoin externe : tumeur ou lignée cellulaire dont l'amplification de HER2/neu est connue par une autre méthode, en général l'hybridation in situ.

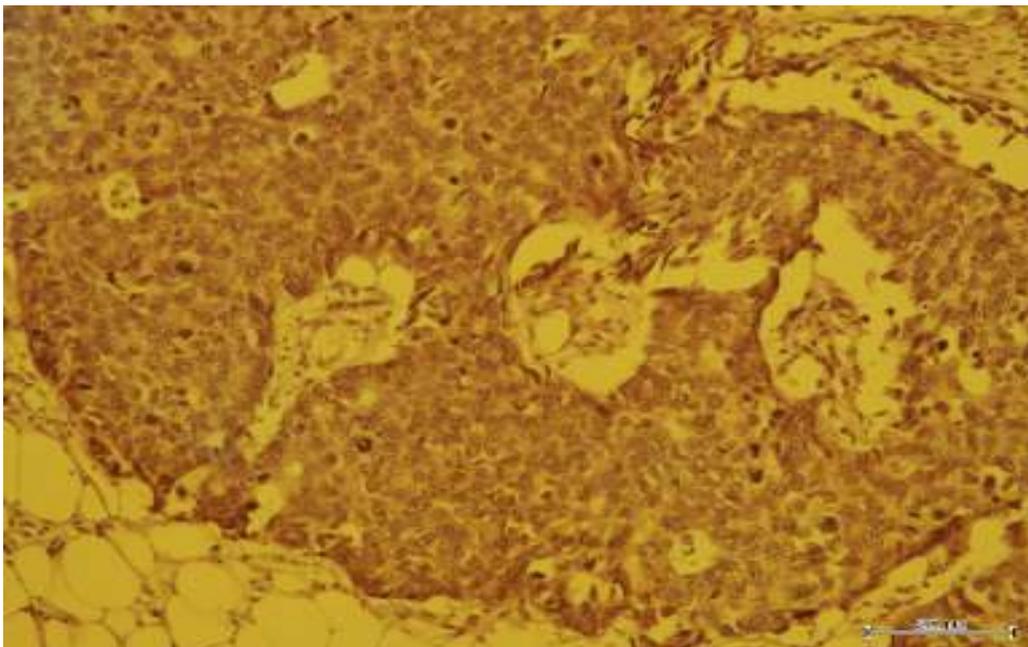
Pour évaluer le statut HER2 plusieurs systèmes de score ont été proposés, aucun n'a été validé. Le score le plus connu des cliniciens et celui utilisé dans l'analyse des études récentes sur l'Herceptin® est la grille de l'Herceptest® de Dako

Dans notre étude, La lecture de l'IHC a été effectuée par des anatomopathologistes de service d'anatomie-pathologie CHU Blida .

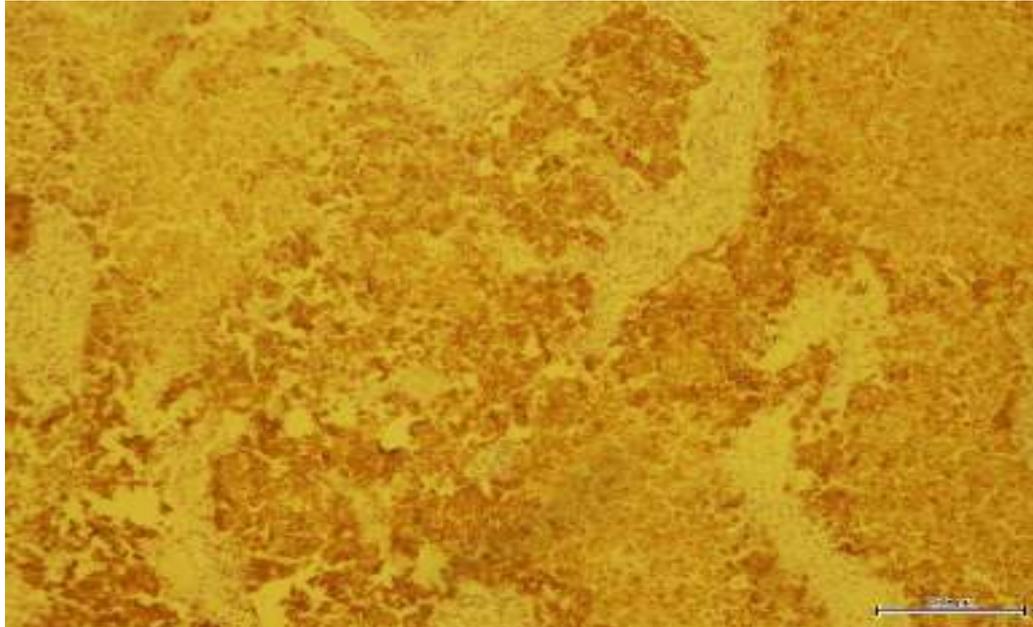
Le signal immunohistochimique de l'HER2 est un marquage membranaire brun.



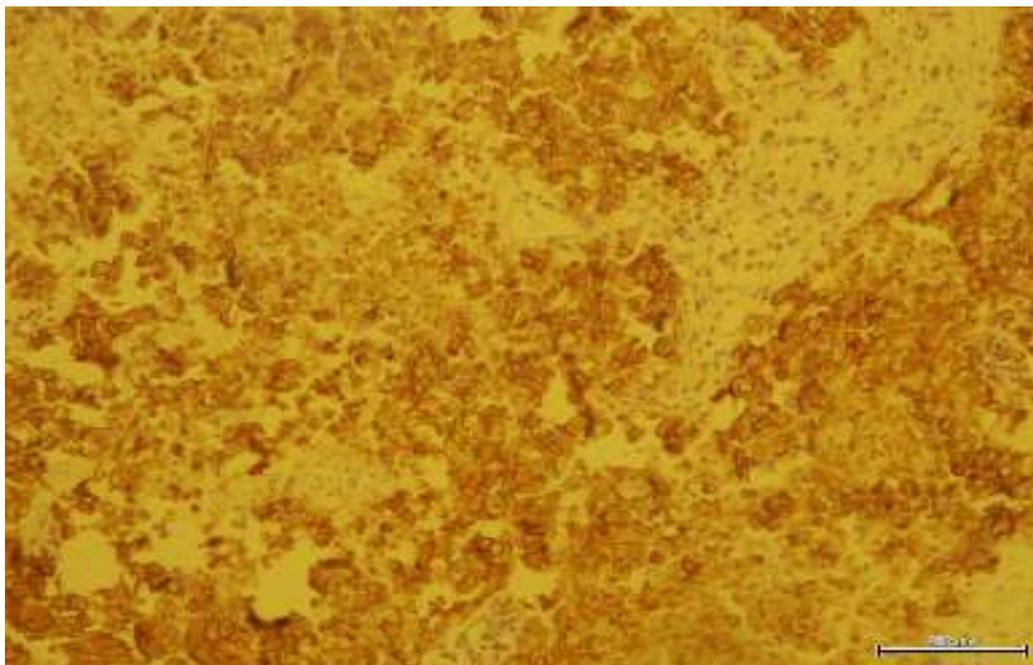
Microphotographie d'un amas de cellules tumorales HER2 négatif au faible grossissement.(originale).



Microphotographie d'un amas de cellules tumorales HER2 négatif au fort grossissement,(originale).



Micphotographie d'un amas de cellules tumorales HER2 positive (score3)montrant un marquage faible grossissement.(originale).

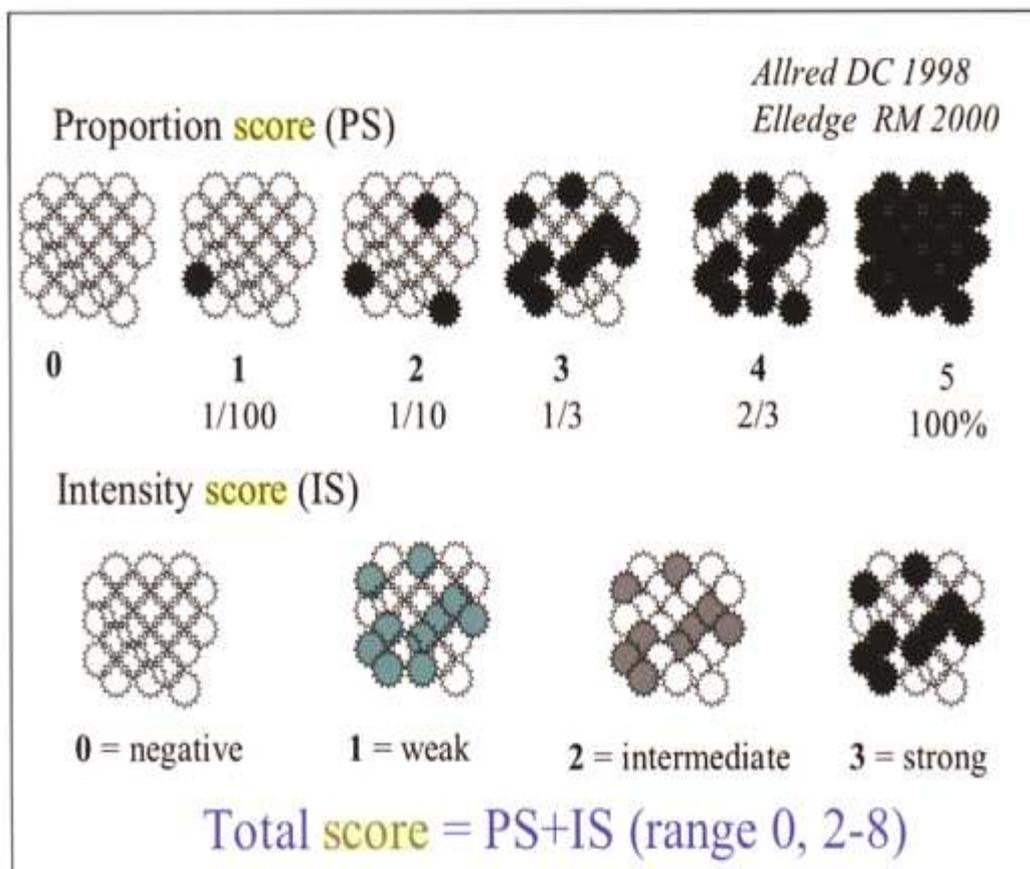


Micphotographie d'un amas de cellules tumorales HER2 positive (score3)montrant un marquage fort grossissement.(originale)

### III-4 Lecture des résultats des récepteurs hormonaux :

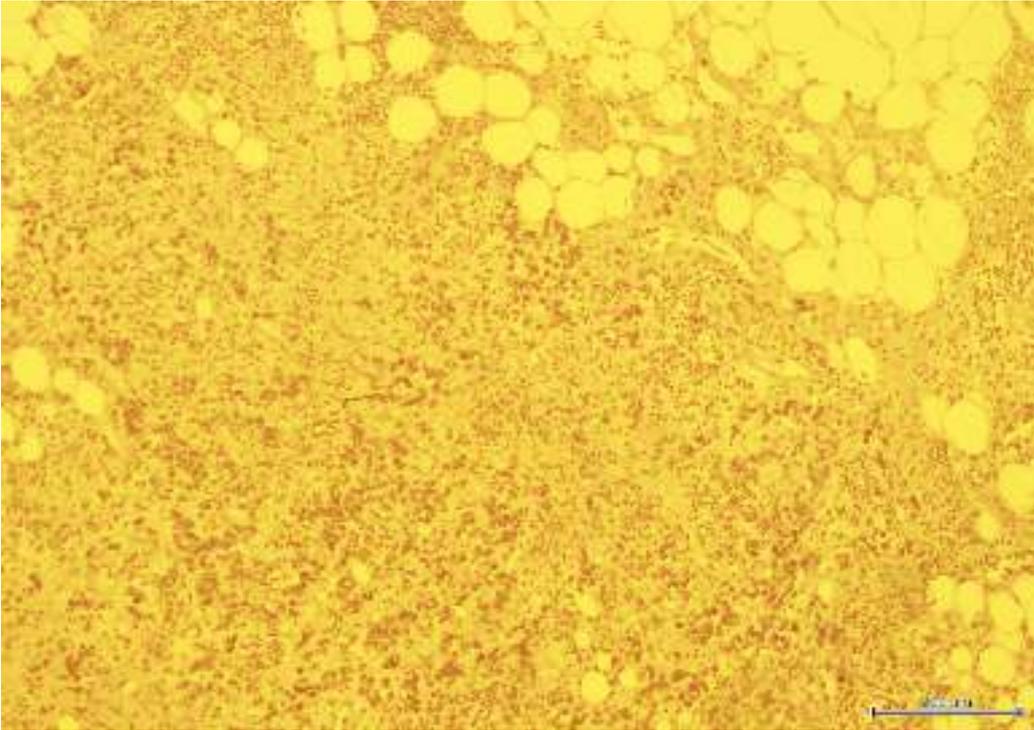
Le recherche du statut des récepteurs hormonaux peut être fait sur des biopsies ,des cellule isolées et sur les spécimens chirurgicaux . il n'est pas de consensus international quant à la notion de positivité des récepteurs hormonaux. le seul immuno-marquage significatif est nucléaire. un tumeur est dit récepteurs positive lorsqu'elle exprime les récepteurs aux œstrogène et /ou à la progestérone. Le seuil de positivité reconnu communément est de 10% de cellules marquée quelle que soit l'intensité. Il est recommandé de rapporter le pourcentage de cellules marquée et l'intensité du marquage (en faible ou +, modéré ++ et fort ou +++). En fonction des équipes, le seuil de positivité varie de 1 à 10% de cellules positives.

Plusieurs scores combinés ont été proposés afin de donner une évaluation semi-quantitative la plus proche possible de la quantification apportée par les techniques biochimiques. Il s'agit du score d'Allred il faut recherches le statut RE et RP.

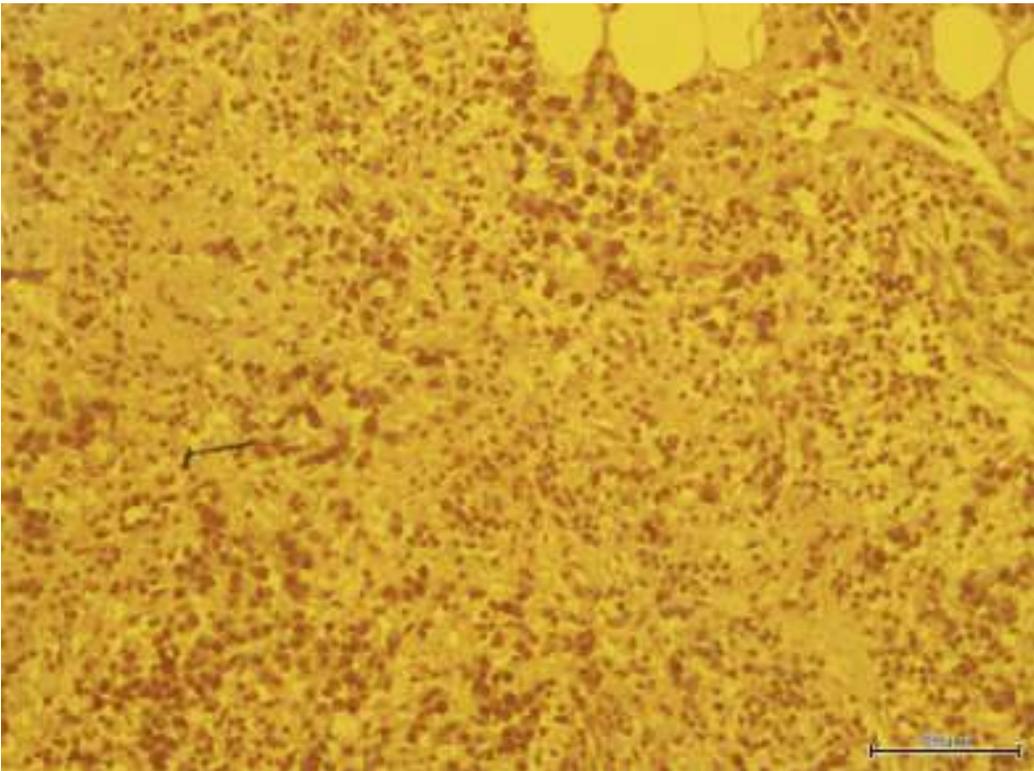


**Figure N° :** Méthode de scoring selon Allred.

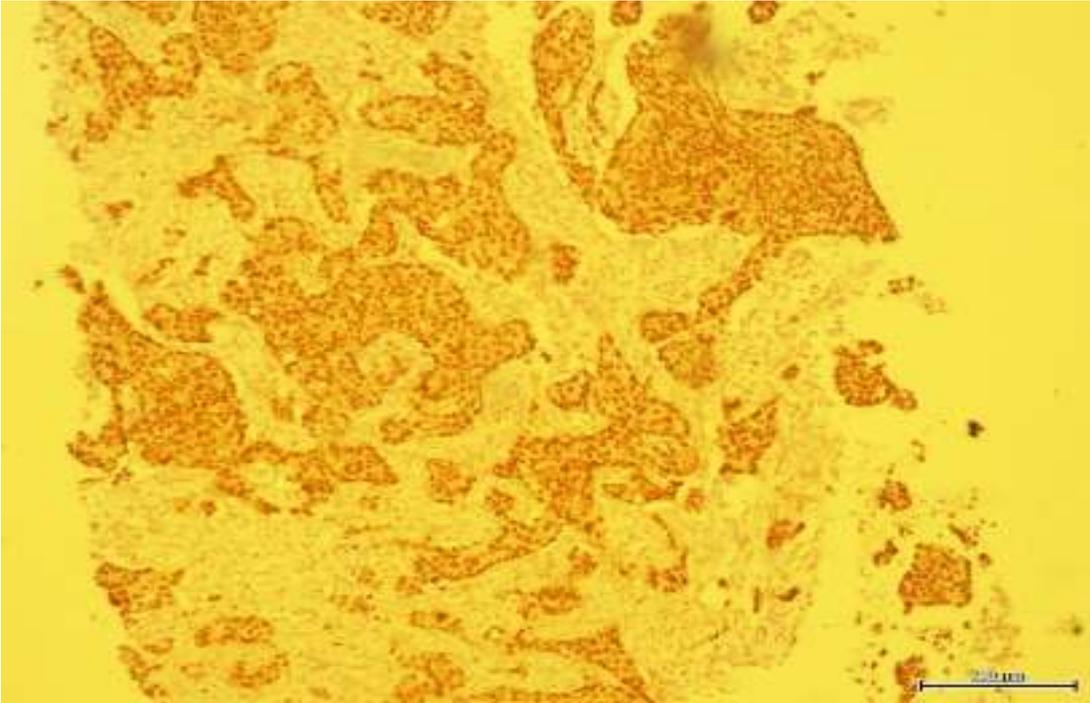
Le signal immunohistochimique des récepteurs hormonaux est un marquage nucléaire brun.



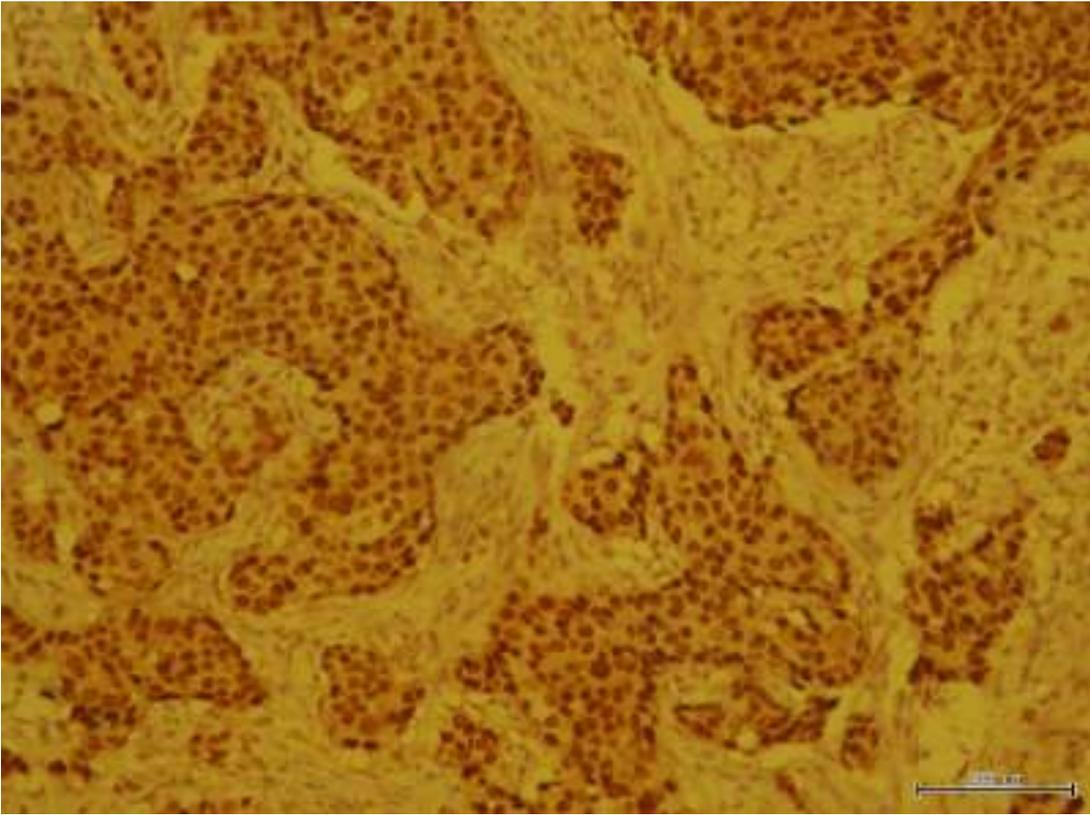
Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RE- à faible grossissement.(originale).



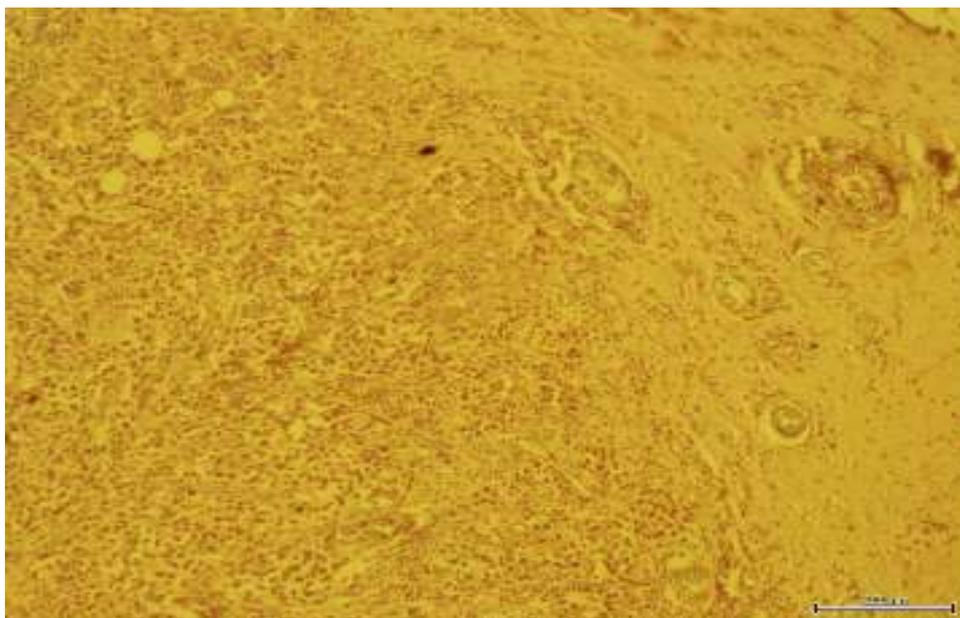
Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RE- fort grossissement .(originale).



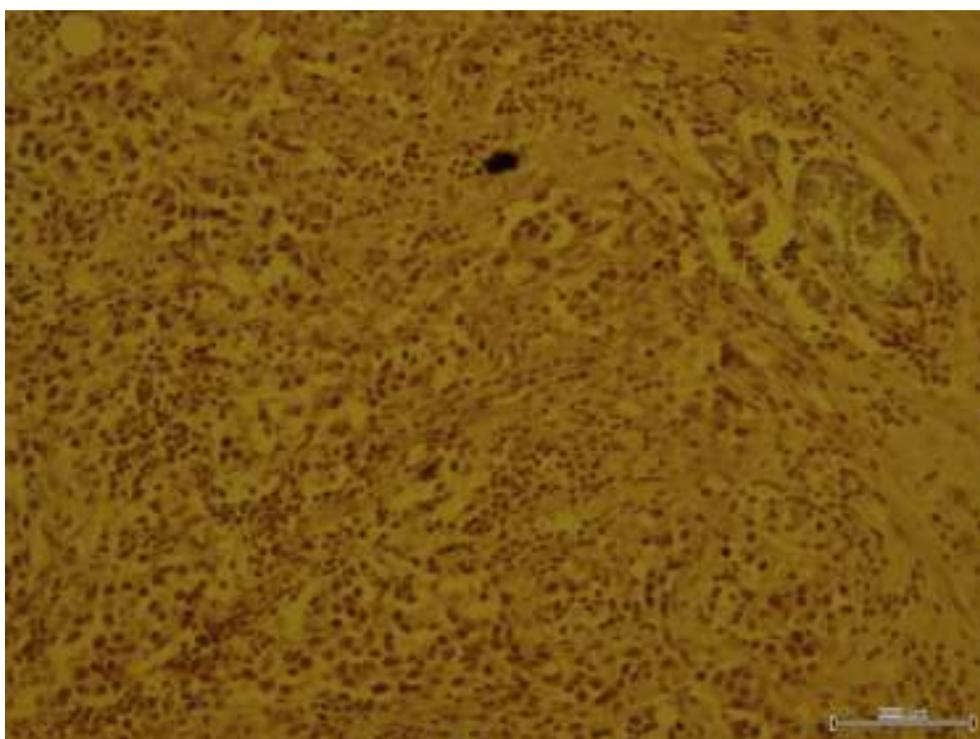
Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RE+ à faible grossissement.(originale).



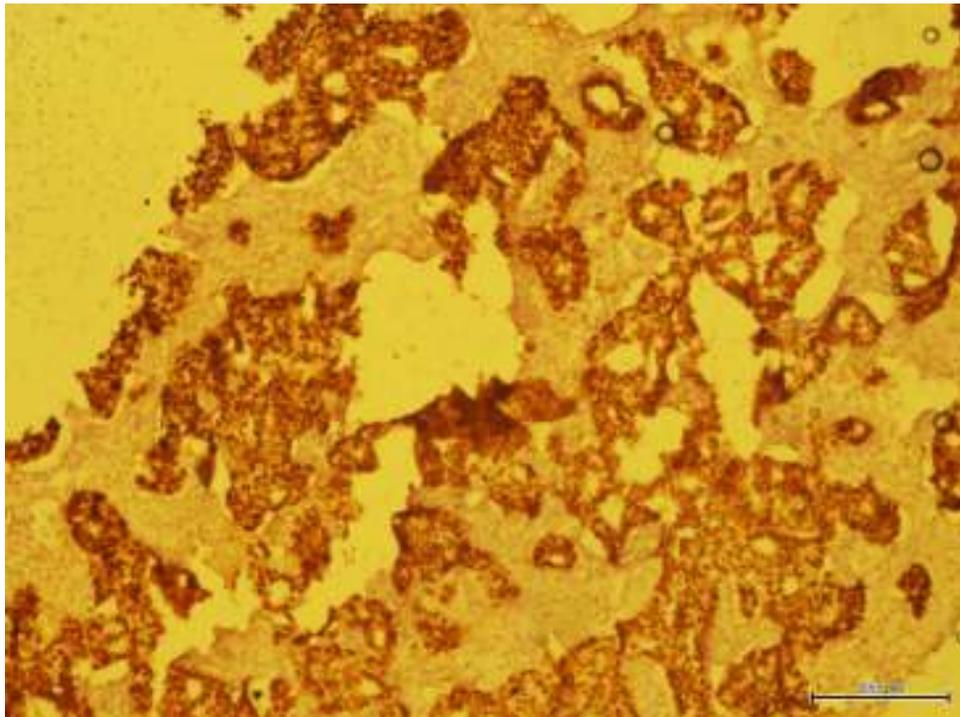
Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RE+ à fort grossissement.(originale).



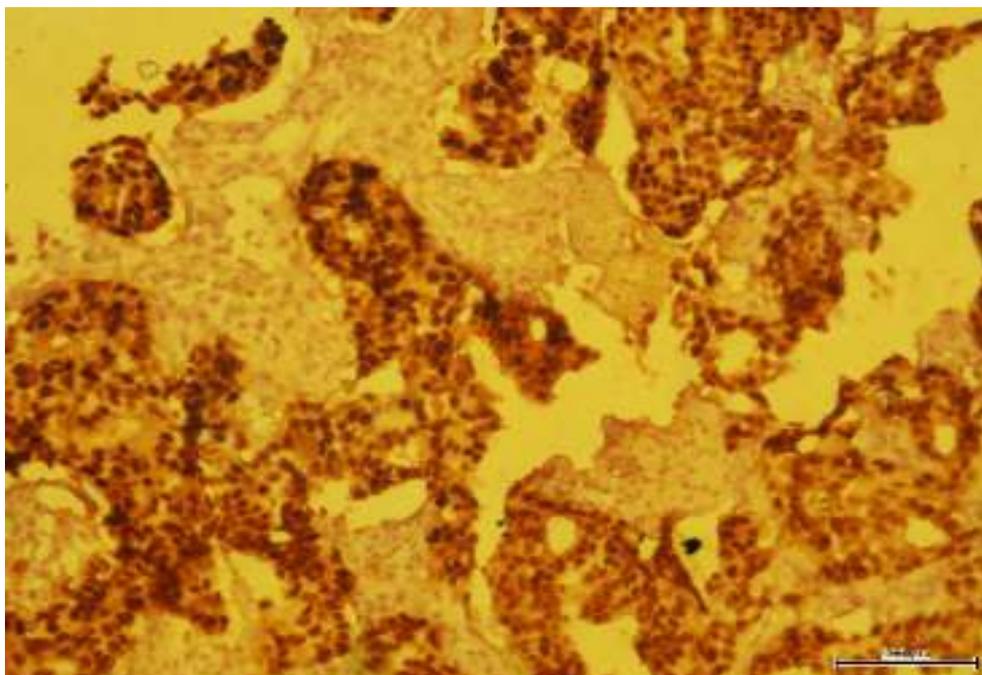
Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RP- à faible grossissement.(originale).



Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RP- à fort grossissement.(originale).



Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RP+ à faible grossissement.(originale).



Microphotographie d'un amas de cellule tumoral RP+ à fort grossissement.(originale).

## ***II-Etude génétique :***

-6 familles présentant un cancer du sein héréditaire ont été étudiées .

Des fiches de renseignement (voir annexe VI ) ont été établies et remplies.

## **L'enquête génétique :**

Pour chaque famille :

-Questionnaire sur les antécédents familiaux

Nombre de la famille.

Nombre des femmes atteintes par famille.

Nombre des hommes atteint par famille.

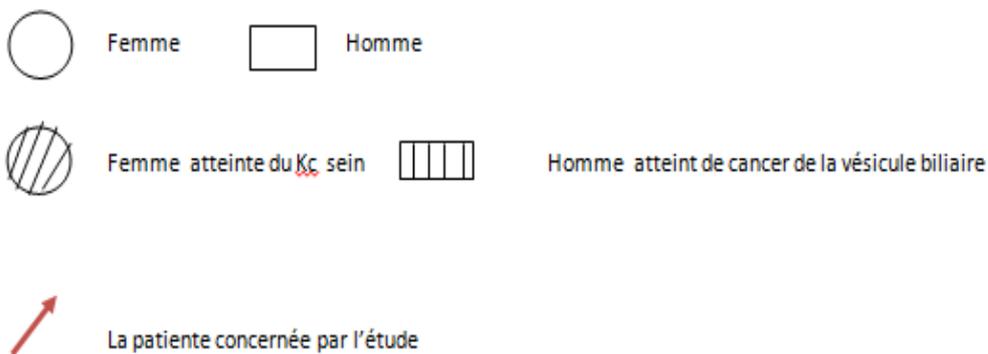
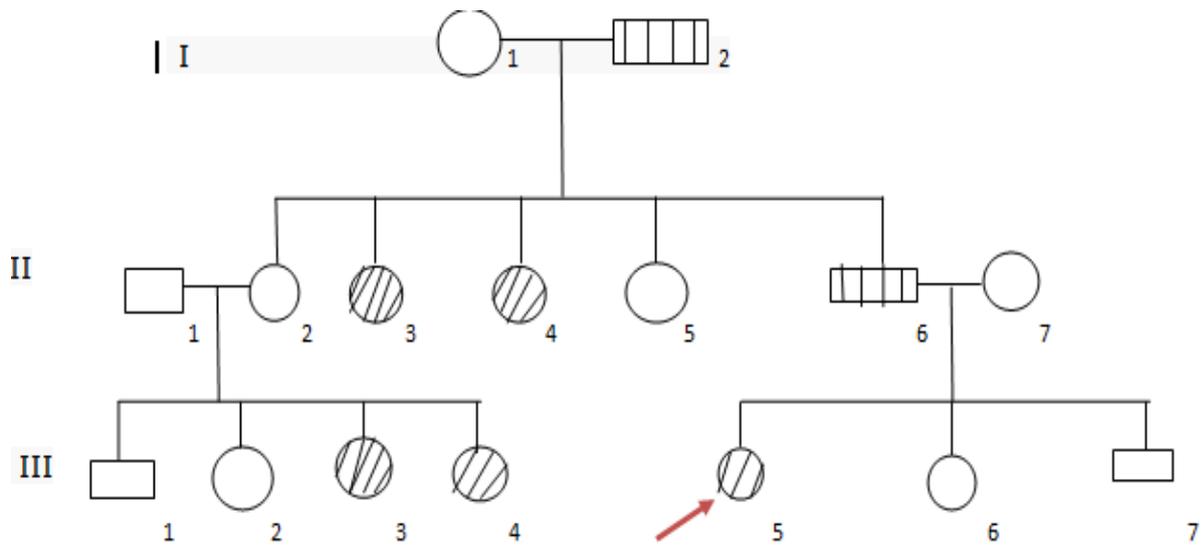
Nombre des antécédents familiaux.

Nombre des décès.

-Etablissement de l'arbre généalogique.

-Etude du mode de transmission.

## FAMILLE1



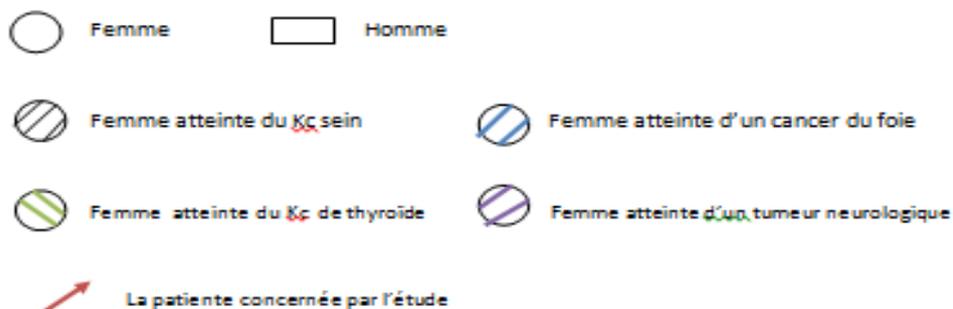
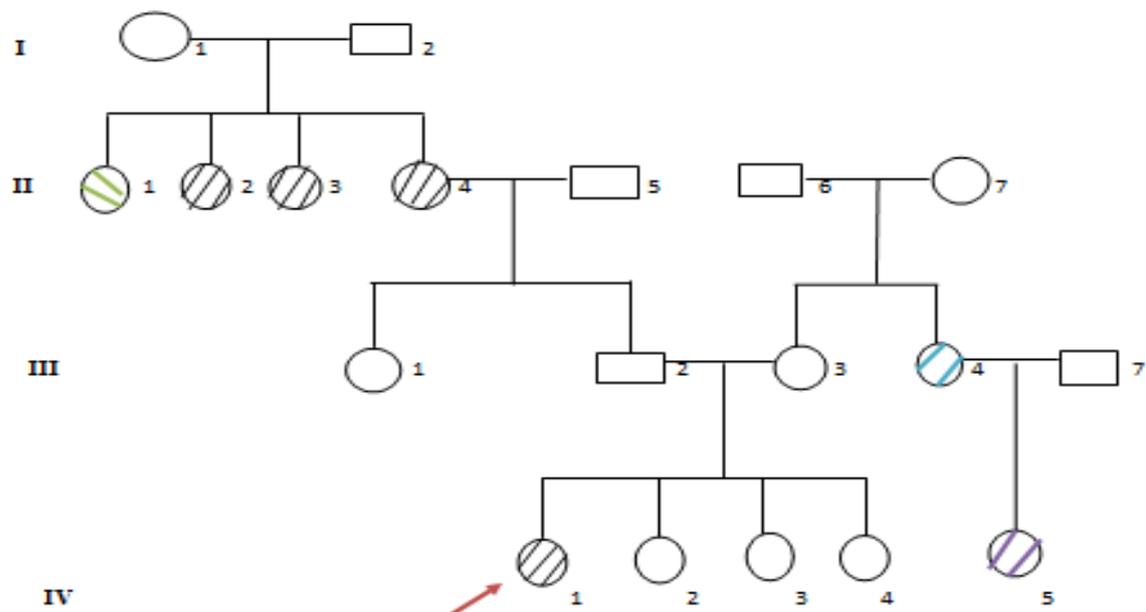
Cet arbre généalogique appartient à une patiente de 49 ans qui a développé depuis 2 ans un carcinome canalaire infiltrant de grade II de SBR de classement p T2 p N0 M0 et test d' IHC RO+ score 7 ,RP+ score 8,Her 2+ score 3.

Les individus **I2** et **II6** ont présenté un cancer de la vésicule biliaire et les individus **II3,II4 ,III3 ,III4** et **III5** ont présenté un cancer du sein.

## Le mode de transmission :

La mère **II2** n'étant pas malade, et que ses filles **III3** et **III4** présentent un cancer du sein, alors le mode de transmission est autosomique récessive. Etant donné qu'on retrouve les types de cancers (le sein et la vésicule biliaire) dans une même famille avec transmission d'une génération à l'autre (**I2** → **III3** et **III6**), il existerait une relation génétique probable entre ces deux types de cancers ?

### FAMILLE 2



Cet arbre généalogique appartient à une patiente de 31 ans qui a développé depuis 4 ans un carcinome mixte (canalaire+lobulaire) infiltrant de grade II de SBR de classement p T2 p N1M0 et test d' IHC RO+ score 3 ,RP+ score 3,Her 2+ score 2.

### **Mode de transmission :**

Etant donné que les parents **III 2** et **III 3** ne sont pas malades, et que leur fille **IV 4** présente un cancer du sein , donc le mode de transmission est autosomique récessive

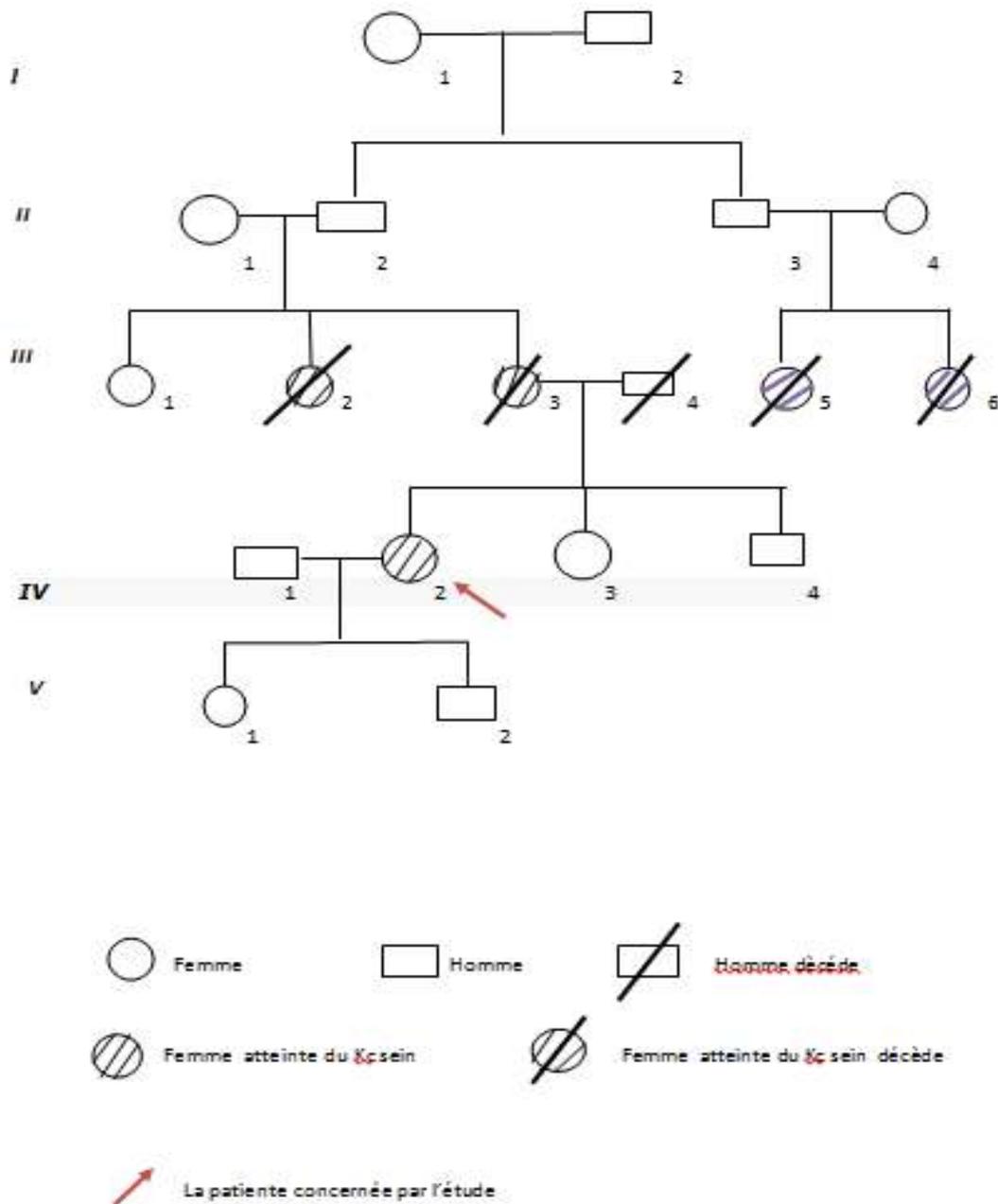
On remarque, dans cette famille, une relation étroite entre les différents cancers, puis que :

- II 1** présente un cancer du la thyroïde.
- III 4** présente un cancer du foie.
- IV 5** présente un cancer du système nerveux.
- IV4** présente un cancer du sein.

Le facteur commun entre l'apparition de ces différents cancers c'est la surexpression de gène HER2.

L'amplification et la surexpression de HER2 ont été retrouvées dans de nombreux cancers chez l'homme. Les localisations retrouvées sont le sein et la thyroïde ( Lamy J.P ,2002),et que 40-63 % des cas de cancer du système nerveux dû à la surexpression de HER2(Lucile et al.,2004).il existe une relation génétique probable entre le cancer du sein et cancer de foie ?

### FAMILLE 3



Cet arbre généalogique présente une patiente de 35 ans qui a développé depuis 3 ans

un carcinome mixte (canalaire+lobulaire) infiltrant de grade II de SBR de classement p T4 p N3M1 et test d'IHC RO+ ,RP+ marquage faible ,Her 2+ score 3.

- Des malades **III 5** et **III 6** sont décédées d'un cancer non identifié.

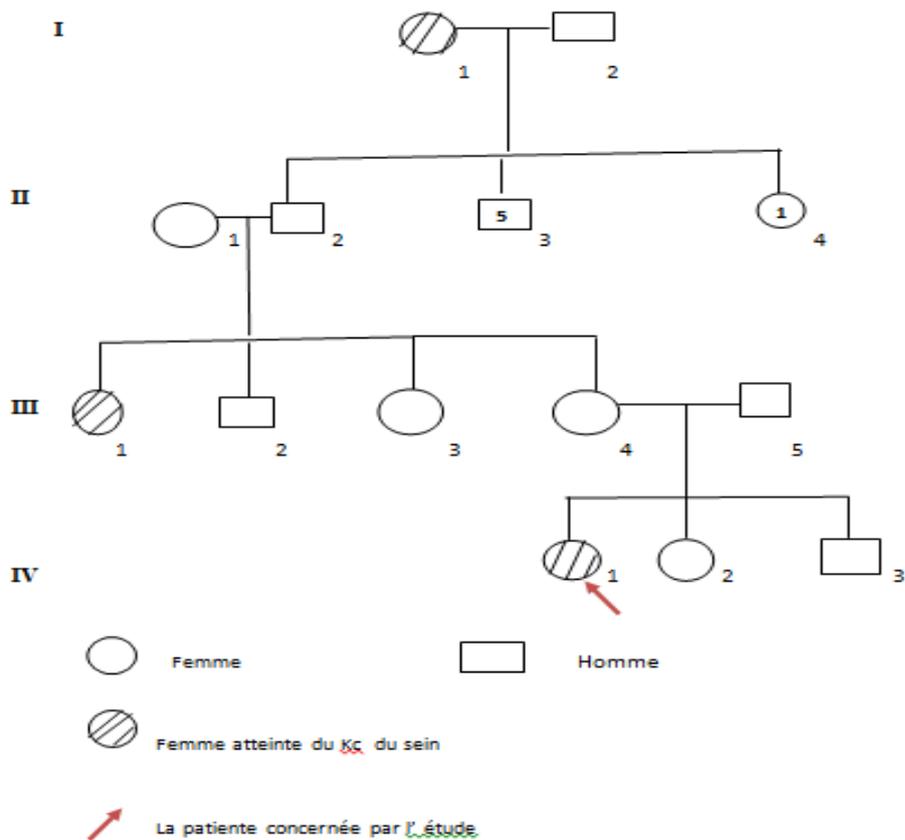
-Des malades **III 2** et **III 3** sont décédées d'un cancer du sein .

-La patiente **IV 2** présente un cancer du sein .

## Le mode de transmission :

Etant donné que les individus **II 1** et **II 2** ne sont pas malades, et que leurs filles **III 2** et **III 3** sont malades, donc le mode de transmission est autosomique récessive. Ceci implique que le père **III 4** est porteur.

## FAMILLE 3



Cet arbre généalogique présente une patiente de 39 ans qui a développé depuis 1 mois

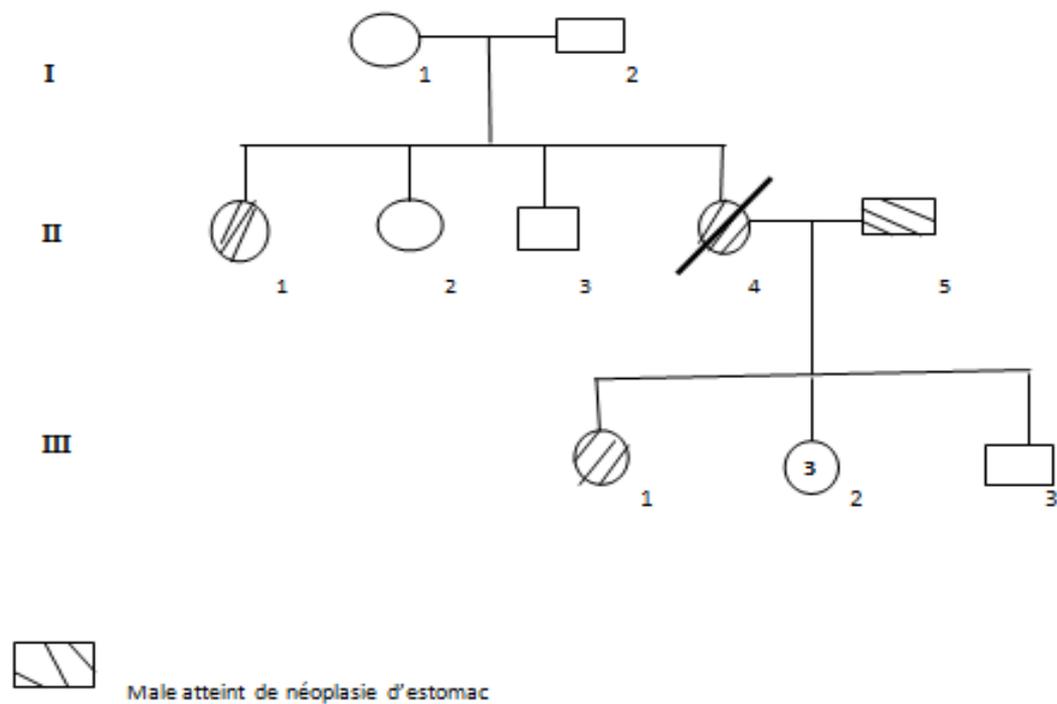
un carcinome canalaire infiltrant de grade III de SBR de classement p T2 p N0M0 et test d'IHC RO+ score 5 ,RP+ score 5,Her 2+ score 2.

## Le mode de transmission :

Etant donné que les parents **III 4** et **III 5** ne sont pas malades, et que leur fille **IV 1** présente un cancer du sein ,alors le mode de transmission est autosomique récessive .

Même raisonnement pour les parents **II 1** et **II 2** , et leur fille **II 1**.

## FAMILLE 5



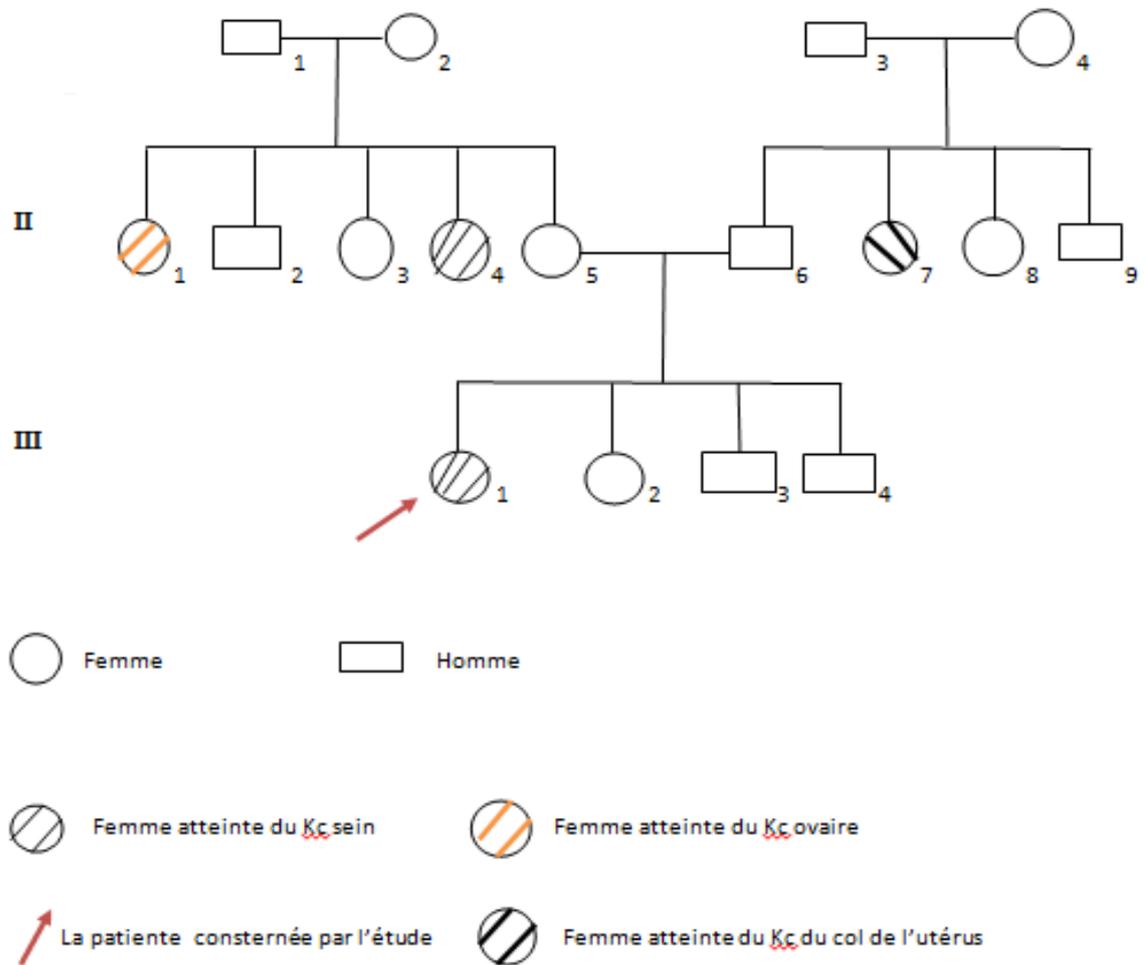
Cet arbre généalogique appartient à une patiente de 54 ans qui a développé un carcinome canalaire infiltrant de grade II de SBR de classement p T4p NOM1 et test d'IHC RO+ score 5, RP+ score 5, Her 2+ score 3.

### Mode de transmission :

Les parents I1 et I2 ne sont pas malades, et leurs filles II1 et II4 présentent un cancer du sein, alors le mode de transmission de cette famille est autosomique récessive.

On remarque une relation génétique entre le cancer du sein et le cancer de l'estomac. En effet, tous les deux HER2+, 33-74 % des cancers de l'estomac sont dus à une surexpression de gène HER2 et 14-91 % des cas de cancers du sein sont dus à une surexpression de gène HER2 (Lucile et al., 2004).

## FAMILLE 6



Cet arbre généalogique appartient à une patiente de 40 ans qui a développé un carcinome canalaire infiltrant de grade II de SBR de classement p T1p N0M0 et test d'IHC RO+ score 7, RP+ score 7, Her 2+ score 3.

## **Le mode de transmission :**

Les parents **II5** et **II6** ne sont pas malades, alors que leur fille **III1** est atteinte d'un cancer du sein ,donc le mode de transmission est autosomique récessive.

On observe , dans cette famille une relation probable entre différents types de cancer ,puis que :

-**II 1** présente un cancer de l'ovaire .

- **III 4** et **III1** présentent un cancer du sein.

- **II 7** présente un cancer de col utérin.

Ceci est normal ,car ces différents cancers sont dus à même gène HER2. Le pourcentage des tumeurs surxprimant le HER2 sont suivants :

14-91 % pour le cancer du sein, 90% pour le cancer du col utérin, 35%-70% pour le cancer d'ovaire ( Lucile et *al.*,2004).

## **Conclusion :**

Le cancer du sein représente la première cause de mortalité féminine dans le monde. L'évaluation des facteurs pronostics et le statut HER2 est primordiale pour une décision thérapeutique adéquate

L'étude immunohistochimique menée sur 40 patientes a montré que l'expression de la protéine HER2 présente un pourcentage de 5% , ce qui est en accord avec la littérature scientifique.

D'autre part, l'enquête génétique des cas familiaux a fait ressortir d'une part mode de transmission autosomique récessive, qui est commun aux 6 généalogies étudiées, et d'autre part l'existence d'une relation entre différents types de cancers.

L'évaluation de nouveaux facteurs pronostics, comme les récepteurs hormonaux et l'HER2, ainsi qu'une meilleure connaissance de ces mécanismes moléculaires, à la base des processus tumoraux permettra de mettre en place et de développer de nouvelles thérapies ciblées.

## Référence :

--Almasri N.M. , MAI Hamad.M(2005). Immunohistochemical evaluation of human epidermal growth factor receptor 2 and estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma in Jordan breast cancer research, 7: r598-r604.

-Axelle Pintiaux(2008-2009). Développement en contraception d'un Modulateur Sélectif du Récepteur de la progestérone :leVA 2914 .

-Berguat(2005-2006). Cours cancérologie oncohématologie , Faculté de médecine de Strasbourg.

-B Molina MA, Saez R, Ramsey EE et al(2002). NH(2)-terminal truncated HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer.  
Clin Cancer Res 8: 347-53.

-Christianson TA, Doherty JK, Lin YJ et al(1998).NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer.  
Cancer Res 58: 5123-9.

-Colomer R, Montero S, Lluch A et al(2000). Circulating HER2 extracellular domain and resistance to chemotherapy in advanced breast cancer.  
ClinCancerRes 6: 2356-62.

-Dansereau S .Ferron(2006).La thérapie ciblée en oncologie et la pointe de l'iceberg.  
Première partie : le récepteur épidermique humain HER /ErbB.  
Pharmaduel ; 39 ,N°3,135-43.

- Ellis io ,Schnitts J.Sastre-Garau ET Al.Imvasive Breast Carcinoma2003) .In tumors of the breast and female genital organs WHO classification of tumours .

Tavassoli FA, Devillu P Eds .IARC Press Lyon ,France 13-59.

-Frederique Penanlt Ilorca., Jacques Olivier Bay. Asco2005 : La biologie a parlé !.  
Bulletin du cancer92,N°7, 623-4.

- Garrett T.P.Crystal(2002). structure of the complexe of human epidermal growth factor ,and receptor extracellulair domains.

Cell 110:775-787.

-Graus-Porta D, Beerli RR, Daly JM *et al*(1997) . ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling.

EMBO J 16: 1647-5.

-Hans-Antonlehr.,Stephanc.SCharefer.,Jean-François Delaloye(2009).Valeurprédictive de la surexpression / amplification de her2/neu pour traitement ciblé du cancer du sein .

Rev Med Suisse ; 5 ,1525-1529.

-INSTITUT NATIONAL DU CANCER DU SEIN France(2013). Le traitement des cancer du sein ,guides patient .

- Jensen E.V., Jacobson H.I(1962). Basic guide to the mechanism of estrogen action.

Rec .prog. Ofhor .Res .18:387-414.

-Julie Lecomte(2009). Effets des ligands de PPAR $\gamma$  sur la voie de signalisation des œstrogènes dans les cellules cancer mammaire.

- Kaklmanivg, GradisharWJ(2006). Gene expression in breast cancer .

Curr Treat options oncol 7:123-8.

-KOS ,M,REIDG,DENGERS,GANNONF. Genomic organization of the human ER gene promoter region.Mol, Endocrinol .15:2057-2063,2001.

-KURTZ JE(2005). Traitement des cancer :chirurgie ,radiothérapie ,chimiothérapie ,hormonothérapie. La décision thérapeutique multidisciplinaire et l'information du malade.ENC ITEM :141.

- Manner L.,Milango G.,P Enaultllorca F., Merlin J.L(2004) .Targeting of membrane receptor tyrosinkinse :is there resistance in the HER2 ?

Bulletin du cancer ,V91 ,N°9,94-685.

-Marie Sanchez-Deneux(2009). Immunosuppresseurs et antistéroïdes dans les cellules de sein humain :effets sur la prolifération cellulaire , les récepteurs des œstrogènes et sur la transcription des gènes qu'ils régulant.

-Mathieun M.C(2000) .Détermination du statut HER2/neu sur coupes des cancers mammaires.

La lettre du sénologue .N°17 .

--Mathieun M.C(2007). Les sous-types moléculaire du cancer du sein.

La lettre du sénologue. N°38.

-Metzgerd.,ALIS.,Bornert J.M.,Chabonp(1995).Characterzation of the amino-terminal transcriptional activation functions of thehuman estrogen receptor in animal and yeast cells .

J Biol Chum 270:9535-9542.

-Mcinerney, E.M., Weis, K.E., Sun, J., Mosselman, S., AND Katzenellenbogen, B.S(1998). Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* 139, 4513-4522,1998.

Fumoleau .P ,Campone.N, Isambert.N, Bourbouloux.E, Mayer.F, Coudert. B.(2007)cancer du sein

-Lucilem., Derique F.E .,Penault-Llorca., Merlin,JL.(2004). Ciblage des récepteurs tyrosine kinase membranaires :ya-t'il de résistance dans l'HER ?

Bulletin du cancer 91 ,N°9,685 -94 .

-PATRICIA DE CREUMOUX.,JEAN-MARC EXTRA.Les inhibiteurs de l'aromatase :Pharmacologie et activité clinique.

--Penanlt–Llorca.F(2000).Détection de surexpression de erbB2 par immunohistochimie :pourquoi , comment ?

Médecine Thérapeutique /Endocrinologie ;2,N°6, 518-25 .

-Lamy PJ(2002). HER-2 et trastuzumab : un nouveau paradigme biologique et thérapeutique dans le cancer du sein.

Médecine Nucléaire - Imagerie fonctionnelle et métabolique ;vol.26 ,n°1.

-Peroucm, Sorléet,Eisen MB et *al* (2000). Molecular portraits of human breast tumors.

Nature 406 :747-52.

-Peroucm, Sorléet,Eisen MB et *al* (2000). Molecular portraits of human breast tumors.

Nature 406 :747-52.

- P. Fumoleau, M. Campone, N. Isambert, E. Bourbouloux, F.Mayer et B. Coudert .Cancer du sein ;234- 266,2007.

-PUPA SM, MENARD S, MORELLI D *ET AL*. The extracellular domain of the c-erbB-2oncprotein is released from tumor cells by proteolytic cleavage. *Oncogene* 8: 2917-23,1993.

-- REID G. DENGERS.,KOS M .,GANNONF .Human estrogen receptor alpha :regulation by synthesis,modification and degradation .

Cellmol life Sci 59:821-831,2002.

-Rowinsky EK (2001) Targeting signal transduction.Horiz Cancer Ther  
2: 3-35.

-SEGATTO O, KING CR, PIERCE JH *ET AL.* Different structural alterations  
upregulate *in vitro* tyrosine kinase activity and transforming potency of the  
erbB-2 gene.

Mol Cell Biol 8: 5570-4,1988.

- S GUIU., B COUDERT., L FAVIRR.,L ARMOULD.,P FUNPOLEOU.Thérapeutique dans le  
cancer du sein métastatique HER2-positif :présent et future.

Bullen du cancer , 97 ,N°3,365-83, ,Mars 2010.

-SHAHLAMA SOOD ., MARILY M BUI. Prognostic and predictive value of HER2/neu  
Oncogene in breast cancer . 685 MICROSCOPY RESEARCH AND TECHNIQUE59,102-  
108,2002.

--SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, *ET AL.* Studies of the HER-2/neu proto-oncogene  
in human breast and ovarian cancer.

Science ;244:707-12,1989.

- SORLIET.PEROUCM,TIBSHIRANI R *ET AL.* Gene expression patterns of breast carcinomas  
distinguish tumor subclasses with clinical implications

ProcNatI AcadSci USA 98:10869-74,2001.

-SORLIRT, TIBSHERANIR,PARKER J *ET AL.* Repeated observation of breast tumor subtypes in  
independent gene expression data sets.

ProcNathAcadSci USA 100:8418-23,2003.

-SORLIET,WANGY.XIAO C *ET AL.*Distinct molecular mechanisms underlying clinically  
relevant Subtypes of breast cancer :gene expression analyses across three different plat  
formus.

**BMC Genomics 7:127,2006.**

**-VERONIQUE DIERAS.,ANNE VINCENT-SALONRON.,ARMELLE DEGEORGES ;,PHILIPPE BEUZEBOC.,LAURENT MIGNOTq., PATRICIA DE CREMOUX .Trastuzumab(Herceptin®)et cancer du sein : mécanismes de résistance .**

**Bulletin du cancer ;94,N°3 , 259-66, MARS 2007.**

**-VOGEL.C., CHAN A.,GRILB.,KIM S.B., KUBEBAYASHIJ., LIUL.,LUYS., MOON.**

**Management of ErebB2-positive breast cancer : insight from preclinical studies with lapatinib.**

**JPNJ CHIN ONCOL 40:999-1013,2010.**

**-ZHAOC ., MATTHEWS J.,TUJAQUE M.,WANJ.,STROMA A.,TORESSON G., LAME E.W., CHENG G., GUSTAFSSON J.A.,DAHLMAN-WRIGHT K. Estrogen receptor beta 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor beta 2 negatively regulates the transactivation of estrogen receptor alpha in human breast cancer cells .**

**Cancer Res 67:3955-3962,2007.**

**-How do geneticists indicate the location of a gene**

**- <http://www.cellbiol.net/stc/alphaHERCEPTIN2images.php>**

**-<http://eurocancer.jle.com/articles/2002/41-4.htm>**

# Annexes

## Annexe I: Classification histologique des cancers du sein selon L'OMS 2002-2003 :

<b>Tumeurs épithéliales non infiltrantes</b>
Carcinome canalaire in situ (intra-canalaire) (CCIS)
Carcinome lobulaire in situ (CLIS)
<b>Tumeurs épithéliales infiltrantes</b>
Carcinome canalaire infiltrant SAI (sans autre indication)
Carcinome canalaire infiltrant avec composante intra-canalaire prédominante
Carcinome lobulaire infiltrant
Carcinome mucineux (colloïde)
Carcinome médullaire
Carcinome papillaire
Carcinome tubuleux
Carcinome adénoïde kystique
Carcinome sécrétant juvénile
Carcinome apocrine
Carcinome métaplasique de type épidermoïde
Carcinome métaplasique de type à cellules fusiformes
Carcinome métaplasique de type chondroïde et osseux
Carcinome métaplasique de type mixte
Maladie de Paget du mamelon

**Annexe II : Classification TNM** : La classification TNM de l'international Union Against Cancer décrit la tumeur en fonction de 3 dimensions :

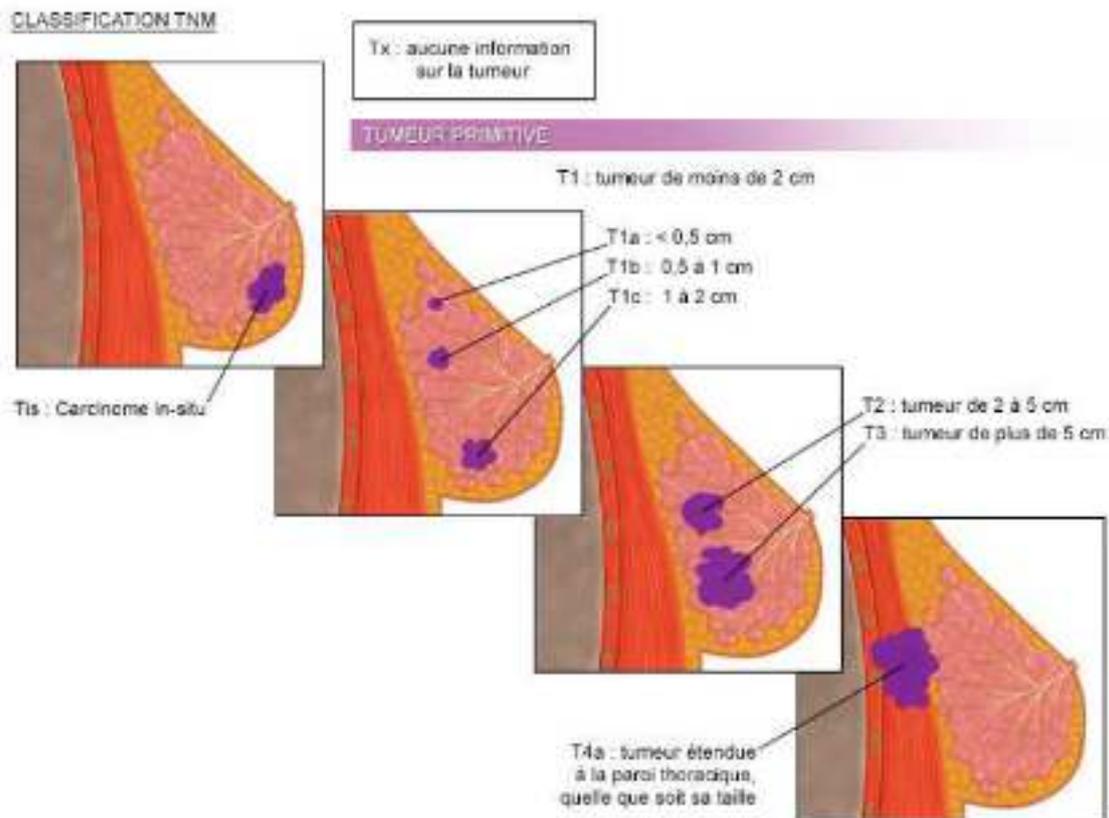
**T** : la taille

**N** : l'existence d'un envahissement ganglionnaire

**M** : l'existence de métastase

Ces trois éléments complétés par un nombre indiquent l'étendue du cancer (niveau 0 à 4 pour **T**, 0 à 2 pour **N**, 0 à 1 pour **M**).

Le système **TNM** distingue le stade clinique pré-thérapeutique noté « **cTNM** » et le stade anatomopathologique post-chirurgical noté « **pTNM** » .



### **Annexe III :Classifications de Chevalier et Sataloff :**

Ce sont des classifications qui permettent l'évaluation histologique de la Réponse à la chimiothérapie néo-adjuvante. Elles se basent sur l'analyse des Reliquats tumoraux mammaires et axillaires.

1-Grade de Chevallier :

Grade 1 : absence de toute cellule tumorale macroscopiquement et Histologiquement.

Grade 2 : présence de carcinome in situ dans le sein, sans cellule tumorale Invasive et pas de métastase axillaire.

Grade 3 : présence de cellules carcinomateuses résiduelles avec des Altérations stromales comme la sclérose et la fibrose.

Grade 4 : peu ou pas de modifications de l'apparence de la tumeur.

Il existe plusieurs modalités d'établissement des grades histopronostiques. Le plus courant en Europe est celui de Scarf-Bloom-Richardson (grade SBR) modifié par Elston et Ellis . Ainsi modifiée, cette classification s'applique à toutes les formes de cancer invasif et prend en compte trois critères histologiques cotés de 1 à 3 : la différenciation tubulo-glandulaire de la tumeur, le pléomorphisme nucléaire et le compte des mitoses.

La différenciation tubulo-glandulaire est appréciée sur la proportion de tubules, glandes présentes dans la tumeur :

score 1 : bien différencié (plus de 75% de la surface tumorale).

score 2 : moyennement différencié (10-75% de la surface tumorale).

score 3 : peu différencié (moins de 10% de la surface tumorale).

Elston et Ellis ont établi un abaque permettant d'adapter le compte des mitoses en fonction du diamètre utilisé. Le score total obtenu permet de distinguer :

grade I : scores totaux 3, 4, ou 5.

Grade II : scores totaux 6 ou 7.

Grade III: scores totaux 8 ou 9.

## Annexe IV :Descriptif de l'appareillage utilisé :

### 1-Appareil à circulation (circulateur) :



Photographie du circulateur( laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Blida)

### 2-Microtome



Photographie de microtome (laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU DE Blida)

### 3- Appareil à enrobage



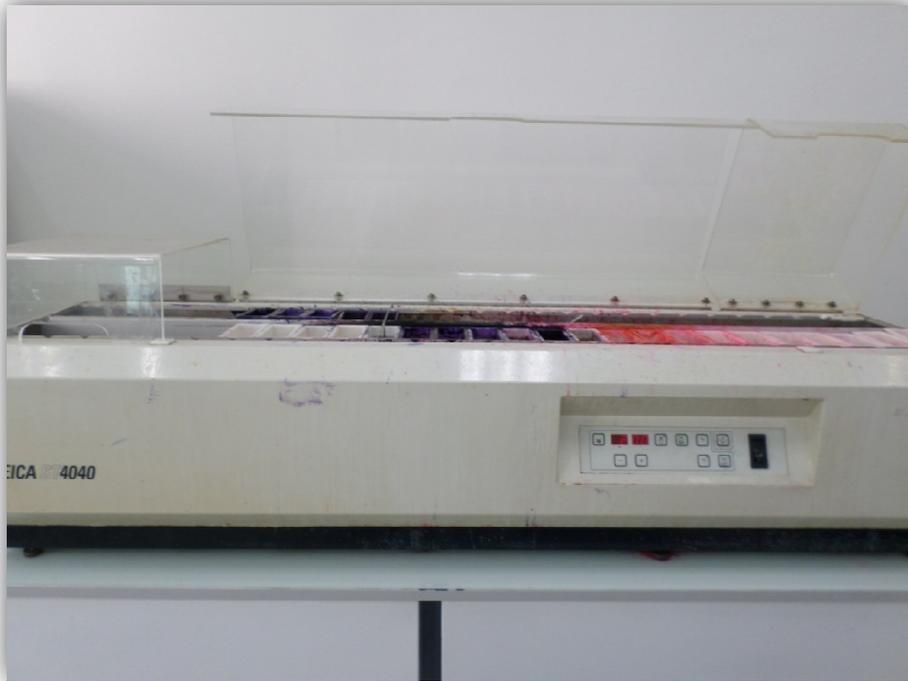
Photographie de l'appareil à enrobage( laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Blida)

### 4- Bain marie



Photographie de bain marie( laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Blida).

#### 4- Batterie de coloration HE



Photographie de la batterie de coloration H  
(laboratoire d'anatomie-pathologie du CHU de Blida)

Tableau représentant l'enchaînement et les rôles des produits de la batterie de coloration.

Composition des bacs	RÔLES
6 bacs de xylène	Poursuite du déparaffinage (la paraffine est soluble dans le xylène)
4 bacs d'alcool à concentration ↘	Réhydratation.
2 bacs d'eau courante	Elimination de l'alcool.
2 bacs d'hématoxyline De Harris	Coloration nucléaire.
2 bacs d'eau courante	Elimination du colorant
1 bac de lithium carbonate	Fixation de la coloration bleue de noyau .
1 bac d'eau courante	Elimination de lithium carbonate
1 bac d'éosine	Coloration du cytoplasme et du collagène.
1bac d'eau courante	Elimination de l'éosine.
1bac d'eau distillée	Rinçage
2 bacs de l'alcool	Déshydratation
4 bacs de xylène	Eclaircissement.

**Annexe V** :Tableau représentatif des réactifs contenu dans les kits des récepteurs hormonaux et l'hercepTest.

Réactifs/Lames	Kit Dako des récepteurs hormonaux	Kit Dako de l'hercepTest
<b>Solution de démasquage.</b>	Tampon citrate avec agents antimicrobiens.	Tampon citrate 0,1 mol/L Contenant un détergent .
<b>Réactif de blocage de la peroxydase.</b>	Solution contenant du peroxyde d'hydrogène à 0,5 %,des inhibiteurs enzymatique ,un conservateur.	Solution contenant du peroxyde d'hydrogène à 3% avec 15mmol/L d'azide de sodium(NaN3)
<b>Anticorps primaire</b>	Anticorps monoclonal de souris anti-RE humain(IgG) ,Anticorps monoclonal de souris anti-RP humain (IgG) dans un tampon tris-HCL contenant une protéine stabilisante.	Anticorps de la lapin anti-HER2 humain dans tampon tris-HCL contenant une protéine stabilisante.
<b>Réactif de contrôle négatif</b>	Anticorps monoclonal de souris (IgG) dans un tampon tris-HCL contenant une protéine stabilisante	Anticorps monoclonaux de la lapin dans tampon tris-HCL contenant une protéine stabilisante
<b>Solution de tampon substrat DAB</b>	Solution contenant duperoxydase d'hydrogène <0,1% et des stabilisants	Solution contenant duperoxydase d'hydrogène <0,1% et des stabilisants
<b>Solution de substrat chromogène DAB</b>	Solution chromogène de tétrahydrochlorurede3 ;3 – diamio benzidine à 5,5%	Solution chromogène de tétrahydrochlorurede3 ;3 – diamio benzidine à 5,5%
<b>Solution de rinçage</b>	Tampon tris-HCL avec un détecteur et agent antimicrobien.	Tampon tris-HCL avec un détecteur et agent antimicrobien.
<b>Lames de contrôle</b>	Chaque lame contient une lignée cellulaire présentant une expression des récepteurs hormonaux et lignée négative	Chaque lame contient 3 lignées cellulaires de carcinome mammaire avec 3 niveau d' expression d'HER2 :score0,1+,3+ .

**Annexe VI : Fiche de renseignement**

## **Fiche de renseignements**

**Nom (malade) :**

**Prénom :**

**Date de naissance :**

**N°anatomie pathologique :**

**Age d'apparition du cancer du sein :**

**Antécédents familiaux :**

**Coté paternel :**

**Coté maternel :**

**Arbre généalogique :**