

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche
Scientifique
Université SAAD DAHLEB de BLIDA



Faculté de Science de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire
Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du
diplôme Master II en Science de la Nature et de la Vie
Option : Génétique

THEME

Recherche de mutations du gène *EGFR* dans une série d'adénocarcinomes pulmonaires

Présenté par :

Soutenu le : 19.09.2020

- Chaouane Mohamed Lyes.
- Larkeche Lyes.

Devant le Jury :

CHABANE D.	Maitre-Assistante A	USDB1	Présidente
BENYAHIA N.	Maitre-Assistant A	USDB1	Examineur
KOUCHKAR A.	Professeur	CMPC	Promotrice
AÏSSAN-ELFERTAS R.	Maitre de Conférences B	USDB1	Co-Promotrice

Année universitaire 2019/2020

REMERCIEMENTS ET DEDICACES :

Nous tenons à remercier chaleureusement notre promotrice le **Pr. Kouchkar A.**, Professeur en anatomopathologie au Centre Pierre et Marie Curie d'Alger, qui nous a fait l'honneur de généreusement nous accueillir au sein de son équipe, de nous avoir encadré notre travail, partageant avec nous sa formidable expérience en anatomopathologie et en science de façon générale. C'est avec une grande fierté que nous voyons votre nom figuré dans notre humble travail. Cette expérience fut extrêmement enrichissante pour nous, autant sur le plan scientifique que sur le plan humain, nous espérons sincèrement être amenés à recollaborer avec vous dans le futur.

Nous tenons aussi à exprimer notre sincère et profonde reconnaissance envers notre copromotrice le **Dr. Aïssani R.**, Maître de Conférences B à l'USDB1, sans laquelle ce travail n'aurait jamais pu être réalisé. Nous ne saurons jamais comment vous remercier pour tout le temps et l'attention que vous nous avez accordé, ainsi que pour votre immense savoir faire duquel nous avons pu bénéficier. Nous espérons que le futur nous donnera encore l'occasion d'apprendre de votre expérience et qu'un jour, en tant que vos étudiants, vous rendre fière.

Merci à **Amina** la biologiste la plus compétante du CMPC d'avoir prit le temps de partager avec nous son expérience en techniques de biologie moléculaire et d'avoir gentiellement prit la peine de répondre à toutes nos questions, nous vous souhaitons un brillant avenir et tout ce qu'il y a de meilleur.

Nous remercions aussi le **Dr. Chabane D.** de nous faire l'honneur de présider le jury. Merci au **Dr. Benyahia N.** pour l'attention portée à notre travail en sa qualité d'examinateur.

Nos remercions vivement notre camarade **Sabrine Toubdji** qui nous a prêté main forte au bon moment. A toutes les personnes ayant participé de près ou de loin à la réalisations de ce travail ainsi qu'à tout ceux qui ont joué un rôle important dans notre formation, particulièrement le **Dr. Mohamed Said** pour avoir toujours fait preuve d'intégrité en nous permettant d'entamer notre formation en Master, **Dr. Guessaibia** pour avoir su nous communiquer sa passion pour la génétique, **Dr. Aïssani** et **Dr. Benyahia** pour leurs captivants cours de G.S.I , d' O.G.M et de génétique évolutive, ainsi que l'ensemble des enseignants de l'équipe de génétique.

...A toutes les personnes qui vouent leur vie et leur savoir à la lutte contre le cancer, aux combats quotidiens que mènent les courageuses personnes atteintes, aux victimes de cette maladie et à leur famille

RESUME

Résumé

Le cancer broncho-pulmonaire est à ce jour le plus mortel des cancers ; l'adénocarcinome en est le type histologique le plus représentatif. La cancérogenèse est caractérisée par un profil mutationnel marqué, entre autre, par l'altération du gène *EGFR*, justifiant ainsi le développement de thérapies ciblées, notamment, les inhibiteurs de tyrosine kinase du récepteur de l'EGF (ITK-EGFR).

Le présent travail est une étude rétrospective ayant concernée 22 cas d'adénocarcinome pulmonaire. Les mutations activatrices dans les exons 18 à 20 du gène *EGFR* ont été recherchées, par PCR en temps réel utilisant le kit cobas « EGFR mutation test V2 ». Ce génotypage présente un intérêt thérapeutique certain. En effet, les individus positifs aux mutations activatrices du gène *EGFR*, pourraient bénéficier d'un traitement à base d'ITK-EGFR. Les caractéristiques démographiques de la cohorte ont été déterminées. L'âge moyen au diagnostic était de 63.8 ans et le sexe ratio homme/femme était de 2.0. Sur le plan histologique, nous avons observé une hétérogénéité du phénotype tumoral, confirmée par le profil immunohistochimique de ces adénocarcinômes. Concernant le statut mutationnel de l'*EGFR*, seules 2/22 cas étaient positifs pour les mutations localisées dans la région, s'étendant de l'exon 18 à 20. La distribution de ces mutations dans notre cohorte est relativement faible. Un effectif plus important et surtout élargi sur plusieurs régions d'Algérie, pourrait nous donner plus d'informations sur la prévalence et la distribution de ce type de mutations. L'intérêt thérapeutique des ITK-EGFR pourra être mieux apprécié.

Mots clés :

Adénocarcinome pulmonaire, mutations *EGFR*, inhibiteurs de tyrosine kinase, Résistance ITK.

RESUME

يعتبر سرطان القصبات الرئوية أكثر أنواع السرطان فتكاً حتى الآن. سرطان الورم الغدي هو النوع النسيجي الأكثر تمثيلاً. يتميز التسرطن بمظهر طفري يتميز ، من بين أمور أخرى ، بتغيير جين EGFR ، وبالتالي يبرر تطوير العلاجات المستهدفة ، على وجه الخصوص ، مثبطات التيروسين كيناز لمستقبل EGF (ITK-EGFR).

هذا العمل عبارة عن دراسة بأثر رجعي لـ 22 حالة من حالات سرطان الغدة الرئوية. تم البحث عن الطفرات المنشطة في القطع الدالة 18 إلى 20 من جين EGFR عن طريق PCR في الوقت الحقيقي باستخدام "cobas" اختبار طفرة EGFR V2". هذا التتميط الجيني له أهمية علاجية محددة. في الواقع ، يمكن للأفراد الموجودين في تنشيط الطفرات في جين EGFR الاستفادة من العلاج باستخدام ITK-EGFR. تم تحديد الخصائص الديموغرافية للمجموعة. كان متوسط العمر عند التشخيص 64.4 سنة ، ونسبة الذكور إلى الإناث 2.16. من الناحية النسيجية ، لاحظنا عدم تجانس النمط الظاهري للورم ، والذي أكدته المظهر الكيميائي المناعي لهذه الأورام الغدية. فيما يتعلق بحالة طفرة EGFR ، كانت 22/2 حالة فقط إيجابية للطفرات، والتي تتراوح من القطع الدالة 18 إلى 20. توزيع هذه الطفرات في مجموعتنا منخفض نسبياً

يمكن لعينة ديموغرافية أكبر ، وقبل كل شيء موسعة على عدة مناطق من الجزائر ، أن تعطينا مزيداً من المعلومات حول انتشار وتوزيع هذا النوع من الطفرات. القيمة العلاجية لـ TKI-EGFR لتقدير أفضل

الكلمات الدالة

سرطان الغدة الرئوية ، طفرات EGFR ، مثبطات التيروسين كيناز ، مقاومة ITK

RESUME

Abstract :

The bronchopulmonary cancer is to date one of the deadliest cancers. The cancerogenesis is characterized with a marked mutational profile, such as; the *EGFR* gene alterations, thus the development of the targeted therapies in particular, the tyrosine kinase inhibitors of the EGF receptor (TKI EGFR).

This work is a retrospective study which concerned 22 cases of a pulmonary adenocarcinoma, the activating mutations in the 18 and 20 exon of the *EGFR* gene were sought by real time PCR using the cobas kit " *EGFR* mutation test V2 ", this genotype presents a certain therapeutic interest. As a matter of fact, the individuals that were tested positive to the *EGFR* gene activating mutations, could benefit with an TKI-EGFR treatment. The demographic characteristics of the cohort were determined. The average age in the diagnosis was 64.4 years, the sex ratio man/woman was 2.16, histologically, we observed an heterogeneity of the tumour phenotype that was confirmed by the immunohistochemical profile of the adenocarcinoma. As for the mutational status of the *EGFR* gene, only 2 cases out of 22 that were positive for the localized mutations in the region extending from the 18 to the 20 exon. The distribution of these mutations in our cohort is relatively weak, an important and a larger staff expended over several regions would give us more informations on the prevalence and the distribution of this type of mutations. The TKI-EGFR therapeutic interest can be better appreciated.

Keywords

Lung adenocarcinoma, *EGFR* mutations, tyrosine kinase inhibitors, ITK resistance

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	TITRES	PAGES
Figure 1	Les principaux composants des voies de signalisation altérées dans les carcinomes broncho-pulmonaires.	5
Figure 2	Profil mutationnel des adénocarcinomes pulmonaires.	6
Figure 3	Implication de la mutation de KRAS dans la prolifération cellulaire incontrôlée et indépendante	7
Figure 4	Structure de l'Epidermal Growth Factor Receptor	9
Figure 5	Les différentes sensibilités aux EGFR-TKI selon les mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR dans les CBNPC	13
Figure 6	Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK-EGFR) et anticorps monoclonaux	15
Figure 7	Principe de la PCR utilisant la technologie Taq-man	24
Tableau I	L'ordre de répartition des différents réactifs sur la plaque PCR lors du cobas [®] EGFR Mutation Test v2	22
Tableau II	Interprétation des résultats post-analytiques du cobas [®] EGFR Mutation Test v2	25
Tableau III	Caractéristique épidémiologiques de la population étudiée	26
Tableau IV	L'aspect histologique de notre panel de patients	30

LISTE DES ABREVIATIONS

LISTE DES ABREVIATIONS

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques.

CBPC : Cancer bronchique à petites cellules.

CBNPC : cancer bronchique non à petites cellules.

ADN : Acide Désoxyribonucléique.

bCat : Bêta-Caténine.

EGFR: Epidermal growth factor receptor.

ITK : Inhibiteurs de tyrosine kinase.

ALK: Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase.

EML4: Echinoderm microtubule-associated protein-like 4.

RTK :Récepteurs tyrosine kinase.

ADAM: A desintegrin and metaloprotease.

HER (1-2-3-4): Human epidermal growth factor receptor (1-2-3-4).

EGF: Epidermal Growth Factor.

TGF- α : Tumor Growth Factor- α .

AREG : Amphiréguline.

EPG : Epigène.

MAPK:Mitogen-activated protein kinases.

PI3K :Phosphoinositide 3-kinase.

JAK:Janus Kinase.

STAT:Signal Transducer and Activators of Transcription.

ATP : adénosine triphosphate.

AMM : Autorisation de mise sur le marché.

LISTE DES ABREVIATIONS

FDA: Food and Drug Administration.

C.P.M.C: Centre Pierre et Marie Curie.

HE: Hématoxyline-éosine.

TTF1:Thyroid transcription factor-1.

PCR: Polymerase chain reaction.

RT-PCR: Real-time polymerase chain reaction.

DNA TLB:DNA Tissue Lysis Buffer.

PK: Proteinase K.

DNA PBB:DNA Paraffin Binding Buffer.

WB I: Wash Buffer I.

WB II: Wash Buffer II.

DNA EB:DNA Elution Buffer.

FT:Filter tubes with caps.

CT: Collection Tubes.

EGFR MMX-1, 2, 3:EGFR Master Mix 1, 2, 3.

MGAC:Magnesiumacetate.

EGFR MC:EGFR Mutant Control.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

INSP :Institut national de santé publique.

IASLC ATS/ERS:Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society and European Respiratory Society.

CK7:Cytokératine 7.

ACE:Carcinoembryonicantigene.

LISTE DES ABREVIATIONS

EMA: Epithelial membrane antigen.

SSP: Survie sans progression.

RO: Réponse objective.

PCNA: Antigen nucléaire prolifératif.

TABLE DES MATIERES

Remerciement et dédicaces	
Résumé (Français, arabe anglais)	
Mots clés	
Liste des abréviations	
Liste des figures et des tableaux	
Chapitre I : Introduction	1
Rappel bibliographique	
I. Généralité sur le cancer du poumon	2
I. 1. Classification histologique	3
I. 2. Cancérogenèse moléculaire broncho-pulmonaire	4
I. 3. Mutations associées au CBNPC/adénocarcinome pulmonaire	5
I. 3. 1. Mutation du gène <i>K-Ras</i>	6
I. 3. 2. Mutations du gène <i>EGFR</i>	7
I. 3. 3. Mutations des gènes <i>BRAF</i> et <i>ALK-EMLA</i>	7
I. 3. 4. Mutations du gène <i>TP53</i>	8
II. L'Epidermal Growth Factor Receptor	8
II. 1. Structure, fonction et régulation du gène et de la protéine	8
II. 2. Mutation du gène <i>EGFR</i> et adénocarcinome pulmonaire	11
II. 2. 1. Mutation du gène <i>EGFR</i> et thérapies ciblées	12
Chapitre II : Matériel et méthodes.	
I. Matériel	18
I. 1. Matériel non biologique	18
I. 2. Matériel biologique	18
II. Méthodes	18
II. 1. Recherche des mutations du gène <i>EGFR</i> par PCR en temps réel	19
II. 1. 1. Extraction de l'ADN	19
II. 1. 2. Quantification de l'ADN	21
II. 3. PCR en temps réel : Préparation, amplification/détection et interprétation	21
Préparation de la réaction RT-PCR	21
Amplification/détection	23
Interprétation	25

TABLE DES MATIERES

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Caractéristiques épidémiologique de la population étudiée	26
II. Caractéristiques anatomopathologiques	29
II.1. Profil histologique	29
II.2. Etude Immunohistochimique	31
III. Statut mutationnel de l'<i>EGFR</i>	32
Chapitre IV : Conclusion	35
Références Bibliographiques	36
Annexes	i

Introduction

La lutte contre le cancer constitue l'un des plus grands défis auxquels doivent faire face les institutions visant à protéger la santé publique au niveau national comme à l'international. Guidé par la communauté scientifique à la lumière des nouvelles découvertes et armé des nouvelles technologies, l'Homme n'a jamais été aussi investi dans ce combat qui l'oppose à cette maladie qui menace son intégrité physique depuis maintenant des centaines de milliers d'années.

Le cancer du poumon ou broncho-alvéolaire est de loin l'un des plus menaçants, car dès l'apparition des premiers symptômes, il est généralement à un stade avancé ce qui, dans la plupart des cas, laisse entrevoir des pronostics très péjoratifs. Ce cancer présente aussi une forte capacité métastatique vu que le poumon est un organe très vascularisé.

Le cancer broncho-alvéolaire est classé en 2 grands groupes : le cancer bronchique à petites cellules et non à petites cellules. Ce dernier est le plus fréquent et est principalement représenté par l'adénocarcinome pulmonaire. Il a été observé que les cellules constituant l'adénocarcinome détournent le mode de fonctionnement du récepteur EGFR vers une prolifération incontrôlée, et ce via la sélection positive de certaines mutations spécifiques de son gène. Ce phénomène a contribué au développement de thérapies ciblées à base de molécules inhibitrices de tyrosine kinases dites « ITK », qui peuvent ralentir le processus de progression tumorale sans altérer l'état générale du patient.

Cependant, ce type de traitement n'est compatible qu'avec des profils de patients présentant un statut mutationnel bien spécifique au niveau de leur gène *EGFR*. Un profilage moléculaire est indispensable avant toute prescription d'ITK, dans le traitement d'adénocarcinome pulmonaire.

C'est dans ce cadre que s'inscrit notre projet de fin d'étude. En effet, nous avons mené une étude rétrospective sur les mutations du gène *EGFR* dans les adénocarcinomes pulmonaires. Nous nous sommes fixés les objectifs suivants:

- ✓ Rapporter, analyser et discuter les données épidémiologiques, histologiques, immunohistochimiques et moléculaires relatives à la population étudiée.
- ✓ Étudier la distribution des mutations de l'EGFR dans cette population.
- ✓ Évaluer l'intérêt thérapeutique des ITK-EGFR sur l'adénocarcinome pulmonaire

Rappels bibliographiques

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Généralité sur le cancer du poumon

Le cancer broncho-alvéolaire est la pathologie maligne la plus répandue dans le monde, c'est la première cause de décès par cancer chez les hommes et la seconde après le cancer du sein chez les femmes. C'est une maladie liée à la prolifération incontrôlée et indépendante des cellules des différents tissus constituant le poumon. Non traitée, elle peut se propager sur d'autres tissus périphériques et finir par coloniser d'autres organes par métastases (Chater, 2014).

La majorité des cancers qui apparaissent dans le poumon sont appelés « cancers du poumon primaires ». Ce sont des carcinomes dérivés de cellules épithéliales. Les symptômes les plus courants sont : une toux (avec parfois une hémoptysie), la perte de poids et l'essoufflement après un moindre effort (Chater, 2014).

L'incidence du cancer broncho-alvéolaire a été estimée à 2,1 millions de nouveaux cas par an en 2018 (soit 22,5% du nombre total de cancers) avec une distribution de 1 368 524 millions d'hommes atteints et un pic de fréquence d'apparition entre 70 et 74ans, et 725 352 de femmes avec un plateau entre 50 et 80ans. En 2018. Le nombre de décès a été estimé à environ 1.8 millions, soit 86% du nombre d'incidence, c'est le cancer avec le taux de mortalité le plus élevé (GLOBOCAN, 2018).

Le cancer broncho-alvéolaire est plus présent dans les pays industrialisés notamment en Amérique du nord et en Europe centrale et de l'est. Il est par contre moins présent dans les pays en voie de développement comme en Afrique centrale et dans les zones dites « rurales » (Thiberville, 2004 ; Jemal et *al.*, 2008).

Selon le registre de l'INSP en 2017 le nombre de cas de cancers broncho-alvéolaires en Algérie était de 3835 cas, il est classé à la 3^{ème} place en terme d'incidence après le cancer du sein et le cancer colorectal.

80% à 90% des cancers broncho-pulmonaires sont liés au tabagisme qu'il soit passif ou actif. En effet, il existe plus de 70 substances chimiques cancérigènes dans la fumée de tabac (Ex : le goudron, l'arsenic...etc.). La consommation de cannabis est aussi incriminée. Néanmoins, 80% des fumeurs ne développent pas de cancers broncho-alvéolaires, ce qui suggère la présence de prédispositions génétiques comme facteur de risque. Des polymorphismes ou des mutations pathogènes ont été mis en évidence, dans les gènes dont les produits sont responsables du

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

métabolisme, de la détoxification et de l'élimination des substances cancérigènes présentes dans la fumée du tabac(Thiberville, 2004 ; Trédaniel *et al.*, 2006).

Les personnes ayant des maladies respiratoires ou des antécédents de maladies respiratoires comme une silicose, une béryllose (causée par l'inhalation de poussières ou vapeurs de béryllium) ou une tuberculose, sont plus exposées au risque de développer un cancer du poumon que le reste de la population. (Brennan *et al.*, 2011). Il existe aussi des facteurs dits « professionnels » liés à l'exposition aux rayonnements ou aux substances cancérigènes comme l'amiante, le radon, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou la silice (Thiberville, 2004).L'inhalation à répétition et à long terme d'air pollué en intérieur (fumée de feu de bois ou de charbon) et en extérieur (gaz d'échappement de moteurs Diesel), sont aussi incriminés dans la survenue du cancer du poumon (Trédaniel *et al.*, 2017).

I. 1. Classification histologique

La classification histologique du cancer du poumon distingue deux grands groupes :

➤ **Cancer bronchique à petites cellules :**

Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC) représente environ 15% du nombre de cancers du poumon. Il se développe majoritairement chez les fumeurs sans distinction d'âge et se différencie des autres types de cancers du poumon par : i) son origine neuroendocrine, ii) un taux de doublement très rapide (en 30jours) ainsi qu'un pouvoir métastatique très important et iii) une grande sensibilité à la radiothérapie et à la chimiothérapie mais toujours avec un risque important de récurrence après rémission (Chater, 2014).

➤ **Cancer bronchique non à petites cellules**

Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)représente environ 80% du nombre de cancers du poumon et regroupe (Mansuet-Lupo, 2018) :

- Les carcinomes à grandes cellules (10 à 15%).
- Les carcinomes épidermoïdes (25 à 30%).
- Les adénocarcinomes (40 à 50%).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

L'incidence des adénocarcinomes pulmonaires ne fait qu'augmenter notamment chez la femme. C'est la forme de cancer du poumon prédominante chez les non-fumeurs, les ex-fumeurs et les personnes de moins de 50 ans (Ramalingam et *al.*, 1998). Ils peuvent être i) de bas grade, ii) de grade intermédiaire ou iii) de haut grade (Mansuet-Lupo, 2018). Ces tumeurs sont très hétérogènes sur le plan clinique, radiologique, histologique, pronostique et thérapeutique.

I. 2. Cancérogenèse moléculaire broncho-pulmonaire

Les cancers en général et les broncho-pulmonaires en particulier, se développent selon un processus multi-étapes. L'acquisition d'altérations génétiques d'une ou d'un petit nombre de cellules, confère à ces dernières un avantage prolifératif et permet l'évolution vers le phénotype invasif. De nombreux agents cancérogènes professionnels ou environnementaux, comme ceux présents dans la fumée du tabac, peuvent induire l'initiation de la transformation des cellules bronchiques ou alvéolaires et favoriser leur progression. L'arbre broncho-pulmonaire est alors affecté dans son ensemble. (Hanahan et Weinberg, 2000).

Les carcinomes broncho-pulmonaires acquièrent au cours de leur développement une variété d'altérations génétiques (mutations, amplifications géniques, pertes d'allèles, instabilités chromosomiques) et épigénétiques (surexpression des gènes, extinction de l'expression par hyperméthylation des promoteurs) (Yokota et Kohno, 2004). La fréquence et le type des altérations diffèrent d'une histologie à l'autre. Cependant, quel que soit le type histologique, les mêmes voies sont souvent affectées, mais par des mécanismes différents du fait d'altérations diverses. Ces voies définissent un « carrefour régulateur » qui intègre prolifération, apoptose, différenciation et réponses aux lésions de l'ADN. La plasticité histologique de l'épithélium broncho-pulmonaire et le poids particulier des facteurs de risque environnementaux, font la particularité des carcinomes broncho-pulmonaires vis à vis de cette transformation cellulaire. (Figure 1).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

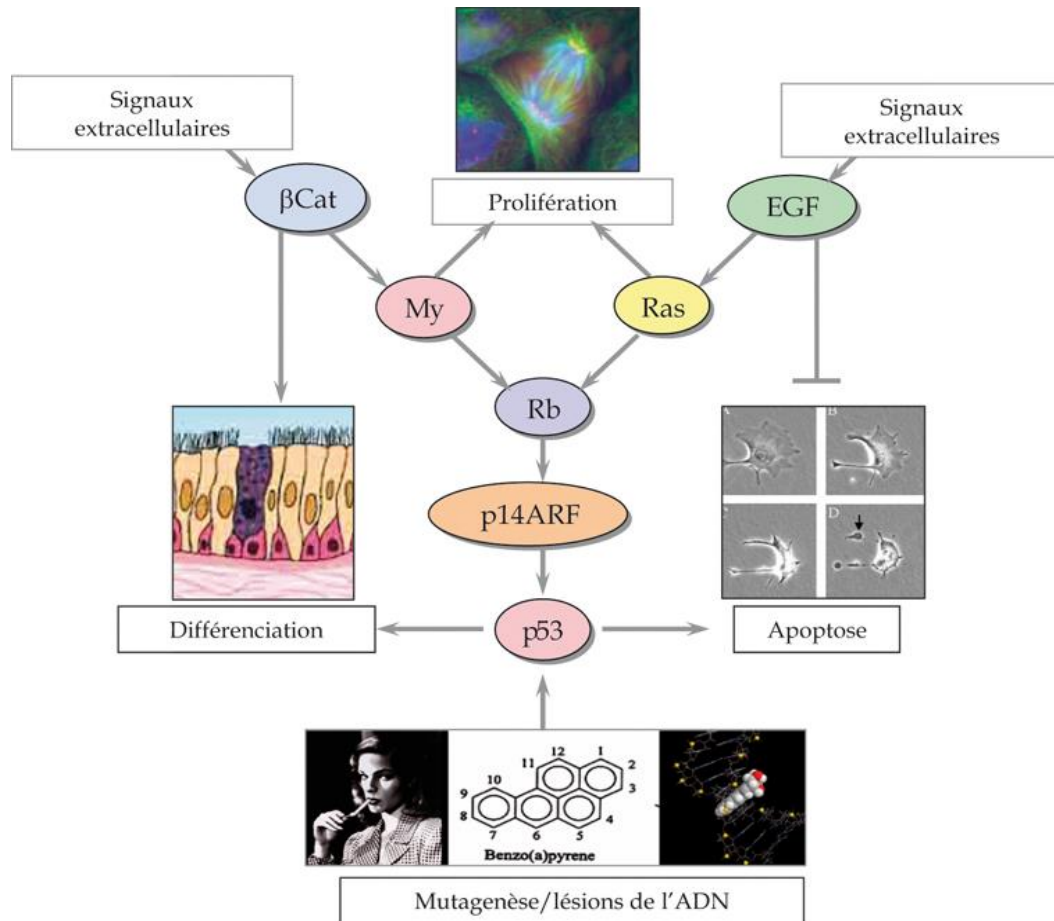


Figure 1 : Les principaux composants des voies de signalisation altérées dans les carcinomes broncho-pulmonaires sont représentés. Ces facteurs coopèrent les uns avec les autres pour réguler quatre grands processus biologiques : la prolifération cellulaire, l'apoptose, la différenciation (et la sénescence), et la réponse aux mutagènes (lésions de l'ADN). Ce modèle met en évidence le rôle de deux voies de signalisation, la voie EGFR/Ras et la voie Bêta-Caténine (bCat)/Myc. Il montre aussi le rôle intégrateur de p53, au carrefour des voies de prolifération, d'apoptose, de différenciation et de réponse aux mutagènes. Les mutations fréquentes dans les carcinomes broncho-pulmonaires contribuent à découpler ces différentes voies les unes des autres, facilitant la prolifération et la survie cellulaire, particulièrement dans les tissus exposés à des agents cancérigènes environnementaux (tels que ceux présents dans la fumée du tabac).

I. 3. Mutations associées au CBNPC/adénocarcinome pulmonaire

Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans l'adénocarcinome pulmonaire sont mentionnées dans la **figure 2**. Ces mutations sont généralement activatrices et mutuellement exclusives.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

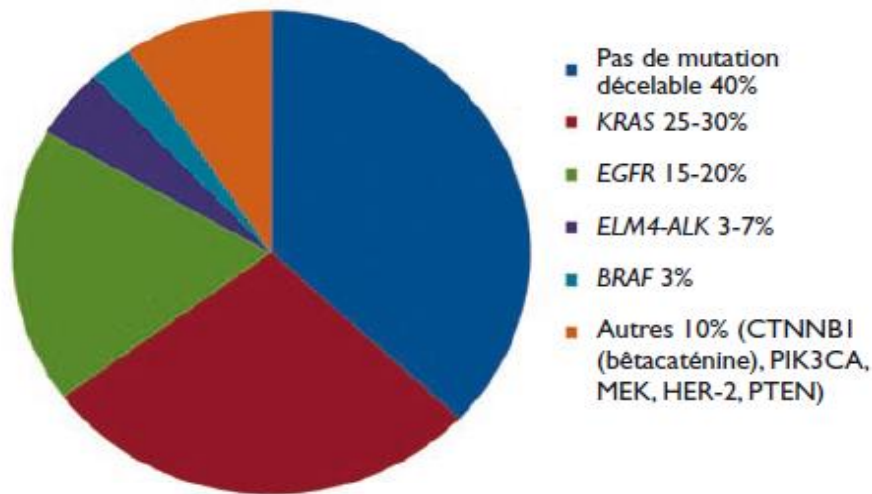


Figure 2 : Profil mutationnel des adénocarcinomes pulmonaires (Pusztaszeri et *al.*, 2011)

I. 3. 1. Mutations du gène *K-Ras*

Dans les cancers broncho-pulmonaires, 90 % des mutations affectent le gène *KRAS*. Elles sont presque systématiquement localisées au codon 12. Cette mutation est détectable dans 20 à 30 % des adénocarcinomes bronchiques. En cas de mutations, la protéine Ras reste bloquée dans sa configuration active rendant la propagation du signal intracellulaire constitutif et totalement indépendante de l'EGFR et ses ligands. Les cellules cancéreuses ayant acquis cette mutation présentent une résistance à la thérapie ciblée à base d'inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR (**Figure 3**) (Pao et *al.*, 2005 ; Linardou, 2008).

Le type moléculaire des mutations au codon 12 de *KRAS* diffère en fonction de l'histoire tabagique du patient. Les mutations ponctuelle par substitution de G vers T dominent chez les fumeurs, alors que les mutations G vers A sont plus fréquentes chez les non-fumeurs. De plus, les mutations de *KRAS* semblent prédominer dans les ADC des fumeurs et des ex-fumeurs. Cette observation suggère que les mêmes voies de signalisation pro-oncogéniques peuvent être activées de façon différente en fonction de l'étiologie et de l'histoire naturelle du cancer (Le Calvez et *al.*, 2005).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

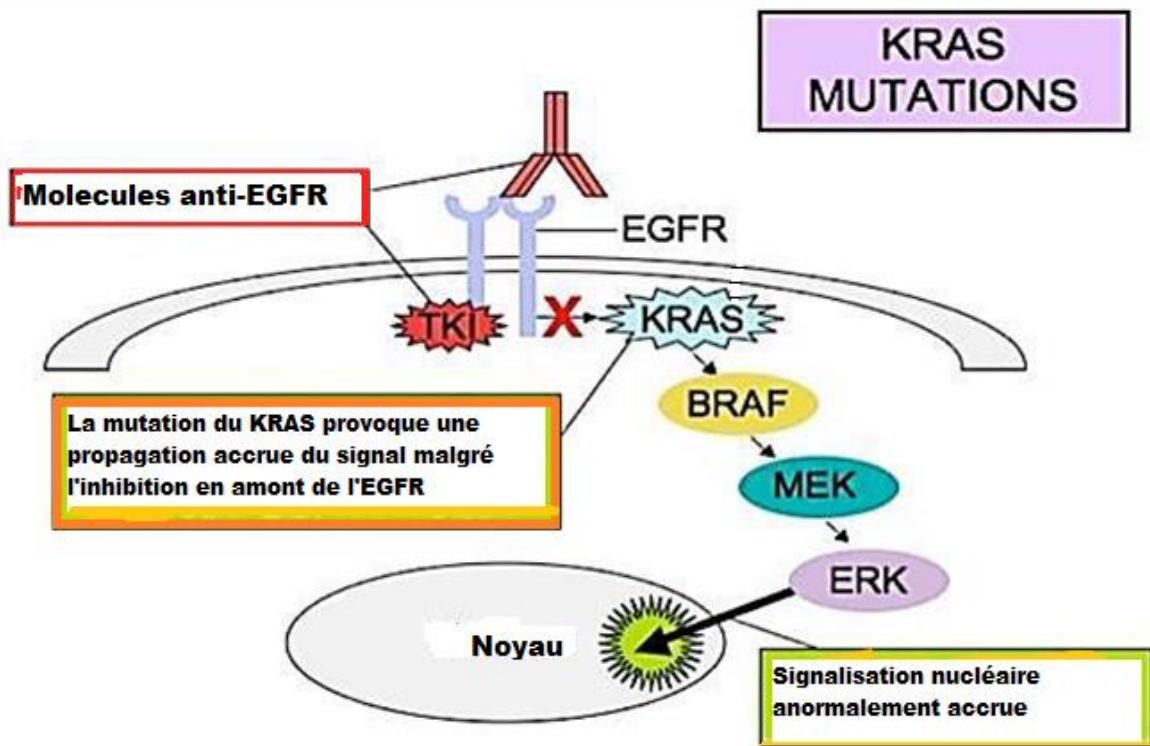


Figure 3 : Implication de la mutation de KRAS dans la prolifération cellulaire incontrôlée et indépendante. (Affiliated pathologist medical group, 2016).

I. 3. 2. Mutations du gène *EGFR*

Les mutations du gène *EGFR* sont présentes dans environ 10% des CBNPC. Elles sont plus fréquentes dans les adénocarcinomes (15-20%), en particulier chez les patients de sexe féminin, non-fumeurs et d'origine asiatique (environ 40-50%). Il s'agit majoritairement de mutations dans les exons 18 à 21 avec, dans 90% des cas, des délétions de l'exon 19 (associées à 70-100% de réponses aux TKI) ou des mutations ponctuelles dans l'exon 21 (associées à 20-70% de réponses aux TKI) (Ding et al., 2008 ; Smouse et al., 2009 ; Paik et al., 2011).

I. 3. 3. Mutations des gènes *BRAF* et *ALK-EMLA*

Les mutations du gène *BRAF* (par exemple : V600E), codant pour une kinase située immédiatement en aval de la protéine KRAS dans la voie de signalisation, se retrouvent dans

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

environ 3% des adénocarcinomes avec *EGFR* et *KRAS* non mutés. Ces mutations sont aussi associées à une résistance aux anti-EGFR (Shaw et *al.*, 2009 ; Paik et *al.*, 2011)

Le gène de fusion *ALK-EML4* (Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase-Echinoderm microtubule-associated protein-like 4) sur le chromosome 2p est présent dans environ 37% des adénocarcinomes. Ces cancers ne répondant pas non plus aux TKI (Ganti et *al.*, 2010 ; Cagle et *al.*, 2011).

I. 2. 4. Mutations du gène *TP53*

La protéine codée par le gène *TP53* occupe, chez l'homme, une position centrale dans le « carrefour de régulation » décrit plus haut. En effet, son rôle de « capteur » des modifications environnementales en fait un acteur de premier plan dans la régulation de la stabilité génétique et tissulaire de l'épithélium broncho-pulmonaire. Les mutations de *TP53* sont essentiellement des substitutions faux-sens qui inactivent la protéine en empêchant son repliement dans une conformation active (Pfeifer et *al.*, 2002). Des mutations de *TP53* ont été observées dans plus de 50 % des CBNPC. Les données disponibles indiquent que ces mutations sont plus fréquentes dans les CBNPC associés au tabagisme que dans les CBNPC des non-fumeurs. Les mutations de type transversion sont plus fréquentes dans le cancer pulmonaire associé au tabagisme, alors que chez les non-fumeurs, c'est plutôt les mutations de type transitions (Calvez et *al.*, 2005 ; Hadoux, 2011).

II. L'Epidermal Growth Factor Receptor

II. 1. Structure, fonction et régulation du gène et de la protéine

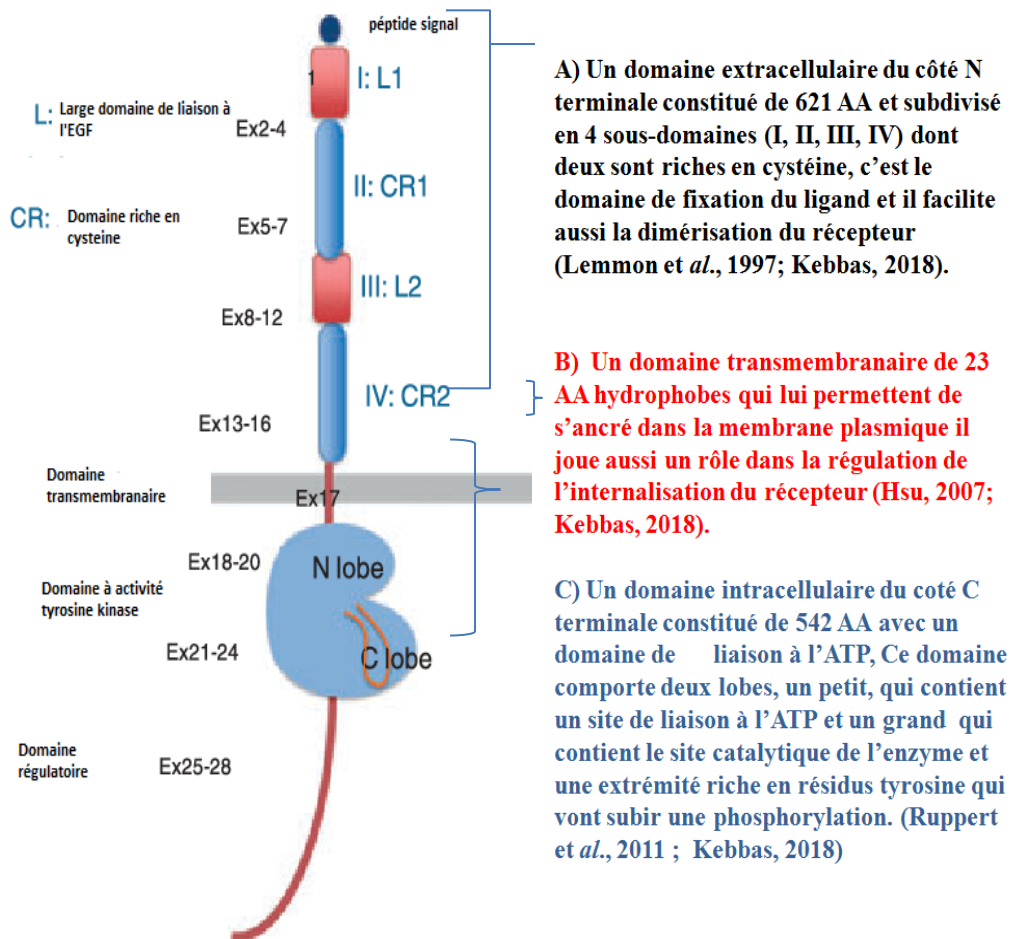
L'Epidermal Growth Factor Receptor ou EGFR (aussi appelé ErbB1 ou HER1) est une glycoprotéine transmembranaire de la famille RTK « Récepteurs tyrosine kinase », de 170 kDa (Sato et *al.*, 1983 ; Kebbas, 2018). Le gène *EGFR* localisé en 7p12.13 est composé de 28 exons (200 kb). La protéine est constituée de 3 domaines comme nous pouvons le voir dans la **figure 4**.

Les ligands de l'*EGFR* sont transmembranaires dans leur forme inactive, ils doivent donc subir un clivage protéolytique de leur partie extracellulaire par les ADAM (A desintegrin and metalloprotease) pour ainsi libérer le facteur de croissance soluble (autocrine, paracrine

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

oujuxtacrine) qui se liera au récepteur (Cours du Dr. Kebbas, 2018). 4 ligands sont spécifiques à l'EGFR : i) l'Epidermal Growth Factor (EGF), ii) le Tumor Growth Factor- α (TGF- α), iii) L'amphiréguline (AREG) et iv) L'épigène (EPG).

Après liaison de son ligand, l'EGFR se dimérise pour former un homodimère ou un hétérodimère ce qui conduit à son autophosphorylation sur les résidus Tyrosine de sa partie intracellulaire du côté C terminale. L'augmentation de l'activité tyrosine kinase d'un monomère peut permettre une transphosphorylation avec l'autre monomère (activation allostérique de l'EGFR). Une fois le récepteur activé, la première protéine de signalisation intracellulaire peut s'y lier par le biais de protéines adaptatrices, c'est là que commence la transduction intracellulaire du signal de survie et de prolifération (Ruppert, 2011 ; Cours du Dr. Kebbas, 2018).



A) Un domaine extracellulaire du côté N terminale constitué de 621 AA et subdivisé en 4 sous-domaines (I, II, III, IV) dont deux sont riches en cystéine, c'est le domaine de fixation du ligand et il facilite aussi la dimérisation du récepteur (Lemmon et *al.*, 1997; Kebbas, 2018).

B) Un domaine transmembranaire de 23 AA hydrophobes qui lui permettent de s'ancrer dans la membrane plasmique il joue aussi un rôle dans la régulation de l'internalisation du récepteur (Hsu, 2007; Kebbas, 2018).

C) Un domaine intracellulaire du côté C terminale constitué de 542 AA avec un domaine de liaison à l'ATP, Ce domaine comporte deux lobes, un petit, qui contient un site de liaison à l'ATP et un grand qui contient le site catalytique de l'enzyme et une extrémité riche en résidus tyrosine qui vont subir une phosphorylation. (Ruppert et *al.*, 2011 ; Kebbas, 2018)

Figure 4 : Structure de l'Epidermal Growth Factor receptor (Rupert et *al.*, 2011)

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

L'EGFR active diverses voies de signalisation à l'origine de différentes réponses cellulaires et physiologiques. Les principales voies induites par l'EGFR sont :

- ✓ La voie des MAPK (Mitogen-activated protein kinases) (ras/raf/MEK/MAPK) : qui aboutit au contrôle de l'expression de protéines impliquées dans la différenciation et la prolifération cellulaire.
- ✓ La voie PI3K (Phosphoinositide 3-kinase.) /AKT (PI3K/AKT/mTOR) : qui est principalement impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire mais aussi dans la glycogénolyse et la migration cellulaire.
- ✓ La voie des JAK (Janus Kinase)/STAT (Signal Transducer and Activators of Transcription): qui active la transcription de gènes cibles impliqués dans l'angiogenèse, la survie et la prolifération cellulaire (Ozenne, 2011).

Le choix d'une voie de signalisation plutôt qu'une autre dans le vaste réseau des voies de signalisations intracellulaires lié à l'EGFR est modulé en fonction du type de dimère formé :

- ✓ Un homodimère EGFR-EGFR induit une prolifération faible et active préférentiellement la voie des MAPK.
- ✓ Les hétérodimères comprenant HER2 ou HER3, comme par exemple EGFR-HER2 et HER2-HER3 induisent une prolifération plus élevée. Ces hétérodimères activent préférentiellement les voies JAK/STAT et PI3K/Akt également impliquées dans l'inhibition de l'apoptose (Wissler, 2012).

L'arrêt du signal induit par l'EGFR activé se fait *via* deux mécanismes :

- ✓ La déphosphorylation des résidus tyrosine du récepteur par des protéines tyrosine phosphatase (PTP).
- ✓ L'internalisation du récepteur par endocytose après liaison de ce dernier à son ligand et changement de conformation de sa partie régulatrice en C-terminal. Le récepteur est ensuite soit désensibilisé (séparé de son ligand) puis recyclé à la surface de la membrane, soit transféré vers des lysosomes où il sera dégradé.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

En empêchant le signal de perdurer, ces deux phénomènes sont des mécanismes de régulation, fine, de la signalisation intracellulaire EGFR dépendante (Wang *et al.*, 1999 ; Zhang *et al.*, 2002 ; Sarkin *et al.*, 2008).

On peut observer une forte expression de l'EGFR dans les cellules épithéliales bronchiques tandis que l'expression est modérée dans les cellules épithéliales alvéolaires (Carlson *et al.*, 2009). (Sekido *et al.*, 1998). La transcription du gène *EGFR* est régulée par une variation de séquence dans l'intron 1. En effet, la variation du nombre de dinucléotides CA (entre 14 et 21 CA) dans cet intron module le niveau d'expression de l'ARNm de l'*EGFR* (Brandt *et al.*, 2006). *In vitro*, si le nombre de dinucléotide CA augmente, le taux de transcription du gène *EGFR* diminue (L'inverse est vrai). L'effet constaté sur la transcription *in vitro* se traduit sur l'expression protéique observée *in vivo* (Wissler, 2012).

II. 2. Mutation du gène *EGFR* et adénocarcinome pulmonaire

Les mutations qui touchent le gène *EGFR* sont généralement retrouvées au sein des exons 18 à 21 codant le domaine tyrosine kinase du récepteur (Ruppert, 2011). Elles se situent au niveau du site de fixation de l'ATP (adénosine triphosphate) qui est aussi le site de fixation de l'ITK-EGFR. Les mutations de l'*EGFR* sont retrouvées chez environ 10 % des CBNPC métastatiques dans la population caucasienne et 30 % dans la population asiatique (Cadranel *et al.*, 2013).

L'activation anormale de l'EGFR peut être due à l'augmentation du nombre de copies du gène, à la surexpression de la protéine ou encore à la présence, dans le gène, de mutations somatiques affectant le domaine tyrosine kinase (Gazzeri, 2011). En effet, le gène *EGFR* est souvent la cible d'aberration chromosomique dans le CBNPC (Testa et Siegfried *et al.*, 1992). Le nombre de copies du gène *EGFR* est alors augmenté généralement par polysomie ou amplification génétique dans 32% à 42% des adénocarcinomes (Cappuzzo *et al.*, 2005 ; Liang *et al.*, 2010). Cette augmentation est observée chez les patients non-fumeurs (Jeon *et al.*, 2006 ; Liang *et al.*, 2010).

Les altérations touchant le domaine tyrosine kinase peuvent être classiques ou rares. Les mutations classiques représentent 85% des mutations. Nous retrouvons les délétions dans l'exon 19 des codons 746 à 750 sans perte du cadre de lecture, aboutissant à la perte du motif LREA très conservé chez les vertébrés (Gazzeri, 2011), et la mutation ponctuelle au niveau du codon

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

858 dans l'exon 21, qui substitue une arginine par une leucine (L858R) (Shigematsuet *al.*, 2006 ; Sequistet *al.*, 2007). Les délétions de l'exon 19 sont plus fréquentes que les mutations L858R (Cadranet *etal.*,2013).

Il y a 3 types de mutations rares de l'EGFR : i) Duplications/insertions au niveau de l'exon 20, ii) Mutation ponctuelle G719X dans l'exon 18, et iii) substitution L861Q dans l'exon 21. Des mutations très rares ont aussi été décrites (< 1 %) comme la substitution T790M de l'exon 20 (Beau- Falleret *al.*, 2013 ; Cadranet *et al.*, 2013).

Les mutations dites « complexes » (3-7 %) correspondent à des doubles mutations de l'*EGFR*. Elles peuvent associer soit deux mutations classiques (del19 et L858R), soit une mutation classique avec une mutation plus rare, voire très rare, soit deux mutations rares ou très rares (Beau-Falleret *al.*, 2013 ; Cadranet *et al.*, 2013). Lorsqu'elle n'est pas germinale et donc associée à des cas familiaux de cancers, la mutation T790M est la plus souvent observée dans le cadre de mutations complexes (Cadranet *et al.*,2013). Elle se caractérise par un remplacement d'une thréonine par une méthionine au niveau du codant 790 (Ruppert *et al.*, 2011). L'ensemble de ces mutations sont représentées dans la **figure 5**.

II. 2. 1. Mutation du gène *EGFR* et thérapies ciblées

La chimiothérapie classique est caractérisée par son manque de sélectivité, altérant à la fois les cellules tumorales et les cellules saines, entraînant ainsi de nombreux effets indésirables, parfois limitants pour la poursuite du traitement. Le niveau de connaissance du processus tumoral est tel actuellement, que de nouvelles "cibles" thérapeutiques ont été identifiées (oncogènes, antigènes de surfaces, facteurs de croissance, pro-angiogéniques ou de régulation de l'immunité antitumorale). C'est ainsi qu'ont été développées les premières thérapies ciblées à la fin des années 1990. Actuellement, plus de trente molécules anticancéreuses sont des thérapies ciblées, soit environ un tiers de l'ensemble des anticancéreux. Les stratégies ciblées anticancéreuse peuvent consister en un ciblage (Faure, 2015) :

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

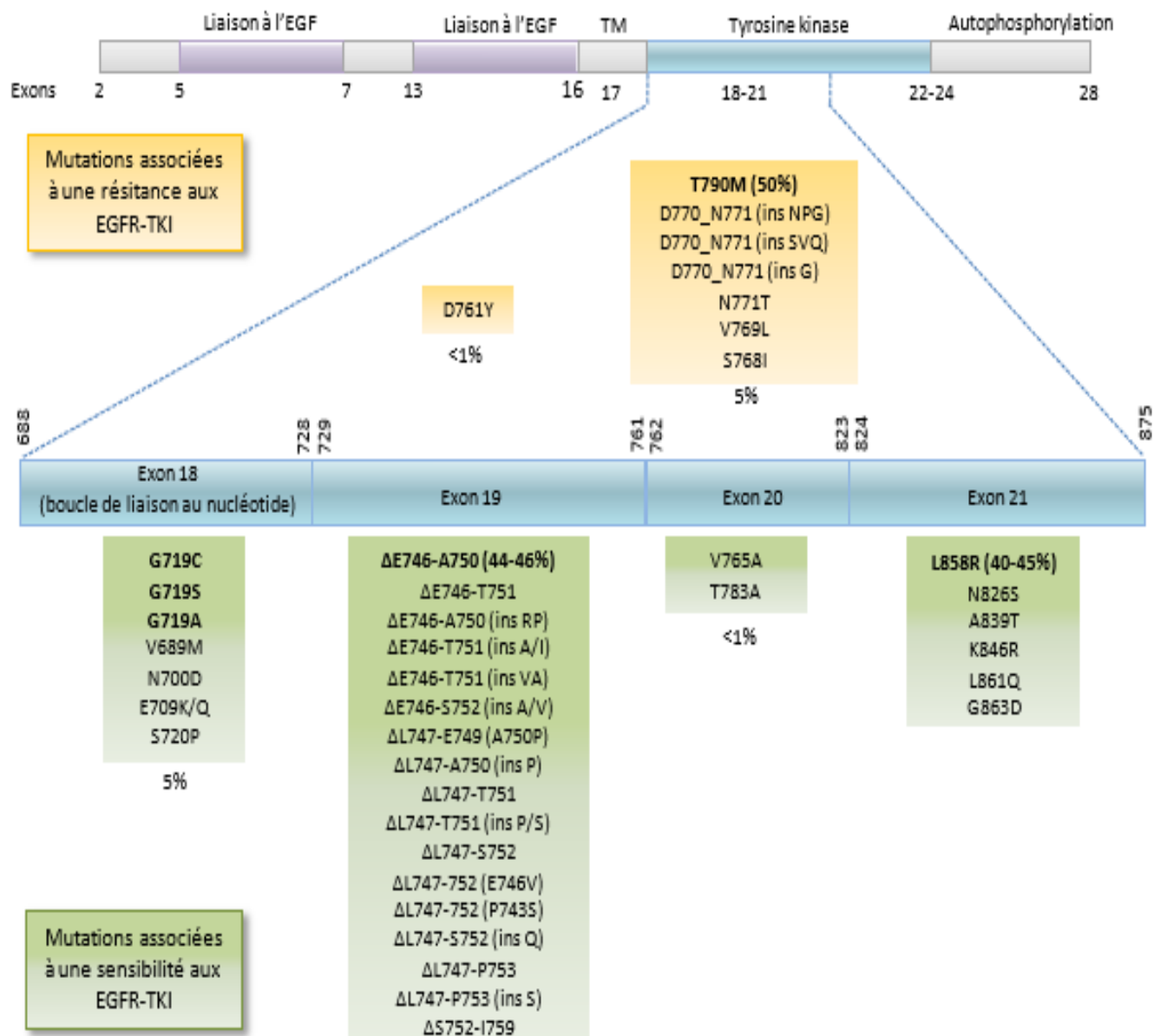


Figure 5 : Les différentes sensibilités aux EGFR-TKI selon les mutations du domaine tyrosine kinase de l'EGFR dans les CBNPC (Sharma *et al.*, 2007).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

- Extracellulaire par blocage d'un ligand ou du domaine extracellulaire d'un récepteur, ou encore par reconnaissance d'un antigène de surface. Ce ciblage est possible à l'aide d'un anticorps monoclonal, qui ne pénètre pas à l'intérieur de la cellule (Immunothérapie).
- Intracellulaire par blocage compétitif d'un site kinase adénosine-5'-triphosphate (ATP)-dépendant par une petite molécule d'origine chimique, dite « inhibitrice kinase ».

Les thérapies ciblées anticancéreuses peuvent être classées en fonction des cibles considérées dont certaines sont exprimées par les cellules cancéreuses elles-mêmes. Il peut s'agir de (Faure, 2015).

- Récepteurs membranaires (par exemple, EGFR),
- Kinases intracellulaires (BCR-ABL, B-Raf, ou encore mTOR),
- Antigènes de surface (dont le CD20).

La plupart jouent un rôle majeur dans la prolifération, l'invasion et la survie des cellules tumorales.

Concernant l'EGFR, deux cibles principales ont conduit au développement des anti-EGFR selon deux stratégies : inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) à action intracellulaire ou anticorps monoclonaux à action extracellulaire (**Figure 6**) (ITK + Anticorps monoclonaux) (Faure, 2015). Dans le cas des CBNPC, les principales molécules à action ciblée sont les ITK-EGFR (Inhibiteurs Tyrosine Kinase EGFR).

La famille des ITK est composée de petites molécules pharmacologiques activent oralement et utilisées pour traiter différentes pathologies tumorales (Barker et *al.*, 2001; Wakeling et *al.*, 2002). Parmi les pharmacophores qui ont été identifiés en développant les ITK, la classe des anilquinazolines, qui est la plus utilisée dans les essais cliniques. Le noyau quinazoline entre en compétition avec l'ATP et se fixe d'une manière réversible ou irréversible sur le site de fixation de l'ATP sur le récepteur EGFR. Ce dernier ne peut plus recevoir des groupements phosphate venant de l'ATP, ce qui inhibe son activité tyrosine kinase. Par conséquent, toutes les voies de signalisation, de survie et de prolifération cellulaires sont bloquées (Ozenne, 2011).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

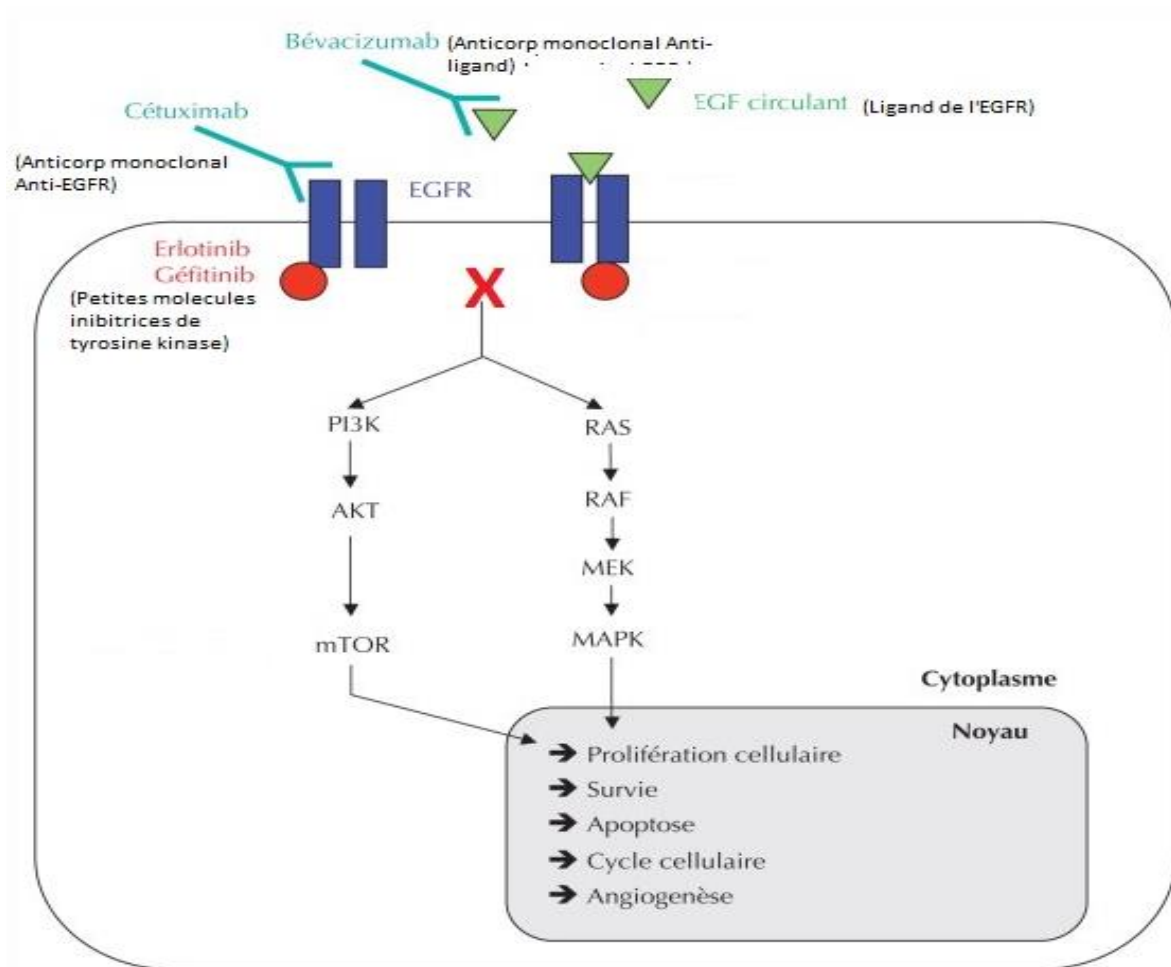


Figure 6 : Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK-EGFR) et anticorps monoclonaux (Geiss et *al.*, 2014).

Différentes molécules thérapeutiques sont utilisées dans le traitement ciblé des CBNPC. Certaines d'entre elles ont une autorisation de mise sur le marché ou « AMM ». Parmi ces molécules nous citons :

➤ **Géfitinib** (IRESSA® ZD 1839)

C'est le premier **ITK-EGFR** à avoir été développé, il est administré par voie orale. Le Géfitinib est un anilinoquinazoline dérivé quinazoline qui inhibe de façon réversible et sélective

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

l'activité tyrosine kinase de l'*EGFR*. Les patients qui ont montré une réponse positive contre le gefitinib ont comme type de mutations del19 et la mutation de substitutions de l'exon21 (L858R). Seulement un nombre limité des patients ont été sensibles au gefitinib ; après cette constatation la FDA (Food and Drug Administration) a retiré son approbation pour les traitements du CBNPC (Kannaiyan et Mahadevan, 2018).

➤ **Erlotinib**

C'est un autre **ITK-EGFR** de première génération, il a été initialement approuvé pour le traitement du CBNPC localement avancé ou métastatique. L'Erlotinib (OSI-774, TARCEVA®, Laboratoires Roche®) est un dérivé quinazoline de faible poids moléculaire qui inhibe de façon réversible et sélective l'activité tyrosine kinase de l'*EGFR*, en entrant en compétition avec l'ATP au niveau du site catalytique de l'*EGFR* (Thomas, 2007).

Actuellement l'erlotinib est approuvé comme traitement de première ligne chez des patients présentant des mutations de types del19 ou mutations de substitution de l'exon 21 (L858R). On l'utilise aussi comme deuxième ou troisième ligne pour les patients qui ont échoué certaines chimiothérapies.

➤ **Afatinib**

C'est un **ITK-EGFR** de deuxième génération administré par voie orale. Ce n'est pas, uniquement, un inhibiteur d'HER2 mais aussi d'HER3 et HER4 (inhibiteur irréversible). L'afatinib (Gilotrif™, Giotrif®) inhibe de façon réversible et sélective l'activité tyrosine kinase de l'*EGFR*, en entrant en compétition avec l'ATP au niveau de son site catalytique (Keating, 2014 ; Kannaiyan et Mahadevan, 2018)

➤ **Osimertinib**

Les patients avec CBNPC finissent par développer des résistances contre les **ITK-EGFR** de première et seconde génération, dues à des mutations secondaires *EGFR* T790M dans 60% des patients. Ceci qui a mené au développement des **ITK-EGFR** de troisième génération. L'osimertinib (TAGRISSO, AstraZeneca Pharmaceuticals) a été approuvé par la **FDA** en 2015 pour les patients avec le CBNPC dont le test de mutation T790M est positif (Kannaiyan et Mahadevan, 2018).

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

Ces molécules inhibitrices de tyrosines kinase ont toutes été développées dans le cadre de la lutte contre le cancer broncho-alvéolaire et ce, en bloquant l'activité exacerbée des récepteurs EGFR et donc des voies de signalisation en aval. L'avantage de cette thérapie ciblée à base d'ITK est qu'elle a un effet inhibiteur de croissance visant uniquement les cellules tumorales épargnant au patient toutes les contraintes liées à la chimiothérapie. Mais pour que ce traitement soit efficace il est impératif que le génome du patient contienne certaines mutations très spécifiques et très localisées, c'est pour cela qu'avant toute prescription de traitement à base d'ITK, des analyses moléculaires (séquençage ou RT-PCR) doivent être effectuées pour déterminer le statut mutationnel de son gène *EGFR* pour voir si oui ou non il est réceptif à ce type de traitement.

Materiel et méthodes

MATERIEL ET METHODES

Notre travail a été réalisé au sein du service d'anatomopathologie du Centre Pierre et Marie Curie (C.P.M.C) à Alger. Notre étude est une analyse rétrospective du statut mutationnel du gène *EGFR*, dans le cas d'adénocarcinomes pulmonaires de patients algériens. Cette étude présente un intérêt thérapeutique orientant le clinicien vers un traitement mieux adapté au profil génétique de l'individu.

Notre travail s'est déroulé durant la période Février 2020 à Mars 2020. La survenue de la pandémie au SARS-Cov2 et l'expansion de la COVID-19, situation exacerbée par le confinement total de plusieurs wilaya, notamment Alger et Blida, nous a malheureusement contraint à écourter notre stage de fin d'étude.

I. Matériel

I. 1. Matériel non biologique

L'ensemble de l'appareillage, des réactifs et les solutions utilisés pour obtenir le statut mutationnel du gène *EGFR* est rapporté dans les annexes

I. 2. Matériel biologique

Le matériel biologique utilisé correspondait à 22 biopsies pulmonaires, incluses dans de la paraffine. Il s'agissait de blocs communiqués au service d'anatomopathologie du CPMC pour analyse moléculaire.

II. Méthodes

Etant des blocs communiqués, l'analyse histologique et immunohistochimique a été réalisée dans des laboratoires externes. Les résultats sont mentionnés dans la fiche de renseignements accompagnant ces blocs. Les protocoles permettant l'obtention des blocs paraffinés, la coloration Hématoxyline éosine ainsi que l'immunohistochimie sont détaillés dans les annexes. Seule l'analyse moléculaire est réalisée au laboratoire de biologie moléculaire du service d'anatomopathologie du CPMC.

MATERIEL ET METHODES

II. 1. Recherche des mutations du gène *EGFR* par PCR en temps réel

Le statut mutationnel du gène *EGFR* a été obtenu par le Cobas® *EGFR* mutation test V2, une PCR en temps réel (RT-PCR) utilisant la technologie Taq-Man et commercialisée par la société Roche.

La PCR en temps réel, repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent au cours de la réaction d'amplification. Le signal fluorescent étant directement proportionnel à la quantité de produits de PCR générés. En mesurant l'intensité de fluorescence émise à chaque cycle, il est possible de suivre la formation des produits de PCR pendant la phase exponentielle (phase au cours de laquelle la quantité de produits amplifiés est en corrélation directe avec la quantité initiale de matrice).

Les produits d'amplification sont détectés selon le principe d'un marquage spécifique du produit de PCR à l'aide d'une ou de deux sonde(s) fluorescente(s) "Sondes Taq-Man ou balises moléculaires". Le test Cobas® *EGFR* mutation test V2 se fait en deux grandes étapes:

- ✓ Extraction et préparation manuelle pour obtenir de l'ADN à partir des échantillons.
- ✓ Amplification par PCR de l'ADN cible à l'aide d'amorces spécifiques complémentaires et des sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores différents.

II. 1. 1. Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir de tissus paraffinés, après avoir été coupés en sections de 1 à 5µm, à partir des blocs paraffinés. Les coupes obtenues sont mises dans des tubes.

La première étape consiste à déparaffiner les tissus, en ajoutant 500 µl de Xylène dans les tubes Safe-Lock, préalablement préparés et étiquetés, avant de vortexer le tout pendant 30sec. Les tubes sont ensuite incubés pendant 5min à température ambiante, puis centrifugés 14000 rpm (14000 tour par minute) durant 1min. puis jeter le surnageant. Rajouter 500 µl d'éthanol absolu, vortexer pendant 30secondes, incubé (5min) puis effectuer une centrifugation (1min) et jeter le surnageant. L'élimination de l'excédent de paraffine se fait en incubant les tubes pendant 10minutes à 56°C (cela permet aussi de faire évaporer l'alcool).

MATERIEL ET METHODES

La deuxième étape consiste en une lyse cellulaire et une élimination des protéines. En effet, le tampon de lyse rompt les membranes cellulaires et libère le contenu cytoplasmique et nucléaire, puis les protéines sont dégradées par la protéinase K. Les échantillons sont transférés dans un tube Safe-Lock de 1.5 µl, auxquels on y ajoute 180 µl de solution tampon lyse de tissu d'ADN DNA TLB (Tissue Lysis Buffer). 70 µl de Protéinase K sont ensuite ajoutés puis vortexer 30sec.

Les échantillons sont incubés une première fois pendant 1heure à 56°C puis une deuxième fois pendant 1h30 à 90°C tout en vortexant entre chaque incubation.

Après incubation, 200µl de tampon de liaison de l'ADN en paraffine DNA PBB (Paraffin Binding Buffer) sont ajoutés aux échantillons. Il faut bien mélanger au vortex pendant 30sec avant d'incuber à 56°C pendant 10 min.

La troisième étape consiste en une purification de l'ADN. Pour ce faire, il faut ajouter 100 µl d'Isopropanol. Le lysat (ADN+ débris cellulaires) est transféré dans une unité FT/CT(tube de filtration avec bouchon/ tube de prélèvement respectivement), puis centrifuger pendant 1min (Figure 11). Les débris cellulaires sont éliminés en plaçant chaque FT sur un nouveau CT, le contenu de l'ancien CT est éliminé à chaque fois. 500µl de Tampon de lavage I de l'ADN WBI (Wash Buffer I)sont ajoutés au FT, puis une centrifuge de l'unité FT/CT est réalisée à 14000 rpm pendant 1 min.

Le FT est remplacé sur le même CT et on y ajoute 500µl de Tampon de lavage II de l'ADN WBII (DNA Wash Buffer II) actif, puis le tout est centrifugé à 14000 rpm pendant 01 minute. Encore une fois, le contenu du CT est éliminé.

La quatrième et dernière étape consiste à éluer l'ADN. Pour ce faire, il faut sécher la membrane du filtre FT, en centrifugeant les unités FT /CT à vide pendant 1minute. Le tube FT est ensuite placé dans un tube d'élution de 1,5ml pré-étiqueté avec l'identification de l'échantillon. 100 µl de Tampon d'élution DNA EB (DNA Elution Buffer)sont ajoutés, délicatement, au tube FT qui est incubé pendant 5min entre 15 à 30°C. Une centrifugation est ensuite réalisée pendant 1min. Enfin l'éluat est récupéré dans le tube d'élution.

MATERIEL ET METHODES

II. 1. 2. Quantification de l'ADN

Le dosage de l'ADN s'effectue par spectrophotométrie, les bases puriques et pyrimidiques absorbant fortement à 260 nm. Une unité de densité optique à 260 nm correspond à une solution d'ADN double brin à 50µg/ml.

Dans notre étude, L'ADN a été quantifié par spectrophotométrie (ou fluorimètre). La quantification se fait conformément au protocole indiqué par le fabricant de l'appareil. 180µl de tampon DNA EB et 1µl d'eau ultra pure sont utilisés comme référence pour l'instrument. Seul 1µl de la solution contenant de l'ADN suffit pour la quantification en le plaçant dans le fluorimètre. Ce dernier indique la concentration de l'ADN. Il est nécessaire en moyenne d'effectuer deux lectures. Les deux mesures indiquées ne doivent pas s'éloigner de plus ou moins de 10% l'une par rapport à l'autre quand la concentration d'ADN est supérieure ou égale à 20ng/µl.

Si la concentration d'ADN <20 ng/µl, les mesures ne doivent pas s'éloigner de plus de ±2,0ng/µl.

Pour effectuer le test de détection de la mutation de l'*EGFR* par RT-PCR, la concentration de l'ADN doit être supérieure à 5ng/ µl pour chaque échantillon et chaque échantillon doit contenir un volume de 25 µl, soit au totale une quantité minimum de 125ng d'ADN par micro-puits de la plaque PCR.

II. 3. PCR en temps réel : Préparation, amplification/détection et interprétation

➤ **Préparation de la réaction RT-PCR**

Le cobas® EGFR mutation test V2 détecte 42 mutations dans les exons 18, 19, 20, 21. L'amplification nécessite la préparation de 3 mélanges réactionnels différents ou « Master Mix » « MMX ». Il faut prévoir 3 tubes Safe-Lock de 1.5ml pour chaque échantillon (ainsi que pour le control muté et le control négatif). Pour calculer le volume de chaque mélange réactionnel on doit suivre les formules suivantes:

- Volume MMX (1, 2 ou 3) = (nombre d'échantillons + 2 contrôles + 1) x 20 µl.
- MGAC(Magnesium acetate)= (nombre d'échantillons + 2 contrôles + 1) x 5 µl.

MATERIEL ET METHODES

Prenons l'exemple d'un 1 échantillon. Le volume de chaque MMX sera égal à 80 µl et le volume de chaque MGAC sera égal à 20 µl.

Après avoir correctement calculé le volume des réactifs, nous devons prélever le volume exacte de chaque MMX et les transférer dans un tube Safe-Lock préalablement étiqueté avant de le passer 5 minutes au vortex. On ajoute le volume adéquat (préalablement calculé) de MGAC à chaque tube avant de mélanger 3 à 5 secondes au vortex.

La seconde étape consiste à préparer la Plaque PCR. 25 µl de MMX sont ajoutés dans chaque puits de la plaque. Il faut ajouter les différents MMX dans la plaque en prenant soin de respecter l'ordre et l'emplacement de chacun comme indiqué dans le manuel d'utilisation du kit (**Tableau I**).

La plaque est ensuite recouverte par un film d'étanchéité en utilisant l'applicateur de film, puis insérée tout en étant bien orientée dans le lecteur du Cobas 4800.

Remarque: la RT-PCR doit être lancée moins d'une heure après l'application du premier échantillon d'ADN dilué sur la plaque

Tableau I : Ordre de répartition des différents réactifs sur la plaque PCR lors du cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Row / Column	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX 1	MC MMX 2	MC MMX 3 v2	S7 MMX 1	S7 MMX 2	S7 MMX 3 v2	S15 MMX 1	S15 MMX 2	S15 MMX 3 v2	S23 MMX 1	S23 MMX 2	S23 MMX 3 v2
B	NEG MMX 1	NEG MMX 2	NEG MMX 3 v2	S8 MMX 1	S8 MMX 2	S8 MMX 3 v2	S16 MMX 1	S16 MMX 2	S16 MMX 3 v2	S24 MMX 1	S24 MMX 2	S24 MMX 3 v2
C	S1 MMX 1	S1 MMX 2	S1 MMX 3 v2	S9 MMX 1	S9 MMX 2	S9 MMX 3 v2	S17 MMX 1	S17 MMX 2	S17 MMX 3 v2	S25 MMX 1	S25 MMX 2	S25 MMX 3 v2
D	S2 MMX 1	S2 MMX 2	S2 MMX 3 v2	S10 MMX 1	S10 MMX 2	S10 MMX 3 v2	S18 MMX 1	S18 MMX 2	S18 MMX 3 v2	S26 MMX 1	S26 MMX 2	S26 MMX 3 v2
E	S3 MMX 1	S3 MMX 2	S3 MMX 3 v2	S11 MMX 1	S11 MMX 2	S11 MMX 3 v2	S19 MMX 1	S19 MMX 2	S19 MMX 3 v2	S27 MMX 1	S27 MMX 2	S27 MMX 3 v2
F	S4 MMX 1	S4 MMX 2	S4 MMX 3 v2	S12 MMX 1	S12 MMX 2	S12 MMX 3 v2	S20 MMX 1	S20 MMX 2	S20 MMX 3 v2	S28 MMX 1	S28 MMX 2	S28 MMX 3 v2
G	S5 MMX 1	S5 MMX 2	S5 MMX 3 v2	S13 MMX 1	S13 MMX 2	S13 MMX 3 v2	S21 MMX 1	S21 MMX 2	S21 MMX 3 v2	S29 MMX 1	S29 MMX 2	S29 MMX 3 v2
H	S6 MMX 1	S6 MMX 2	S6 MMX 3 v2	S14 MMX 1	S14 MMX 2	S14 MMX 3 v2	S22 MMX 1	S22 MMX 2	S22 MMX 3 v2	S30 MMX 1	S30 MMX 2	S30 MMX 3 v2

MATERIEL ET METHODES

➤ **Amplification/détection**

Après avoir inséré la plaque dans le Cobas 4800, le logiciel du test est activé après avoir validé l'identifiant, le mot de passe et le code barre du kit cobas® EGFR mutation test V2. Une fois l'accès autorisé, on doit s'assurer que la plaque PCR est validée par le Cobas 4800 avant de cliquer sur « New Run » pour lancer la réaction et la suivre en temps réel.

Le cobas® EGFR mutation test V2 a été élaboré pour la détection de 42 mutations dans les exons 18, 19, 20 et 21 du gène *EGFR* dont les, i) mutations dites « activatrices » et qui suggèrent la thérapie ciblée à base d'ITK dans les CBNPC (dont les adénocarcinomes), ii) mutations inactivatrices résistantes aux ITK et enfin des iii) mutations dites « rares ».

Il y a donc plusieurs sondes marquées par fluorescence qui peuvent reconnaître spécifiquement les séquences cibles (mutées ou sauvages) de l'ADN génomique, détectées par des canaux optiques spécifiques à chacune d'elles.

Dans l'appareil, le mélange réactionnel est en premier temps chauffé progressivement dénaturant ainsi l'ADN génomique, et exposer les séquences cibles aux différentes sondes. Ces dernières les reconnaissent spécifiquement puis s'y hybrident au fur et à mesure que le mélange réactionnel refroidisse. A la fin du premier cycle de la PCR, on obtient donc des séquences d'ADN hybride bicaténaire sur des séquences spécifiques du gène *EGFR*. L'ADN polymérase *Thermus Species Z05* thermorésistante va alors polymériser les amorces hybridées sur le second brin en utilisant l'ADN génomique comme matrice (cela se fait en présence d'ion métallique divalents et de dNTP en abondances dans le mélange réactionnel).

Ce cycle est répété un certain nombre de fois, la quantité d'ADN est doublée à chaque cycle

Dans le mélange réactionnel chaque sonde est marquée par un fluorophore et par une molécule capable de désactiver un état excité, cette molécule est appelée « Quencher », dont le rôle est d'absorber la fluorescence du fluorophore lorsque la sonde n'est pas hybridée à sa séquence cible. Une fois que la sonde se lie à sa cible elle est clivée par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase *Z05*. Etant clivée cette sonde perd son Quencher et la fluorescence du fluorophore lié à cette sonde est libérée. Lorsqu'elle est excitée, par un spectre lumineux approprié, elle produit une longueur d'onde caractéristique qui est détectable et quantifiable par l'appareil de mesure, qui rapporte en temps réel ces mesures et les exprime sur l'interface

MATERIEL ET METHODES

informatique, sous forme de graphe qui évolue au fil du temps. Ceci permet le suivi de la PCR au fur et à mesure qu'elle se produise (**Figure7**)

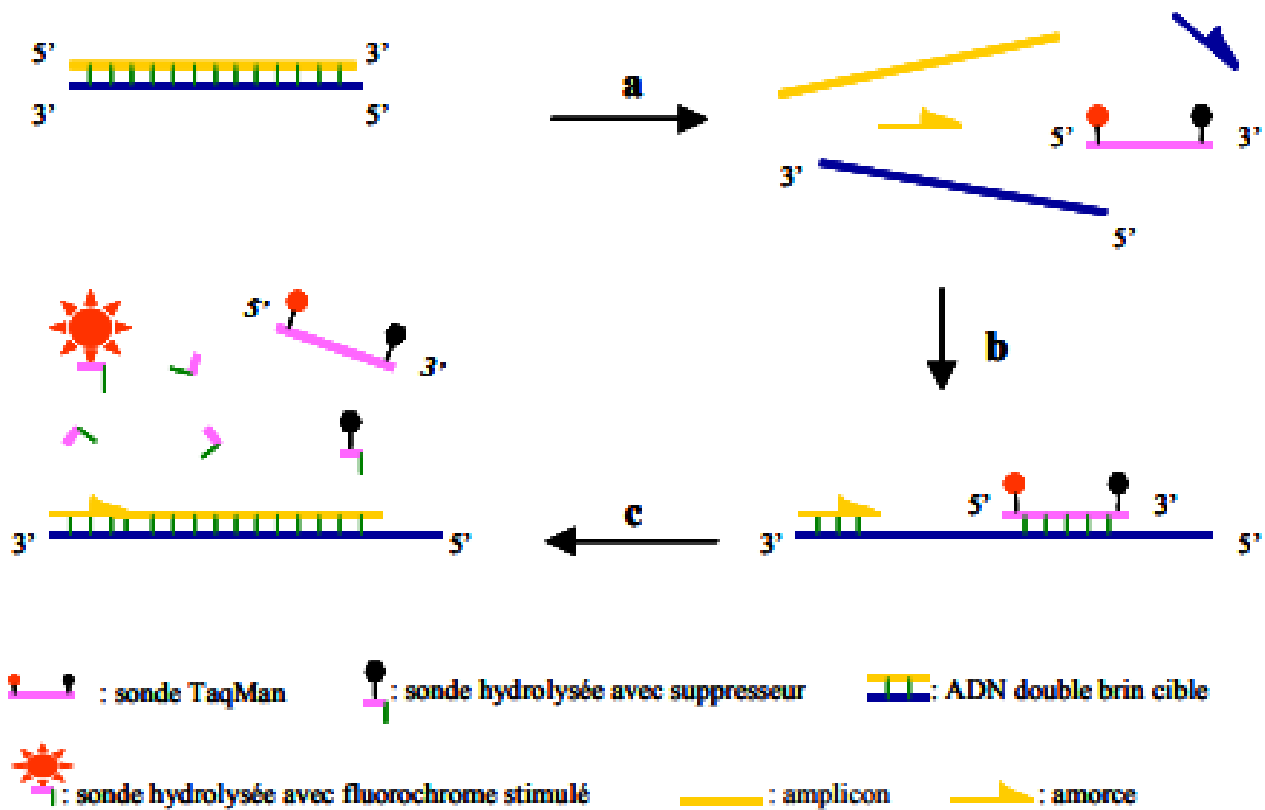


Figure 7 : Principe de la PCR utilisant la technologie Taq-man (Poitras et Houde, 2002).

a) Pendant la dénaturation, la sonde est libre dans le milieu réactionnel. b) À la température d'appariement, la sonde et les amorces s'hybrident à leurs séquences cibles respectives et la proximité des fluorochromes au supprimeur (Quender) sur la même sonde permet l'inhibition de la fluorescence. c) Lors de la polymérisation la Taq-polymérase déplace et clive la sonde grâce à son activité nucléotidique 5'-3'. Le fluorochrome est libéré de l'environnement Quender ce qui lui permet l'émission de la fluorescence.

MATERIEL ET METHODES

➤ Interprétation

Les résultats sont interprétés selon les instructions concises dans le **tableau II** ci-dessous

Tableau II: Interprétation des résultats post-analytiques du cobas[®] EGFR Mutation Test v2

Test Result	Mutation Result	Interpretation
Mutation Detected	Ex19Del S768I L858R T790M L861Q G719X Ex20Ins (More than one mutation may be present)	Mutation détectée dans la séquence cible du gène EGFR
No Mutation Detected (NMD)*	N/A	mutation non détectée dans la séquence cible
Invalid	N/A	Les résultats de l'échantillons sont invalides, repeter le test en respectant les instructions décrites dans la section "Retesting of sample with invalid results".
Failed	N/A	échec du test du à une défaillance de l'appareil ou du système informatique.

Résultats et discussion

Dans ce chapitre sont présentés, analysés puis discutés les résultats de l'étude rétrospective que nous avons réalisé, concernant la recherche de mutations du gène *EGFR* sur un panel de 22 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire. Un travail réalisé au service d'anatomopathologie du Centre Pierre et Marie Curie à Alger.

I. Caractéristiques épidémiologique de la population étudiée

Les caractéristiques démographiques de la population étudiée sont résumées dans le **tableau III** ci-dessous.

Tableau III : Caractéristique Démographiques de la population étudiée

Patients atteints d'adenocarcinome pulmonaire	
Nombre total	22
Moyenne d'âge (an)	63,8 ± 8.33
Age extrême (an)	47-82
Sexe-ratio (H:F)	1/2

L'analyse du tableau III nous permet de constater que:

- Le sexe ratio pour un effectif de 21 patients est de 2.0 avec 7 femmes et 14 hommes (le sexe n'est pas mentionné pour 1 patients).
- L'âge moyen pour 21 patients de notre panel de patients est de 63.8 ans et un écart type de 8.33 ans.
- Le plus âgé avait 82 ans et le plus jeune 47ans.

Concernant la prédominance masculine dans le carcinome broncho-pulmonaire, l'hypothèse dit que ceci serait être lié aux habitudes tabagiques telles que l'âge précoce du début de

consommation et la fréquence de consommation du tabac, plus élevés chez les hommes. Selon l'INSP (Institut national de sante publique), la prévalence tabagique était de 27.4 % chez les hommes algériens en 2010 contre 2.5% chez les femmes. En 2018, l'OMS revoit à la baisse la prévalence des hommes algériens fumeurs atteints de carcinomes broncho-pulmonaire à 20%. Cependant, il faut souligner que concernant les statistiques liées au tabagisme chez les femmes, du moins en Algérie, les données sont difficilement interprétables du fait de leur faible fiabilité vu que même devant un questionnaire médicale certaines femmes peinent à déclarer leurs habitudes tabagiques. Ceci est dû à des facteurs socioculturels en Algérie rendant tabou la question du tabagisme chez les femmes.

La prédominance masculine au carcinome broncho-pulmonaire est aussi due à une exposition, plus importante, des hommes au tabagisme passif et au risque professionnels. En effet, en Algérie il y a des endroits qui sont fréquentés exclusivement par une population masculine et où la consommation de tabac n'est pas interdite, comme les cafés populaires, les stades, les rassemblements dans la rue...etc

Il faut savoir aussi qu'en Algérie il n'existe pas de restriction à la vente de tabac aux mineurs. S'ajoute à cela le fait que les prix du tabac, dans notre pays, font partie des plus bas au monde (Global Youth Tobacco Survey Algeria, 2007). Le manque de sensibilisation, encourage aussi la consommation de tabac à un âge précoce.

Même si la majorité des études épidémiologiques s'accordent sur le fait que le taux d'incidence des cancers broncho-alvéolaires est plus élevé chez les hommes, ce taux a tendance à se stabiliser alors qu'il ne cesse d'augmenter chez les femmes (augmentation du taux d'incidence de 5,4 % par an entre 2005 et 2012) (Meziere, 2014). Cet état de fait est en corrélation directe avec l'augmentation du taux de tabagisme chez les femmes. Selon une enquête rapportée par l'OMS concernant 150 pays; il y a 1 milliard de fumeurs dans le monde et près de 200 millions sont des femmes. Ce chiffre ne cesse d'augmenter d'année en année à cause de nombreux facteurs. Citons l'exemple de l'industrie du tabac qui met en jeu des campagnes marketing ciblant les femmes utilisant la publicité pour véhiculer des stéréotypes de façon à rattacher la consommation de tabac aux idées de beauté, d'affirmation de soi, d'émancipation et de liberté. Cette stratégie marketing vise les femmes car elles représentent un marché avec un fort potentiel

jusqu'à-là peu exploité car elles sont de plus en plus nombreuses à avoir les moyens matériels de consommer du tabac.

Il est aussi important de rappeler que le tabagisme n'est pas le seul facteur de risque pour la survenue de l'adénocarcinome pulmonaire. Nous retrouvons aussi des facteurs environnementaux (tels que la pollution), les expositions professionnels aux substances cancérogènes et aux radiations, les antécédents personnels (tuberculose, béryllose, silicose...etc.) et aussi des prédispositions génétiques.

L'adénocarcinome est le type de cancers broncho-alvéolaire prédominant chez la femme (Devesa et *al*, 2005 ; Youlden et *al*, 2008). En plus du tabagisme et la susceptibilité plus importante aux carcinogènes du tabac chez cette dernière, d'autres facteurs peuvent expliquer cette prévalence, tels que les mutations *EGFR*, plus fréquentes chez la femme et l'impact des facteurs hormonaux (estrogènes, progestérone) sur la carcinogenèse (Rouquettea et *al*, 2012).

Dans notre étude, l'information sur l'âge est connue pour 21 cas sur 22 patients. Sa moyenne est de 63.8 ± 8.33 ans. Les données épidémiologiques mondiales de l'OMS indiquent que l'âge moyen au diagnostic des CBNPC est de 67 ans chez l'homme et 65 ans chez la femme.

Dans une étude réalisée par Joobeuret *al*. (2015) dans un centre hospitalier tunisien sur un panel de 322 patients, l'âge moyen était de 59.4 ans avec des extrêmes d'âge allant de 23 à 94 ans. Dans une étude similaire réalisée par Tahiri Elousrouti (2017) au CHU « Hassan II » à Fes au Maroc, l'âge moyen était de 56.6 ans mais il y avait uniquement des femmes.

À travers la littérature, la majorité des auteurs rapportent que les adénocarcinomes sont découvert tardivement, à des âges dépassant la cinquantaine et à des stades localement avancés et métastatiques. Ceci est dû, en grande partie, au retard de consultation des malades (généralement les cancers se développent silencieusement à ces débuts) ainsi qu'au retard du diagnostic par les médecins, ajouté au fait qu'on note une absence de spécificité des symptômes, sont souvent communs aux autres types histologiques des cancers broncho-alvéolaire, voir même à d'autres pathologies pneumologiques (douleur thoracique, la toux, la dyspnée et l'hémoptysie).

L'adénocarcinome se développe à partir d'une entité histologique bénigne, appelée « Hyperplasie Adénomateuse Atypique » ou plus communément HAA, qui correspond à une prolifération modérée atypique de pneumocytes de type II et/ou de cellules de Clara le long de

la paroi alvéolaire et des bronchioles, c'est-à-dire sur les tissus pulmonaire périphérique (Suzukiet *al.*, 1997). Elle mesure généralement moins de 5mm (Travis et *al.*, 2004). Au fil du temps cette HAA va évoluer et acquérir sa malignité avec l'acquisition et la sélection positive de certaines mutations, lui conférant un pouvoir prolifératif et une résistance qui échappe à toute forme de régulation par l'organisme (Mascaux, 2016). Parmi ces mutations, on peut citer celles touchant le gène *KRAS*, le *BRAF* ainsi que l'*EGFR*. Toute cette cancérogénèse prend un certain temps et ne provoque pas de symptômes pouvant pousser la personne à consulter. Le poumon n'est pas très riches en récepteurs sensoriels responsable des douleurs, et les douleurs qui poussent généralement les gens à consulter n'apparaissent que quand les tumeurs s'étendent vers des tissus proches comme la plèvre ce qui explique le diagnostic tardif et c'est ce qui fait toute la dangerosité de l'adénocarcinome (Meziere, 2014).

Pour minimiser les dégâts occasionnés par les tumeurs, maximiser les chances de survie et de rétablissement, il est impératif de favoriser un diagnostic précoce et ce, en consultant suite au moindre doute en particulier pour les personnes présentant des prédispositions. Le dépistage se fait, *via* une radiographie du thorax, une bronchoscopie et un examen d'imagerie appelé « tomodensitométrie ». Si une masse suspecte est détectée, il est nécessaire d'y prélever une partie sous forme de biopsie pour confirmer ou infirmer la nature cancéreuse de cette masse, et aussi de déterminer le type histologique du cancer.

II. Caractéristiques anatomopathologiques

Les différentes caractéristiques anatomopathologiques ont été obtenues après analyse histologiques et immunohistochimique des biopsies broncho-alvéolaires dans des laboratoires externes au CPMC.

II.1. Profil histologique

Le profil histologique est déterminé après coloration HE et observation au microscope photonique (grossissement 40x40). Le **tableau IV** compile l'ensemble des résultats histologiques obtenus, à partir des fiches de renseignements, pour 20 patients sur 22.

L'analyse du tableau IV montre que l'adénocarcinome en tant que type histologique de CBNPC, se décline lui-même en plusieurs sous types histologiques organisés et classifiés selon plusieurs paramètres.

RESULTATS ET DISCUSSION

La classification IASLC ATS/ERS 2009(International Association for the Study of Lung Cancer, American Thoracic Society and European Respiratory Society) a été créée afin de définir les catégories auxquelles se rattachent les critères cliniques, radiologiques, moléculaires et histologiques. Il s'agit de mieux définir les critères pronostiques, prédictifs de la réponse aux différentes thérapies; notamment, les thérapies ciblées (Travis et *al.*, 2011).

Tableau IV: aspect histologique de notre panel de patients

Patients	Diagnostic histologique (1/2)	Patients	Diagnostic histologique (2/2)
1	Non précisé.	12	Adénocarcinome solide.
2	Non précisé.	13	Adénocarcinome.
3	Adénocarcinome infiltrant à prédominance solide.	14	Adénocarcinome primitif solide .
4	Adénocarcinome infiltrant à prédominance solide.	15	Adénocarcinome infiltrant à prédominance acinaire.
5	Adénocarcinome primitif.	16	Carcinome épidermoïde.
6	Adénocarcinome infiltrant.	17	Adénocarcinome papillaire et solide .
7	Carcinome broncho-alvéolaire non à petite cellule.	18	Adénocarcinome.
8	Adénocarcinome infiltrant à prédominance solide.	19	Adénocarcinome.
9	Adénocarcinome.	20	Adénocarcinome peu différencié.
10	Adénocarcinome infiltrant.	21	Adénocarcinome.
11	Non précisé.	22	Non précisé

L'histologie révèle une structure tissulaire en faveur d'un adénocarcinomes dans la majorité des cas. L'Adénocarcinome infiltrant ou invasif était le plus fréquent. Ce type de tumeur évolue aussi dans les tissus voisins.

Notons que le patient 16 présente un carcinome épidermoïde qui est un autre type histologique de CBNPC. Histologiquement il se distingue de l'adénocarcinome par une différenciation malpighienne qui se traduit par des ponts intercellulaires et/ou la synthèse de kératine. Il se distingue aussi par son site de développement qui est dans les tissus de la partie centrale du poumon quand l'adénocarcinome se trouve en périphérie. Son marqueur immunohistochimique le plus caractéristique est le P40, c'est un cancer qui apparait principalement chez les fumeurs (Travis et *al.*, 2015).

Dans certains cas de notre panel (les patients 1, 2 et 11 et 22), le diagnostique n'a pas pu être établi après analyse histologique. L'immunohistochimie et/ou l'analyse moléculaire dans ces situations, s'imposent afin de préciser le diagnostique(Lantuéjoul et *al.*, 2011).

II.2. Etude Immunohistochimique

Nous avons constaté que plusieurs marqueurs immunohistochimiques ont été utilisés par les laboratoires d'anatomopathologie qui ont adressé les blocs au CPMC. Parmi ces marqueurs, nous retrouvons TTF1, P40, CK7, CK20.

L'expression du facteur TTF1 « Thyroïde Transcription Factor 1 », est spécifique des adénocarcinomes avec un taux d'expression de 95% (Bishop et *al.*, 2011). 12 cas sur 20 de notre panel, pour lesquels l'analyse a été effectuée, étaient positifs au TTF1.

TTF1 est une protéine régulatrice de transcription qui se lie et active le promoteur de gènes spécifiques de la thyroïde tels que la thyroglobuline (précurseur des hormones de croissances thyroïdiennes T3 et T4), la thyroperoxydase (enzyme catalysant la première réaction de biosynthèse des hormones thyroïdiennes) et le récepteur de la thyrotropine (aussi appelé récepteur TSH). Cette protéine joue donc un rôle important dans le maintien de la différenciation thyroïdienne mais aussi du développement du poumon (Sirieix et Massade, 2011).

Dans le poumon, l'expression du TTF1 est restreinte aux pneumocytes de type II et aux cellules de Clara, cellules à partir desquelles se forme l'entité histologique HAA. Son expression aberrante serait impliquée dans la progression tumorale (Garraway et *al*, 2006). Certaines études montrent que l'expression du TTF1 dans les CBNPC serait liée à un mauvais pronostic (Puglisi et *al*, 2001). En parallèle, d'autres études soutiennent l'idée selon laquelle son expression est au contraire liée à un bon pronostic et que plus son expression est forte plus le pronostic est favorable (Barletta et *al*, 2009). Compte tenu de cette ambiguïté, la valeur pronostique du TTF1 est difficilement appréciable et donc son marquage n'est utilisé actuellement que pour préciser et/ou confirmer le diagnostic histologique. La positivité pour la Napsine A peut aussi compter en faveur d'un adénocarcinome. Elle a été recherchée chez 2 patients de notre panel, dont un en était positif.

III. Statut mutationnel de l'*EGFR*

Les résultats de la recherche des mutations du gène *EGFR* par PCR en temps réel via le kit cobas *EGFR* mutation test V2, montrent la présence de la mutation chez 2 patients sur 22 (9.1%).

Le premier patient à présenté un *EGFR* muté est de sexe féminin âgé de 67ans. Le second est de sexe masculin âgé de 47ans.

Dans les adénocarcinomes, les fréquences rapportées des mutations l'*EGFR* sont de 22 à 67 % en Asie, 3 à 25 % en Amérique du Nord, et 8 à 24 % en Europe (Pinter et *al*, 2008; Brevet et *al*, 2010; Liang et *al*, 2010).

Dans notre étude, la technique utilisée pour le profilage moléculaire était la Real Time-PCR avec le cobas *EGFR* Mutation test V2. Ce teste peut détecter 42 mutations dans l'exon 18, 19, 20, 21 du gène *EGFR*. Il s'agit d'un test compatible avec des échantillons tissulaires ou de plasma. L'état de santé des patients atteints d'adénocarcinome à un stade avancé ne permet généralement pas d'effectuer une biopsie tissulaire trop invasive. Une analyse moléculaire est donc possible à partir du sang prélevé.

L'échantillon doit contenir au moins 30% de cellules tumorales et l'ADN total doit contenir au moins 10% d'ADN muté pour que le test soit valide. L'ADN est amplifié pour adapter les

échantillons de petite taille contenant peu de cellules tumorales (5%). Pour obtenir des résultats fiables, il faut une extraction d'ADN de bonne qualité à partir d'un tissu riche en cellules tumorales (Kozu et *al.*, 2010). Pour avoir un échantillon riche en cellules tumorales et que les résultats de la recherche de mutation dans l'*EGFR* ne soit pas faussés par les cellules non cancéreuses, certains laboratoires préparent ce qu'on appelle des « lames blanches ». Ils procèdent à l'élimination du tissu sain en au niveau des coupes fines du tissu inclus dans la paraffine. Ainsi, ils obtiennent un taux assez élevé de cellules tumorales à analyser et augmentent la fiabilité des résultats.

Les patients qui sont positifs aux mutations *EGFR* sont candidats pour la thérapie ciblée à base ITK-EGFR. Le lien entre l'efficacité du traitement par ITK et le statut mutationnel du gène *EGFR* n'est plus à prouver (Travis et *al.*, 2011). Une corrélation entre la présence de mutations et la réponse favorable des patients porteurs de ces mutations à la thérapie à base d'ITK a été établie (Gazdar, 2009). 70% d'entre eux voient le ralentissement, l'arrêt voir la régression du développement tumoral avec le gefitinib ou l'erlotinib (Pao et *al.*, 2010). Le récepteur muté a moins d'affinité pour l'ATP au niveau de son domaine tyrosine kinase et devient beaucoup plus sensible pour l'erlotinib et le gefitinib (Ji et *al.*, 2005).

Parmi les molécules ITK sur le marché et les plus communément utilisés, nous pouvons citer: l'erlotinib (Tarceva®, OSI Pharmaceuticals), prescrit dans les formes localement avancées ou métastatiques de CBNPC après un échec d'une ligne de chimiothérapie (au moins un mois) (Merlin, 2008).

Chez l'homme, l'erlotinib diffuse dans les tissus tumoraux et les principales métabolites se propagent facilement dans ces derniers; pour y atteindre des concentrations intratumorales moyennes de 60% des concentrations plasmatiques maximales observées à l'état d'équilibre (Merlin, 2008).

Une étude en Chine a démontré que l'erlotinib augmente le taux de SSP (survie sans progression) significativement comparé à la chimiothérapie de 13,1 mois vs 4.6 mois respectivement et avec un meilleur profil (Zhou et *al.*, 2011). Une étude européenne a révélé les mêmes résultats avec une médiane de SSP de 9.7 mois vs 5.2 mois avec l'erlotinib contre la chimiothérapie respectivement (Rosell et *al.*, 2012).

Malheureusement l'efficacité des ITK-EGFR se trouve limitée du fait de l'existence de mécanismes de résistance, principalement par l'apparition de mutations inactivatrices dont la plus fréquente est la T790M de l'exon 20 (Dansin et Ferté, 2011).

Les ITK-EGFR multicibles appelés irréversibles ou « deuxième génération » peuvent contourner ces mécanismes de résistance acquise au géfitinib et erlotinib. Le BIBW 2992 et le PF299 sont les premiers de cette deuxième génération. Ils inhibent le HER2 et le HER4 respectivement. Dans un essai de phase II, un taux de RO (réponse objective) de 100% chez 14 patients *EGFR* mutés traités par PF299 (MOK et al., 2010). 129 patients *EGFR* mutés, après traitement par le BIBW 2992, ont montré des résultats prometteurs en terme de RO (réponse objective) et SSP (survie sans progression) de 62% sur 12 mois (Yang et al., 2010).

Les traitements à base ITK-EGFR et/ou à base d'anticorps monoclonaux anti-EGFR exercent une pression sélective sur les cellules tumorales, les poussant à sélectionner positivement les profils présentant une résistance aux traitements. Cette sélection est le résultat de mutations inactivatrices (comme la mutation T790M citée précédemment) ou de la translocation nucléaire de l'EGFR. Dans le noyau, ce dernier est un co-régulateur transcriptionnel interagissant avec des protéines nucléaires intervenant dans la régulation génique (ex: Cycline D1), la réparation de l'ADN et la réplication (ex: PCNA, DNA-PK) ainsi que la décondensation de la chromatine (P53, ATM...etc). Ces interactions auront pour conséquence la reprise de la progression tumorale avec, cette fois, des cellules radio- et chimio-résistantes (TKI-EGFR et anti-EGFR résistantes) (Gazzeri, 2018).

Conclusion

Les épidémiologistes observent depuis ces 20 dernières années une augmentation nette dans l'incidence des adénocarcinomes pulmonaires, particulièrement chez les non fumeurs et les femmes. Ceci est dû non seulement à des facteurs biologiques mais aussi à des paramètres socio-économiques et culturels.

Les données de notre étude concernant l'âge des sujets et sa moyenne s'accordent sur le fait que l'adénocarcinome est diagnostiqué tardivement et à des stades métastatiques où les pronostics sont souvent péjoratifs. Ce constat confirme l'importance capitale du dépistage dans la prise en charge précoce et donc l'optimisation des chances de survie et de rémission.

La prise en charge thérapeutique de ces patients utilisera des traitements classiques comme la chimiothérapie ou des traitements ciblés. La thérapie à base d'ITK-EGFR a fait ses preuves et offre de nombreux avantages. Notre étude a révélé que seul 2 patients étaient porteurs de mutations au niveau du gène *EGFR*. Ce sont des candidats potentiels à la thérapie ciblée à base d'ITK-EGFR. La petite taille de notre échantillon ne nous permet pas d'apprécier la distribution de ces mutations dans notre population. Une étude multicentrique sur un échantillon plus important, représentatif de la population algérienne, nous donnerait une vision plus réaliste sur la distribution des mutations *EGFR*, et nous permettrait de mieux mesurer leur impacte dans le traitement des adénocarcinomes pulmonaires.

Cette thérapie présente, néanmoins, des limites particulièrement celles liées à la « résistance primaire » au traitement, par les patients qui ne présentent pas de mutations activatrices dans leur gène *EGFR*. De plus, les patients positifs aux mutations activatrices peuvent développer une « résistance acquise », à travers l'apparition de mutations inactivatrices comme la mutation T790M sur l'exon 20 de leur gène *EGFR*.

La mise au point des nouvelles stratégies de lutte contre les CBNPC à base d'ITK-EGFR illustre le rôle clé de la biologie moléculaire et l'impact concret que ça peut avoir sur les pratiques thérapeutiques. La biologie et la clinique œuvrent en synergie afin de pouvoir optimiser le traitement au cas par cas des patients, tout en élaborant de nouvelles stratégies thérapeutique, permettant de contourner les mécanismes de résistances.

References bibliographiques

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

- Affiliated pathologist medical group, 2016.
- Algeria - Global Youth Tobacco Survey 2007, Constantine, Oran, Setif, sponsored by: World Health Organization - WHO -US Centers for Disease Control and Prevention – CDC.

B

- Bazzani, L., Donnini, S., Giachetti, A., Christofori, G., Ziche, M. (2018). « PGE2 mediates EGFR internalization and nuclear translocation via caveolin endocytosis promoting its transcriptional activity and proliferation in human NSCLC cells “. *Oncotarget*, Volume: 9, page: 14939-14958.
- Beau-Faller M. , Fabrice Barlesi , Helene Blons , Isabelle Rouquette , L'houcine Ouafik , Jean Mosser (2013) « Biomarkers (BM) France: Results of routine EGFR, HER2, KRAS, BRAF, PI3KCA mutations detection and EML4-ALK gene fusion assessment on the first 10,000 non-small cell lung cancer (NSCLC) patients” *Journal of Clinical Oncology*, volume: 31, issue: 15.
- Bishop.J.A, Teruya-Feldstein.J , Westra.W.H, Pelosi.G, Travis.W.D , et Rekhtman.N (2011) p40 (DeltaNp63) is superior to p63 for the diagnosis of pulmonary squamous cell carcinoma. *Mod Pathol, Modern Pathology*, volume :25, Issue:3, pages 405-415.
- Brennan. P, Hainaut.P , Boffetta.P(2001),« Genetics of lung-cancer susceptibility”, *Lancet Oncology*, volume : 12 issue :04, pages :399-408.
- Brevet.M, Arcila.M, et Ladanyi.M, (2010), Assessment of EGFR mutation status in lung adenocarcinoma by immunohistochemistry using antibodies specific to the two major forms of mutant EGFR *Journal of Molecular Diagnostics*, volume:12, issue:2, pages:169-176.
- Burkhard.B , MeyerStaeckling.S, Schmidt.H, Agelopoulos.Ket Buerger.H,(2006)“Mechanisms of *egfr* Gene Transcription Modulation: Relationship to Cancer Risk and Therapy Response” *Clinical Cancer Research*, volume: 12, issue: 24, pages:7252-7260.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

C

- Cadranel.J, Créquit.P, Ruppert.A.M, Lavolé.A, Gounant.V, Lacave.R, Fleury.J, Antoine.M et Wislez. M (2013) Mutation de l'EGFR, de l'étude du gène à la pratique clinique : exemplarité ou exception ? Revue des maladies respiratoires actualités, volume :5 , pages 519-537.
- Cagle P.T , Dacic.S ,(2011) "Lung Cancer and the Future of Pathology", Archive Pathology Laboratory Medicine, Volume: 135, Issue:03
- Cappuzzo. F, Varella-Garcia.M, Shigematsu.H, Domenichini.I, Bartolini.S, Ceresoli.G.L, Rossi.E, Ludovini.V, Gregorc.V, Toschi.L , Franklin.W.A, Crino.L , Gazdar.A.F, Bunn.P.A Jr, et Hirsch.F.R ,(2005)" Increased HER2 Gene Copy Number Is Associated With Response to Gefitinib Therapy in Epidermal Growth Factor Receptor–Positive Non–Small-Cell Lung Cancer Patients", Journal of Clinical Oncology, Volume: 23, Issue: 22, pages: 5007-5018.
- Carlson J.J. , Louis P. Garrison.L.P, Scott D. Ramsey.S.D,Veenstra. D.L ,(2009) "The Potential Clinical and Economic Outcomes of Pharmacogenomic Approaches to EGFR-Tyrosine Kinase Inhibitor Therapy in Non–Small-Cell Lung Cancer", Value Health, volume: 12, issue: 01, pages: 20-27.
- Chater.A. (2014) « Cancer broncho pulmonaire et thérapeutique ». Thèse de doctorat en medecine, université Abou BekrBelkaid. Tlemcen, Algérie. Pages :129.
- Cours Biomolécules et Cellules Intégrées du Dr Kebbas S. (2018), Département de biologie et physiologie cellulaire, Université SAAD DAHLEB de Blida, Algerie.

D

- Dansin.E, Ferté.C (2011), Indications des inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR dans le cancer bronchique non à petites cellules : pratiques actuelles et perspectives, La lettre du pneumologue, Volume :14, numéro : 1 , pages : 8-15.
- Ding.L, Getz.G, Wheeler.D.A, Mardis.E.R, McLellan.M.D , Cibulskis.K, Sougnez.C , Greulich.H, Muzny.D.M, Morgan.M.B, Fulton.L, Fulton.R.S, Zhang.Q, Wendl.M.C, Lawrence.M.S, Larson.D.E, Chen.K, Dooling.D.J, Sabo.A, Hawes.A.C , Shen.H, Jhangiani.S.N,

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lewis.L.R, Hall.O, Zhu.Y, Mathew.T, Ren.Y, Yao.J, Scherer.S.E, Clerc.K, Metcalf.G.A, Brian Ng, Milosavljevic.A, Gonzalez-Garay.M.L, Osborne.J.R, Meyer.R, Shi.X, Tang.Y, Koboldt.D.C, Lin.L, Abbott.R, Miner.T.L, Pohl.C, Fewell.G, Haipek.C, Schmidt.H, Dunford-Shore.B.H, Kraja.A, Crosby.S.D, Sawyer.C.S, Vickery.T, Sander.S, Robinson.J, Winckler.W, Baldwin.J, Chirieac.L.R, Dutt.A, Fennell.T, Hanna.M, Johnson.B.E, Onofrio.R.C, Thomas.R.K, Tonon.G, Weir.B.A, Zhao.X, Ziaugra.L, Zody.M.C, Giordano.T, Orringer.M.B, Roth.J.A, Spitz.M.R, Wistuba.I.I, Ozenberger.B, Good.P.J, Chang.A.C, Beer.D.J, Watson.M.A, Ladanyi.M, Broderick.S, Yoshizawa.A, Travis.W.D, Pao.W, Province.M.A, Weinstock.G.M, Varmus.H.E, Gabriel.S.B, Lander.E.S, Gibbs.R.A, Meyerson.M,et Wilson.R.K (2008) , “Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma”, *Nature*, Volume: 455, Issue:7216, pages: 1069–1075.

F

Faure S. (2015) « Thérapies ciblées anticancéreuses » *Actualités pharmaceutiques*, volume : 54, issue : 546, pages : 57-61.

G

- Ganti A.K. (2010) “Epidermal growth factor receptor signaling in non-small cell lung cancer”.*Cancer investigation*, Volume: 29, Issue: 05, pages 515-525.
- Garrezi S. ,(2018), “L’EGFR nucléaire: un nouveau mode de signalisation dans les cancers”, *Biologie Aujourd’hui*, volume: 212, Issue: 1-2, pages: 27-33.
- Gazdar, A.F, (2009), Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, Volume: 28, Issue:1, pages: 24-31.
- Gahr S., R Stoehr, E Geissinger, (2013) “EGFR mutational status in a large series of Caucasian European NSCLC patients: data from daily practice”, *British Journal of Cancer* , volume: 109, pages: 1821–1828.
- GeissR.,ThibaultDeLaMotteRouge,CoralineDubot,AlexandraLeary,CatherineLhommé,PatriciaPa utier,SuzyScholl,Manuel JorgeRodrigues, (2014) “Thérapies ciblées dans les cancers du col de

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

l'utérus en évolution locale ou métastatique Targeted therapy in locally and metastatic recurrent cervical cancers” Bulletin du Cancer, volume: 101, issue: 7-8, pages: 748-755.

H

- Hadoux J, Besse.B, Planchard.D (2011), “Lung cancer in never smoker: Epidemiology, molecular profiles and treatment”, La Presse Médicale, Volume: 40, page: 371-378.
- Hanahan D. and Weinberg.R.A ,(2000) “The Hallmarks of Cancer”, Cell Press, Volume: 100, pages: 57–70.
- Hanahan.D, Robert A.Weinberg.R.A,(2011)“Hallmarks of Cancer: The Next Generation”, Cell Press, Volume 144, Issue 5, Pages 646-674.

I

- International Agency for Research on Cancer, (2018), « Lung cancer », Globocan.

J

- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun M.J, (2008), « Cancer statistics ». A Cancer Journal for Clinicians, Volume:58. Pages: 71-96.
- Jeon, Y. K., S. W. Sung, et al. (2006). "Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in nonsmall cell lung cancer." Lung Cancer, Volume:54, Issue:03, pages:: 387-398.
- Ji.H, Zhao.X, Yuza.Y, Shimamura.T, Li.D, Protopopov.A, Jung.B.L, McNamara.K, Xia.H, Glatt.K.A, Thomas.R.K, Sasaki.H, Horner.J.W, Eck.M, Mitchell.A, Sun.Y, Al-Hashem.R, Bronson.R.T, Rabindran.S.K, Discafani.C.M , Maher.E., Shapiro.G.I, Meyerson.M, et Wong.K.-W(2006), “Epidermal growth factor receptor variant III mutations in lung tumorigenesis and sensitivity to tyrosine kinase inhibitors”. Proc Natl Acad Sci U S A, volume: 103, issue: 20, pages 7817-7822.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Joobeur Samah, Hadhami Mribah, Ahmed Ben Saad, Saoussen Cheikh Mhamed, Houda Mahou, Naceur Rouatbi, et Ali El Kamel (2015) « Adénocarcinome pulmonaire primitif : Expérience d'un centre hospitalier Tunisien » The Pan africain medical journal, volume : 21, Page : 216.

K

- Kannaiyan.R, et Mahadevan. D (2018) “A comprehensive review of protein kinase inhibitors for cancer therapy”, Expert Rev Anticancer Therapy, volume: 12, pages: 1249–1270.
- Kozu, Y., et al., The usefulness of mutation-specific antibodies in detecting epidermal growth factor receptor mutations and in predicting response to tyrosine kinase inhibitor therapy in lung adenocarcinoma. Lung Cancer, 2010. Volume:73, Issue:1, pages: 45-50.
- Keating G. M. (2014) “Afatinib: a review of its use in the treatment of advanced non-small cell lung cancer” Drugs, volume: 74, issue: 2, pages: 207-221.

L

- Lantuéjoul S., Salameire D., Brambilla E. (2011) « Evolution of the histological classification of non-smallcell lung carcinoma” La Lettre du Cancérologue, Volume:20, Issue:06, pages: 376-381.
- Le Calvez. F, Mukeria.A, Hunt.J.D , Kelm.O, Hung.R.J, Taniere.P, Brennan.P, Boffetta.P, Zaridze.D.G, et Hainaut1.P ,(2005) “TP53 and KRAS Mutation Load and Types in Lung Cancers in Relation to Tobacco Smoke: Distinct Patterns in Never, Former, and Current Smokers”, Cancer Research; volume:65, Issue:(12), Pages:5076-5083..
- Liang, Z., J. Zhang, et al. (2010). "Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas." BMC Cancer, Volume:10, Issue:376.
- Linardou.H, Dahabreh.I.J, Kanaloupiti.D, Fotios Siannis, Dimitrios Bafaloukos, Paris Kosmidis, Christos, APapa dimitriou, Samuel Murray ,(2008), “Assessment of somatic *k-RAS* mutations as a mechanism associated with resistance to EGFR-targeted agents: a systematic review and meta-

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer”, *The Lancet Oncology* Volume 9, Issue 10, Pages: 962-972.

M

- Mansuet-lupo A., (2018) « Le cancer pulmonaire - anatomo-pathologie », université paris descartes, France.
- Merlin.J.L (2008), Les inhibiteurs de tyrosine kinase en oncologie, *La lettre du pharmacologue* ; volume : 22, Issue : 02, pages : 51-62.
- Mok.T , Spigel.D.R , Park.K , Socinski.M.A , Tung.S.Y , Borzillo.D. KimG , Zhang.H , O'Connell.J.P , et Janne.P.A, (2010) ,” Efficacy and safety of PF-00299804 (PF299), an oral, irreversible, pan-human epidermal growth factor receptor (pan-HER) tyrosine kinase inhibitor (TKI), as first-line treatment of selected patients with advanced non-smallcell lung cancer”. *Journal of Clinical Oncology*, volume: 28, page: 7537.

O

- Ozenne P., (2011) « Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l’EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14ARF dans les adénocarcinomes Pulmonaires” thèse de doctorat en médecine à l’université de Grenoble, France.

P

- Paik Paul K, Arcila.M.E, Fara.M, Sima.C.S, Miller.V.A, Kris.M.G, Ladanyi.M, and RielyG.J , (2011), “Clinical Characteristics of Patients With Lung Adenocarcinomas Harboring BRAF Mutations”, *Journal of clinical oncology*, Volume: 29, issue: 15, pages: 2046–2051.
- Paik Paul K, Johnson ML, D’Angelo SP, Sima CS, Ang D, Dogan S, Miller VA, Ladanyi M, Kris MG, Riely GJ (2012) “Driver mutations determine survival in smokers and never-smokers with stage IIIB/IV lung adenocarcinomas”, *Cancer*, volume:118, Issue: 23, pages: 5840–5847.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Pao, W, et Chmielecki.J, (2010) Rational, biologically based treatment of EGFR-mutant non-small-cell lung cancer. Nat Rev Cancer, volume10, Issue: 11, pages: 760-774.
- Pao.W, Wang.T.Y.,G.J, Miller.V.A, Pan.Q,Ladanyi.M, Zakowski. M.F, Heelan.R.T, Kris.M.G,et Varmus.H.E (2005), “KRAS Mutations and Primary Resistance of Lung Adenocarcinomas to Gefitinib or Erlotinib”, Plos Medicine, Volume: 02: Issue: 01.
- Pfeifer G.P., Mikhail F Denissenko, Magali Olivier, Natalia Tretyakova, Stephen S Hecht & Pierre Hainaut, (2002) “Tobacco smoke carcinogens, DNA damage and p53 mutations in smoking-associated cancers”, Oncogene, Volume: 21 Issue:48, pages: 7435–7451.
- Pinter.F, Papay.J, Almasi.A, Sapi.Z, Szabo.E, Kanya.M, Tamasi.A, Jori.B, Varkondi.E, Moldvay.J, Szondy.K, Keri.G, Dominici.M, Conte.P, Eckhardt.S, Kopper.L, Schwab.R ,et Petak.I,(2008), Epidermal growth factor receptor (EGFR) high gene copy number and activating mutations in lung adenocarcinomas are not consistently accompanied by positivity for EGFR protein by standard immunohistochemistry. Journal of Molecular Diagnostics, volume: 10, Issue:2, pages: 160-168.
- Poitras E et Alain Houde, (2002) “La PCR en temps réel: principes et applications”, Biology and Biotechnology, Volume:02, Issue:02, pages: 2-11
- Pusztaszeri J, C. Pache N. Mach P. M. Soccac T. McKee, (2011) « Thérapies ciblées du cancer pulmonaire : tests moléculaires à partir d'échantillons cytologiques », Revue Medicale Suisse, volume : 07, pages:1486-1490.

R

- Ramalingam. S, K. Pawlish, S. Gadgeel, R. Demers, and G.P. Kalemkerian,(1998), “ Lung Cancer in Young Patients: Analysis of a Surveillance, Epidemiology, and End Results Database”, Journal of Clinical Oncology, Volume: 16, issue:02, pages: 651-657.
- Ruppert. A.M, Wislez.M, Poulot.V, Lacave.R, Antoine.M, Cadranel.J, (2011) un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : *EGFR*. Revue des maladies respiratoires, volume:28, pages : 565-577.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Rosell R, Carcereny E, Gervais R, et al (2012) “Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for European patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (EURTAC): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial” *The Lancet Oncology*, volume: 13, pages: 239–46

S

- Sato. J. D, T. Kawamoto, J Mendelsohn, J Polikoff, G H Sato. (1983). "Biological effects in vitro of monoclonal antibodies to human epidermal growth factor receptors”, *Molecular Biology and Medicine*, Volume: 01, Issue: 05, pages: 511-529.
- Sekido Y., K M Fong, J D Minna,(1998) “Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer”, *Biochimica et Biophysica Acta* volume:1378, Issue:01, pages: 21-59.
- Sequist, L. V., R. G. Martins, et al. (2008). "First-line gefitinib in patients with advanced non-small-cell lung cancer harboring somatic EGFR mutations." *Journal of Clinical Oncology*, volume: 26, Issue: 15, pages: 2442-2449.
- Shaw A.T, Beow Y. Yeap , Mari Mino-Kenudson , Subba R. Digumarthy , Daniel B. Costa , Rebecca S. Heist Benjamin Solomon , Hannah Stubbs , Sonal Admane , Ultan McDermott , Jeffrey Settleman , Susumu Kobayashi , Eugene J. Mark , Scott J. Rodig , Lucian R. Chirieac , Eunice L. Kwak , Thomas J. Lynch , A. John Iafrate,(2009) “Clinical Features and Outcome of Patients With Non–Small-Cell Lung Cancer Who Harbor EML4-ALK”, *Journal of clinical oncology, Thoracic Oncology*, Volume: 27, Issue: 26.Pages: 4247-4253.
- Sorkin A, Goh LK., (2008), “Endocytosis and intracellular trafficking of ErbBs”. *Exp Cell Res*, Volume: 314, page: 3093-3106.
- Shigematsu, H. and A. F. Gazdar (2006). "Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers." *International Journal of Cancer*, Volume : 118, Issue : 02, page: 257-262.
- Simonetti.S,Molina.M.A,Queralt.C, de Aguirre.I,Mayo.C, Bertran-Alamillo.J , Sanchez. J.J , Gonzalez-Larriba.J.L Jimenez.U , Isla.D , Moran.T , Viteri.S , Camps.C , Garcia-Campelo.R , Massuti.B, Benlloch.S , Ramon y Cajal.S, Taron.M, et Rosell.R (2010) Detection of EGFR

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

mutations with mutation-specific antibodies in stage IV non-small-cell lung cancer. *Journal of Translational Medicine*, volume: 8, pages: 135.

- Sirieix G.M.et Massade L.M (2011) « TTF-1 : ni ange ni démon » *Med Sci (Paris)*, Volume : 27, Issue : 2, pages :183 – 186.
- Smouse Jason H., Edmund S. Cibas, Pasi A. Janne, Victoria A. Joshi, Kelly H. Zou, and Neal I. Lindeman, (2009) “EGFR Mutations Are Detected Comparably in Cytologic and Surgical Pathology Specimens of Nons-mall Cell Lung Cancer”,*Cancer Cytopathology*, Volume: 117, Issue:01, pages: 67-72.
- Soda M, Choi YL, Enomoto M., (2007), “Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer”. *Nature*, volume: 448, Issue: 7153, pages: 561-556.
- Suda, K, Tomizawa.K, et Mitsudomi.T, (2010) “Biological and clinical significance of KRAS mutations in lung cancer: an oncogenic driver that contrasts with EGFR mutation”, *Cancer Metastasis Rev*, Volume: 29, Issue: 1, pages: 49-60.
- Suzuki K, Nagai K, Yoshida J, (1997), “The prognosis of resected lung carcinoma associated with atypical adenomatous hyperplasia: a comparison of the prognosis of welldifferentiated adenocarcinoma associated with atypical adenomatous hyperplasia and intrapulmonary metastasis”. *Cancer*, volume: 79, Issue:8, pages:1521-1526.

T

- TahiriElousrouti L. (2017) “Les carcinomes broncho-pulmonaires: aspects épidémiologiques, histologiques, immunohistochimiques et évolutifs au CHU Hassan II de Fès » *Mémoire en médecine à l’université Sidi Mohamed Ben Abedallah, Fes. Maroc.*
- Tahraoui.A , « Prise en charge du cancer bronchique en Algérie : Des réseaux régionaux préconisés - Santé - El Watan », A la une - El Watan, 14 mai 2017.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Testa Joseph R. and Jill M. Siegfried, (1992) « Chromosome Abnormalities in Human Non-Small Cell Lung Cancer », *Cancer Research*, volume: 52, pages: 2702-2706.
- Thiberville L., (2004). « Épidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs » EMC Pneumologie.
- Thomas .F (2007) « Mécanismes D'action et de résistance de l'erlotinib dans les cancers des voies aérodigestives supérieurs, thèse de doctorat en pharmacologie », Université Paul Sabatier, Toulouse, France.
- Travis , E.B, Harris.C.C, et Muller-Hermelink.H.K, (2004) “Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart. World Health Organization Classification of Tumours”, *Pathology and Genetics*, ed. L.I. Press. Pages: 12-15.
- Travis.W.D, Brambilla. E, Noguchi. M, Nicholson.A.G, Geisinger.K.R , Yatabe.Y , Beer.D.G , PhD, Powell.C.A, Riely.G.J , MD, Van Schil.P.E, Garg.K , Austin.J H.M, Asamura.H, Rusch.V.W, Hirsch.F.R, Scagliotti.G, Mitsudomi.T, Huber.R.M, Ishikawa.Y, Jett.J, Sanchez-Cespedes.M , Sculier.J-P, Takahashi.T, Tsuboi.M, Vansteenkiste.J, Wistuba.I, Yang.P-C, Aberle.D, Brambilla.C, Flieder.D, Franklin.W, Gazdar.A, Gould.M, Hasleton.P, Henderson.D, Johnson.B, Johnson.D, Kerr.K, Kuriyama.K, Lee.J.S, Miller.V.A, Petersen.I, Roggli.V, Rosell.R, Saijo.N, Thunnissen.E, Tsao.M, et Yankelewitz.D, (2011), « International association for the study of lung cancer/american thoracic society/european respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma ». *Journal of Thoracic Oncology* , volume: 6, Issue : 2, pages: 244-85.
- Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. (2015) “WHO classification of tumours of the lung, pleura, thymus and heart” International Agency for Research on Cancer, 2015

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Traynor, A.M., Weigel, T.L., Oettel, K.R., Yang, D.T., Zhang, C., Kim, K., Salgia, R., Iida, M., Brand, T.M., Hoang, T., Campbell, T.C., Hernan, H.R., Wheeler, D.L. (2013). “Nuclear EGFR protein expression predicts poor survival in early stage non-small cell lung cancer”. Lung Cancer, Volume: 81, pages 138-14.
- Tredaniel J., (2006) « Epidemiology of lung cancer: The tobacco epidemic », Revue des Maladies Respiratoires , Volume 23, Issue 5, Part 3, Pages 7-10.
- Trédaniel J., S.Aarab-Terrisse, L.Teixeira, F.Savinelli, S.Fraboulet, D.Gossot, C.Hennequin, (2009), « Pollution atmosphérique et cancer bronchique : données épidémiologiques », Revue des Maladies Respiratoires volume : 26, Issue :04, pages : 437-445.

W

- Wang Z, Zhang L, Yeung TK, Chen X. (1999), “Endocytosis deficiency of epidermal growth factor (EGF) receptor-ErbB2 heterodimers in response to EGF stimulation”. Mol. Biol. Cell, volume: 10, page: 1621-1636.
- Wissler Marie-Pierre, (2012) « Bilan de l’analyse du statut mutationnel EGFR de 1000 patients atteints d’adénocarcinomes pulmonaires pris en charge par la plateforme d’oncologie moléculaire du CHU-CAV de Nancy » thèse de doctorat en médecine à l’université de Lorraine, France.

Y

- Yang.C , Shih.J , Su.W , Hsia.T , Tsai.C , Ou.R. Calvo.S.I , Cong.X.J , Shahidi.M ,et Miller.V.A (2010) “A phase II study of BIBW 2992 in patients with adenocarcinoma of the lung and activating EGFR mutations (LUX-Lung 2)”. Journal of Clinical Oncology [Meeting Abstracts] , volume: 28, page: 7521.
- Yatabe, Y., (2010) “EGFR mutations and the terminal respiratory unit”, Cancer Metastasis Review, Volume: 29, Issue: 1, pages: 23-36.
- Yokota Jun and Takashi Kohno, (2004), “Molecular footprints of human lung cancer progression”, Cancer and Science, volume: 95, issue: 03, pages: 197-204.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Yoshizawa, A., S. Sumiyoshi, M. Sonobe, M. Kobayashi, M. Fujimoto, F. Kawakami, T. Tsuruyama, WD. Travis, H. Date, H. Haga. Validation of the IASLC/ATS/ERS lung adenocarcinoma classification for prognosis and association with EGFR and KRAS gene mutations: analysis of 440 Japanese patients. *Journal of Thoracic Oncology*, volume: 8, pages: 52-61.
- Yu J, Kane.S, Wu.J, Benedettini.E, Li.D, Reeves.C, Innocenti.G, Wetzal.R, Crosby.K, Becker.A, Ferrante.M, Cheung Cheung.W, Hong.X, Chirieac.L.R, Sholl.L.M, Haack.H, Smith.B.L, Polakiewicz.R.D, Tan.Y, Gu.T-L, Loda.M, Zhou.X,et Comb.M.J (2009) “Mutation-specific antibodies for the detection of EGFR mutations in non small-cell lung cancer”, *Clinical Cancer Research*, volume: 15, Issue:9, pages: 3023-3028.

Z

- Zhang Z.Y, Zhou B, Xie L.(2002), “Modulation of protein kinase signaling by protein phosphatases and inhibitors”. *Pharmacol. Ther.* Volume:93, Issue:3, page: 307-317.
- Zhou C, Wu YL, Chen G, et *al* (2011) “ Erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment for patients with advanced EGFR mutation-positive non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802): a multicentre, open-label, randomised, phase 3 study”. *The Lancet Oncology*, volume: 12, pages: 735–742.

Annexes

Annexe I : Matériel non biologique utilisé

Appareillages	Matériels et verreries	Réactifs
-Microtome	-Micropipettes	-Ethanol
-Etuve	-Cassettes.	-Eau distillée
-Bain-marie	-Tubes eppendorf	
-Vortex	-Tube FT, CT	
-Incubateur	-Lamelles	
-Microcentrifugeuse	-Pince.	
-Fluoromètre		
-Cobas z 480		

Annexe II : Obtention des blocs paraffinés

Une fois reçues au laboratoire, les biopsies sont fixées dans du formol, afin de stabiliser les tissus et ainsi maintenir leurs caractéristiques physico-chimique et biologiques.

Il s'en suit une étape de déshydratation afin d'éliminer l'eau des tissus et de le remplacer par des produits hydrophobes comme le Xylène. Cette étape est entièrement automatisée en faisant passer les échantillons dans 6 bains d'alcool à concentration croissante, pendant 10 à 12h. Les échantillons sont ensuite plongés dans des bains de toluène, puis incubés dans une étuve (56 à 58°C) pendant 6h.

Après avoir été correctement orientés et placés dans des blocs, les échantillons sont enrobés de paraffine à l'aide d'une console thermoréfrigérante. Déshydratés et paraffinés, les échantillons deviennent assez rigides et ont la bonne densité pour permettre d'effectuer de fines coupes.

Les blocs de paraffine sont coupés avec un microtome. Les coupes de 1 à 5 μm sous forme de rubans sont déposées dans un bain-marie. Ces rubans sont soigneusement étalés sur des lames en verres (il faut éviter toute cassure et/ou pli).

Annexe III : Principe et protocole de la coloration en Hématoxyline éosine (HE)

Une analyse histopathologique des lames colorées à l'hématoxyline-éosine (HE), a été réalisée. Cette coloration de routine permet au pathologiste d'avoir une vision globale de la morphologie et de la structure des tissus à l'échelle cellulaire. L'hématéine est une substance plutôt basique, qui colore les noyaux en violet. L'éosine est une substance plutôt acide, qui colore les cytoplasmes en rose.

Dans un premier temps, il est important de déparaffiner les lames en les incubant dans une étuve à 100°C pendant 5min; il s'agit du déparaffinage physique. Le déparaffinage chimique consiste à passer les lames dans des bains de xylène, pendant 5min, afin de dissoudre la paraffine (éclaircissement).

La réhydratation permet d'éliminer le xylène en faisant passer les lames dans des bains d'alcool (éthanol) de concentration décroissante pendant 3min.

Les lames sont colorées à l'hématoxyline de Harris durant 10min, lavées avec de l'eau, puis passées dans des bains d'acide pour enlever l'excès d'hématoxyline. La couleur bleue des noyaux est révélée grâce à l'ammoniaque.

Les lames sont colorées à l'éosine pendant 6 min, puis rincées dans des bains d'alcool. La coloration s'achève en passant les lames dans des bains de xylène.

Les lames sont montées à l'aide de l'Eukitt pour préserver les colorations. Les lamelles sont collées par-dessus les lames grâce à des résines synthétiques.

Annexe IV :principe et protocole de l'immunohistochimie

Utilisée en histo- et cytopathologie depuis plus de vingt ans, cette technique a permis de générer de grandes avancées dans l'établissement de diagnostics et voir même de pronostiques en ce qui concerne les maladies cancéreuses. Son bute est de mettre en évidence des protéines cellulaires (cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires) spécifiques pour un type ou une

fonction cellulaire, en utilisant comme principe la réaction antigène – anticorps, le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur coloré. Son champ d'application est très grand et diversifié, dans notre étude elle est utilisée afin de préciser le diagnostique différentiel entre l'adénocarcinome et les autres types histologique de CBNPC en marquant principalement une protéine caractéristique de l'adénocarcinome: le TTF1(Thyroid transcription factor-1).

Cette technique est rapide (4h) et relativement peu coûteuse et elle est réalisée comme telle:

- 1) Déparaffiner le tissu disposé sur une lame dans 3 bains de xylène (5 minutes dans chaque bain).
- 2) Laver le tissu dans 3 bains d'alcool benzylique à gradient décroissant (96%, 80% et 70%), (5 minutes dans chaque bain).
- 3) Rincer à l'eau distillée.
- 4) Incuber le tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 3% pendant 10 min (afin de bloquer les peroxydases endogènes).
- 5) Rincer à l'eau distillée.
- 6) Immerger la lame dans du tampon Tris-EDTA buffer à pH 9.0 et incuber à 95°C dans un bain-marie (30 minutes) (Pour démasquer l'antigène).
- 7) Laisser refroidir la lame à température ambiante dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0 (15 minutes).
- 8) Rincer à l'eau distillée.
- 9) Laver dans du Tampon A (Tris-HCl 0,05 M, pH 7,6 avec 0,2% de Tween-20) (5 minutes).
- 10) Appliquer sur le tissu l'anticorps primaire dilué dans du tampon selon une dilution comprise entre 1/100 et 1/200 pendant 1 heure dans un environnement humide.
- 11) Laver 2 fois pendant 5 minutes dans le tampon A.
- 12) Appliquer l'anticorps secondaire.
- 13) Laver 2 fois pendant 5 minutes dans le tampon A.
- 14) Ajouter le chromogène, laisser agir pendant 10 minutes.
- 15) Rincer à l'eau.
- 16) Colorer à l'hématoxyline (5 minutes).

- 17) Laver à l'eau pendant 10 minutes.
- 18) Déshydrater le tissu dans 2 bains d'alcool benzylique à 96% (5 minutes dans chaque bain)
- 19) Laver le tissu dans 2 bains de xylène pendant (2 minutes dans chaque bain).
- 20) la lame est prête à être montée pour l'observation.

Annexe V : Composants du Kit d'extraction d'ADN.

Cobas® DNA SamplePreparation KIT	
DNA TLB	Tampon de lyse de tissu d'ADN
PK	Protéinase K
DNA PBB	Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine
WB I	Tampon de lavage I de l'ADN
WB II	Tampon de lavage II de l'ADN
DNA EB	Tampon d'éluion de l'ADN
FT	Tubes de filtration avec bouchons
CT	Tubes de prélèvement

Annexe VI : Composants du teste RT-PCR.

Cobas® EGFR Mutation Test V2	
Composants	Quantité
EGFR MMX-1 (EGFR Master Mix 1)	2 x 0.48 mL
EGFR MMX-2 (EGFR Master Mix 2)	2 x 0.48 mL
EGFR MMX-3 (EGFR Master Mix 3)	2 x 0.48 mL
MGAC (Magnesium acetate)	6 x 0.2 mL
EGFR MC (EGFR Mutant Control)	6 x 0.2 mL
DNA SD (DNA Specimen Diluant)	2 x 3.5mL