

**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieure et de la Recherche**  
**Scientifique**

**Université SAAD DAHLEB de BLIDA-1**



**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 : Biologie Moléculaire et Cellulaire**

**THEME :**

# **Etude du statut mutationnel du récepteur du facteur de croissance épidermique dans l'Adénocarcinome Bronchique**

Présenté par :

**Mlle. Belabid Chaimaa**

**Mlle. Rebzani Ilham**

Devant le jury :

**SAADI L**

**Professeur**

**Présidente**

**CHALAL N.H**

**Maitre de Conférences A**

**Examinatrice**

**SEGHIER F**

**Professeur**

**Promotrice**

**LAKHDARI T**

**Docteur en médecine**

**Co-Promotrice**

**Date de soutenance : 16/07/2022**

**Promotion : 2021-2022**

## **REMERCIEMENTS ET DEDICACES**

*Tout d'abord nous remercions Dieu, tout-puissant, qui nous a accordé santé, volonté et courage durant la réalisation de ce modeste travail.*

*Puis, nous tenons à exprimer nos sincères et chaleureux remerciements envers notre encadreur, Pr. SEGHIER FATMA, professeur en médecine à L'université Saad Dahleb de Blida 1 et la co-encadreur Dr. LAKHDARI T et Pr. SLIMANI, d'avoir proposé et assuré l'encadrement scientifique de ce travail pour leur patience, leur disponibilité et surtout leur judicieux conseils ainsi que toutes les suggestions et remarques qu'elles ont formulées tout au long de ce travail.*

*Nous remercions aussi la Présidente Pr. SAADI.L et Examinatrice Dr. CHALAL N.H jury de soutenance pour les efforts fournis afin d'examiner notre travail.*

*Nos remerciant également Mr. BENYAHIA et toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à notre formation et en particulier nos enseignants au département de Biologie et Physiologie Cellulaire.*

*Nous dédions ce modeste travail A nos très chers parents qui nous ont guidé durant les moments Les plus pénibles de ce long chemin, nos mères qui ont été à nos côtés et nous ont soutenu durant toute notre vie, et nos pères qui ont sacrifié toute leur vie afin de nous voir devenir ce que nous sommes.*

## Résumé

Le cancer broncho-pulmonaire est le cancer le plus fréquent dans le monde, il constitue un problème majeur de santé publique par sa mortalité élevée. Généralement, il est diagnostiqué au stade localement avancé et métastatique car, il reste longtemps asymptomatique, on distingue 2 types de cancer bronchique à petit cellule et la catégorie non à petit cellule (CNPC) constituée majoritairement par l'adénocarcinome, représente environ 80% des cancers pulmonaires caractérisée par un profil mutationnel marqué, entre autres, par l'altération du gène EGFR qu'est une protéine transmembranaire fréquemment surexprimée et activée de manière aberrante, justifiant ainsi le développement de thérapies ciblées, notamment, les inhibiteurs de tyrosine kinase du récepteur de facteur de croissance épidermique (ITK d'EGFR). Un diagnostic moléculaire est crucial afin de pouvoir initier une thérapie ciblée.

Cette étude prospective et rétrospective de l'aspect anatomopathologique et moléculaire de cancer broncho-pulmonaire, effectué au service d'anatomie et de cytologie pathologique à CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS, qui vise à étudier le profil mutationnel de l'EGFR présente chez 19 patients atteints de l'adénocarcinome bronchique dont 8 sont de sexe féminin (42%) et 11 de sexe masculin (58%), Les mutations ponctuelles des exons 18 à 20 du gène *EGFR* ont été recherchées, par PCR en temps réel utilisant le logiciel Idylla.

Les caractéristiques démographiques de la cohorte ont été déterminées. L'âge de cette série de patients varie entre 45 et 80 ans, avec un âge moyen de 63.64 ans et une prédominance masculine avec un sexe ratio de 1.37 H/F.

Nous avons trouvé 7 cas négatifs et 3 non concluants et 9 cas positifs qui incluant les mutations suivantes : une double mutation rare exon 18 (G719A/C/S) avec l'exon 20 (S768I), des délétions de l'exon 19, insertions de l'exon 20 et mutation (G719A/C/S) de l'exon 18. Ils recevront un traitement de type ITK par voie intraveineuse. Les résultats ci-dessus dans notre étude, étaient limités par le nombre des patients étudiés et la région. Nous discutons notre cas avec d'autres rapports de cas de la littérature.

Dans ce travail de fin d'études, nous avons analysé le statut mutationnel d'EGFR dans l'adénocarcinome, qui permis d'identifier les mutations d'EGFR, et ce, dans le but d'apporter le traitement le plus approprié et ciblé pour contrôler la voie de signalisation d'EGFR impliquée dans le processus de cancérisation dans le cancer du poumon.

Comprendre et rechercher les altérations moléculaires ainsi que détecter la mutation EGFR de résistance T790M dans l'exon 20 est une priorité élevée, ainsi savoir diminuer la toxicité des ITK's, tout pour l'espoir d'augmenter considérablement les taux de guérison du cancer du poumon.

**Mots clés :** Adénocarcinome pulmonaire ; Thérapie moléculaire ciblée, EGFR . Cancer bronchique à non-petite cellules.

## Abstract

Bronchopulmonary cancer is the most common cancer in the world; it constitutes a major public health problem due to its high mortality. Generally, it is diagnosed at the locally advanced and metastatic stage because it remains asymptomatic for a long time, there are 2 types of small cell lung cancer and the non-small cell category (CNPC) consisting mainly of adenocarcinoma, represents approximately 80% of lung cancers characterized by a mutational profile marked, among other things, by the alteration of the EGFR gene which is a transmembrane protein frequently overexpressed and activated in an aberrant way, thus justifying the development of targeted therapies, in particular, tyrosine kinase inhibitors of the receptor epidermal growth factor (EGFR ITK). A molecular diagnosis is crucial in order to be able to initiate a targeted therapy.

This retrospective and prospective study of the anatomopathological and molecular aspect of bronchopulmonary cancer, carried out in the anatomy and pathological cytology department at CHU ISSAD HASSANI BENI MESSOUS, which aims to study the mutational profile of EGFR present in 19 patients with bronchial adenocarcinoma, 8 of which are female (42%) and 11 male (58%). Point mutations in exons 18 to 20 of the EGFR gene were screened for by real-time PCR using Idylla software.

The demographic characteristics of the cohort were determined. The age of this series of patients varies between 45 and 80 years, with an average age of 63.64 years and a male predominance with a sex ratio of 1.37 M/F.

We found 7 negative cases and 3 inconclusive and 9 positive cases which included the following mutations: a rare exon 18 (G719A/C/S) double mutation with exon 20 (S768I), exon 19 deletions, insertions of exon 20 and mutation (G719A/C/S) of exon 18, they will receive ITK-type treatment intravenously, The above results in our studies were limited by the number of patients studied and the region. We discuss our case with other case reports from the literature.

In this end-of-study work, we analyzed the mutation status of EGFR in adenocarcinoma, which made it possible to identify EGFR mutations, in order to provide the most appropriate treatment and targeted to control the EGFR signaling pathway involved in the carcinogenic process in lung cancer.

Understanding and researching molecular alterations as well as detecting the resistance EGFR mutation T790M in exon 20 is a high priority, thus knowing how to decrease the toxicity of TKI's, all for the hope of considerably increasing the cure rates of lung cancer.

**Keywords:** Pulmonary adenocarcinoma; Targeted molecular therapy, EGFR. Non-small cell lung cancer.

## ملخص

يعتبر سرطان القصبات الرئوية أكثر أنواع السرطانات شيوعاً في العالم، ويشكل مشكلة صحية عامة كبيرة بسبب ارتفاع معدل الوفيات فيه. بشكل عام ، يتم تشخيصه في المرحلة المتقدمة محلياً والنقائل لأنه يظل بدون أعراض لفترة طويلة ، وهناك نوعان من سرطان الرئة ذو الخلايا الصغيرة وفئة الخلايا غير الصغيرة (CNPC) التي تتكون أساساً من سرطان الغدة ، تمثل ما يقرب من 80 ٪ من سرطانات الرئة التي تتميز بخصائص طفرات مميزة ، من بين أشياء أخرى ، عن طريق تغيير جين EGFR وهو بروتين عبر الغشاء يتم التعبير عنه بشكل مفرط وتنشيطه بطريقة شاذة ، وبالتالي يبرر تطوير العلاجات المستهدفة ، على وجه الخصوص ، مثبطات التيروسين كيناز من عامل نمو البشرة المستقبلي. يعد التشخيص الجزيئي أمراً بالغ الأهمية من أجل التمكن من بدء العلاج الموجه.

هذه الدراسة بأثر رجعي للجانب التشريحي المرضي والجزيئي لسرطان القصبات الهوائية، والتي أجريت في قسم علم التشريح وعلم الخلايا المرضية في مستشفى حساني بني ميسوس، والتي تهدف إلى دراسة المظهر الطفري لـ EGFR الموجود في 19 مريضاً يعانون من سرطان الغدة الشعب الهوائية، 8 منهم هم أنثى (42٪) و 11 ذكور (58٪). تم فحص الطفرات النقطية في 18 exons إلى 20 من جين EGFR بواسطة PCR في الوقت الحقيقي باستخدام برنامج Idylla .

تم تحديد الخصائص الديموغرافية للفوج. يتراوح عمر هذه السلسلة من المرضى بين 45 و 80 عامًا، بمتوسط عمر يبلغ 63.64 عامًا ونسبة غلبة للذكور تبلغ 1.37 م / س.

وجدنا 7 حالات سلبية و 3 حالات غير حاسمة و 9 حالات إيجابية تضمنت الطفرات التالية: طفرة مزدوجة exon (G719A / C / S) 18 نادرة مع (S768I) exon 20 ، حذف exon 19 ، إدخال exon 20 طفرة (G719A / C / S) من exon 18. سيحصلون على علاج من نوع ITK عن طريق الوريد. كانت النتائج المذكورة أعلاه في دراستنا محدودة بعدد المرضى الذين تمت دراستهم والمنطقة. نناقش حالتنا مع تقارير الحالة الأخرى من الأدبيات.

في عمل نهاية الدراسة هذا، قمنا بتحليل حالة الطفرة في EGFR في الورم الغدي، مما جعل من الممكن تحديد طفرات EGFR ، من أجل توفير العلاج الأنسب والمستهدف للتحكم في مسار إشارات EGFR المتضمن في العملية المسببة للسرطان في سرطان الرئة.

يعد فهم التغييرات الجزيئية والبحث فيها وكذلك اكتشاف مقاومة طفرة EGFR T790M في إكسون 20 أولوية عالية، وبالتالي معرفة كيفية تقليل سمية TKI ، كل ذلك على أمل زيادة معدلات علاج سرطان الرئة بشكل كبير.

**الكلمات المفتاحية:** سرطان الغدة الرئوية. العلاج الجزيئي المستهدف مستقبل عامل نمو البشرة، EGFR سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة.

<b>Liste des figures :</b>		
<b>Figure 1</b>	<i>Évolution du cancer des poumons</i>	<b>2</b>
<b>Figure 2</b>	<i>Diagramme Taux d'incidence normalisés selon l'âge (monde) par sexe, 10 principaux cancers en 2020 en Algérie.</i>	<b>3</b>
<b>Figure 3</b>	<i>Diagramme Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge (monde),10 principaux cancers en 2020.</i>	<b>4</b>
<b>Figure 4</b>	<i>Quelques symptômes et facteurs de risque causant le NSCLC chez l'homme</i>	<b>5</b>
<b>Figure 5</b>	<i>Un graphique circulaire représentant la classification du cancer du poumon ainsi que les caractéristiques, l'origine et l'histopathologie de chaque type.</i>	<b>6</b>
<b>Figure 6</b>	<i>Histo-pathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires</i>	<b>7</b>
<b>Figure 7</b>	<i>Une coupe histologique d'une pièce d'adénocarcinome pulmonaire par microscope optique (X4, X40) hôpital BENI MESSOUS</i>	<b>8</b>
<b>Figure 8</b>	<i>Classifications TNM des CBNPC.</i>	<b>10</b>
<b>Figure 9</b>	<i>Les altérations génétiques et moléculaires fréquentes au cours de la progression des NSCLC (adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes).</i>	<b>11</b>
<b>Figure 10</b>	<i>Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.</i>	<b>12</b>
<b>Figure 11</b>	<i>Evolution de la segmentation des CBNPC : l'histologie à la biologie moléculaire</i>	<b>12</b>
<b>Figure 12</b>	<i>Un graphique circulaire déterminant les fréquences des différentes mutations motrices dans l'adénocarcinome pulmonaire</i>	<b>13</b>
<b>Figure 13</b>	<i>Les domaines protéiques et la structure moléculaire du récepteur à l'EGFR</i>	<b>16</b>
<b>Figure 14</b>	<i>Structure du récepteur de l'Epidermal Growth Factor Receptor, fixation du ligand et activation du récepteur par dimérisation</i>	<b>17</b>
<b>Figure 15</b>	<i>montre la Régulation de l'activité du récepteur de l'EGFR</i>	<b>18</b>
<b>Figure 16</b>	<i>Caricature montrant la structure du domaine EGFR kinase dans la conformation active et inactive</i>	<b>19</b>
<b>Figure 17</b>	<i>Conséquences biologiques des mutations L858R et Del19 de l'EGFR dans les CBNPC</i>	<b>19</b>
<b>Figure 18</b>	<i>Diagramme de sucette montrant la position des mutations de l'EGFR et les caractéristiques structurales de l'EGFR</i>	<b>20</b>
<b>Figure 19</b>	<i>Diagramme circulaire montrant les fréquences des mutations de l'EGFR dans le NSCLC. Les données ont été acquises à partir des bases de données COSMIC</i>	<b>21</b>
<b>Figure 20</b>	<i>Voie de signalisation de l'EGFR</i>	<b>22</b>
<b>Figure 21</b>	<i>Chronologie du développement des TKI EGFR</i>	<b>25</b>
<b>Figure 22</b>	<i>Les altérations d'EGFR avec la thérapie ciblée dans CBNPC</i>	<b>25</b>
<b>Figure 23</b>	<i>Représentation schématique du rôle du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans le cancer et son inhibition par le gefitinib</i>	<b>26</b>
<b>Figure 24</b>	<i>Répartition des facteurs de résistance acquise aux EGFR-TKI</i>	<b>28</b>
<b>Figure 25</b>	<i>Présentation générale du principe des dosages Idylla™</i>	<b>31</b>
<b>Figure 26</b>	<i>Schéma représentant le principe de la PCR en temps réel</i>	<b>32</b>
<b>Figure 27</b>	<i>principe de dosage Idylla™</i>	<b>33</b>
<b>Figure 28</b>	<i>Présentation des étapes de réalisation du test de mutation EGFR Idylla™</i>	<b>34</b>
<b>Figure 29</b>	<i>présentation des résultats d'une mutation de l'exon 19 rapporté par Le système Idylla™</i>	<b>35</b>
<b>Figure 30</b>	<i>rapport du résultat du test Idylla™</i>	<b>35</b>
<b>Figure 31</b>	<i>Principe de l'immuno-histochimie</i>	<b>36</b>
<b>Figure 32</b>	<i>Distributions des patients par sexe</i>	<b>39</b>
<b>Figure 33</b>	<i>Répartition des patients par tranche d'âge et par sexe</i>	<b>39</b>
<b>Figure 34</b>	<i>Vue microscopique d'un parenchyme pulmonaire sain HE (Gx4).</i>	<b>40</b>
<b>Figure 35</b>	<i>Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4)</i>	<b>40</b>

<b>Figure36</b>	<i>Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10)</i>	<b>41</b>
<b>Figure37</b>	<i>Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40).</i>	<b>41</b>
<b>Figure38</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4)</i>	<b>42</b>
<b>Figure39</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10)</i>	<b>42</b>
<b>Figure40</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40)</i>	<b>43</b>
<b>Figure41</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire TTF1 positif marquage nucléaire intense et diffusion des cellules tumorales IHC (Gx4 )</i>	<b>43</b>
<b>Figure42</b>	<i>Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire TTF1 positif IHC (Gx40).</i>	<b>43</b>
<b>Figure 43</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4)</i>	<b>44</b>
<b>Figure 44</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10)</i>	<b>44</b>
<b>Figure45</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40).</i>	<b>45</b>
<b>Figure46</b>	<i>biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire TTF1 positif IHC (Gx40).</i>	<b>45</b>
<b>Figure47</b>	<i>nombre de patients qui manifestent la mutation EGFR</i>	<b>46</b>
<b>Figure48</b>	<i>Répartition de mutations par patients</i>	<b>47</b>
<b>Figure49</b>	<i>Répartition des mutations par sexe.</i>	<b>47</b>
<b>Figure50</b>	<i>Répartition des mutations du gène EGFR</i>	<b>48</b>

<b>Liste des tableaux :</b>		
<b>Tableau 1</b>	<i>localisation préférentielle des métastases en fonction des tumeurs primitives</i>	<b>2</b>
<b>Tableau 2</b>	<i>Incidence, mortalité et prévalence selon le siège du cancer en 2020 en Algérie</i>	<b>3</b>
<b>Tableau 3</b>	<i>Les caractéristiques de l'adénocarcinome pulmonaire</i>	<b>8</b>
<b>Tableau 4</b>	<i>Association possible entre le type d'altération génétique et l'adénocarcinome pulmonaire.</i>	<b>13</b>
<b>Tableau 5</b>	<i>Principaux oncogènes activés dans la tumorigènes des CBNPC</i>	<b>14</b>
<b>Tableau 6</b>	<i>Principaux gènes suppresseurs de tumeur inactivés dans la tumorigènes des CBNPC</i>	<b>15</b>
<b>Tableau 7</b>	<i>Les inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase (TKI) qui ciblent l'EGFR</i>	<b>26</b>
<b>Tableau 8</b>	<i>Répartition du nombre de mutation par patient.</i>	<b>46</b>
<b>Tableau 9</b>	<i>Tableaux résumant le profil mutationnelle EGFR et le profil immunohistochimique chez une série de 19 patients</i>	<b>48</b>

## Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I Généralité.....	2
1. Cancer de poumon.....	2
1.1. Définition du cancer de poumon.....	2
1.2. Métastase du cancer bronchique .....	2
2. Epidémiologie .....	3
3. Les facteurs de risques du cancer broncho-pulmonaire .....	4
3.1. Tabagisme active .....	4
3.2. Tabagisme passif .....	4
3.3. Autres facteurs.....	5
4. Classification histologique .....	6
4.1. Le cancer du poumon à petites cellules (CBPC).....	6
4.2. Cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC).....	6
4.2.1. L'adénocarcinome .....	8
5. Diagnostic.....	9
5.1. Étape clinique .....	9
5.2. Étape radiologique .....	9
5.3. Etape endoscopique .....	9
5.4. Autres moyens de diagnostic .....	9
5.5. Étape anatomopathologique .....	9
6. CLASSIFICATION TNM 8ème EDITION.....	10
7. Cancérogenèse moléculaire broncho-pulmonaire.....	11
7.1. Les principaux composants des voies altérées dans les carcinomes broncho-pulmonaires.....	11
7.2. Mutations courantes dans le carcinome non à petites cellules .....	12
7.2.1. Mutations associées au CBNPC/adénocarcinome pulmonaire.....	12
8. EGFR .....	16
8.1. Régulation de l'activité de récepteur tyrosine kinase l'EGFR.....	18
8.2. Mutations d'exons du gène d'EGFR.....	20
8.2.1. Exon 18.....	21
8.2.2. Exon 19.....	21
8.2.3. Exon 20.....	21
8.2.4. Exon 21.....	21
8.3. Les voies de signalisation d'EGFR.....	22
8.3.1. La voie des RAS/RAF/MAPK.....	22
8.3.2. La Voie PI3K /AKT/mTOR).....	23
8.3.3. La voie des JAK/STAT.....	23

<b>9. Traitement .....</b>	<b>24</b>
<b>9.1. Thérapies ciblées .....</b>	<b>24</b>
<b>9.1.1. Les TKI et leur ciblage selon les mutations d'EGFR.....</b>	<b>25</b>
<b>9.1.1.1. Géfitinib.....</b>	<b>26</b>
<b>9.1.1.2. Erlotinib .....</b>	<b>27</b>
<b>9.1.1.3. Afatinib.....</b>	<b>27</b>
<b>9.1.1.4. Dacomitinib.....</b>	<b>27</b>
<b>9.1.1.5. Osimertinib .....</b>	<b>28</b>
<b>Chapitre II MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>29</b>
<b>1. Matériels .....</b>	<b>29</b>
<b>1.1. Matérielles biologique .....</b>	<b>29</b>
<b>1.2. Matériels non biologique.....</b>	<b>29</b>
<b>2. Méthodes.....</b>	<b>30</b>
<b>2.1. L'étude histologique.....</b>	<b>30</b>
<b>2.2. Recherche des mutations du gène EGFR par PCR en temps réel.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.1. Le test idylla de mutation EGFR.....</b>	<b>31</b>
<b>2.2.2. Le principe de PCR en temps réel .....</b>	<b>32</b>
<b>2.2.3. Principe de dosage Idylla™.....</b>	<b>33</b>
<b>2.2.4. Les étapes de réalisation de l'étude du statut mutationnelle d'EGFR.....</b>	<b>34</b>
<b>2.2.5. Rapport et analyses des data.....</b>	<b>35</b>
<b>2.3. Etude immunohisochimique .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.1. Technique d'immunohistochimie .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.2. Principe de l'immunohostochimie .....</b>	<b>36</b>
<b>2.3.3. Protocole général d'immunohistochimie (IHC).....</b>	<b>36</b>
<b>Chapitre III Résultats .....</b>	<b>39</b>
<b>1. Caractéristiques de la population étudiée.....</b>	<b>39</b>
<b>2. Profil histologique .....</b>	<b>40</b>
<b>3. Résultats de la technique de biologie moléculaire.....</b>	<b>46</b>
<b>3.1. Type de mutations du gène de l'EGFR trouvés.....</b>	<b>47</b>
<b>4. Etude immunohistochimique.....</b>	<b>48</b>
<b>Chapitre IV Discussion .....</b>	<b>49</b>
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>55</b>
<b>Références... ..</b>	<b>57</b>

Annexes

# ***LISTE DES ABREVIATIONS***

- **AA** : acide aminé
- **AC**: Anticorps
- **ADCC**: antibody-dependant cell mediated cytotoxicity
- **ADK/ADC**: adénocarcinome
- **ADN** : Acide désoxyribonucléique
- **AG**: Antigène
- **ALK**: Activin Receptor-Like Kinase
- **AREG**: amphireguline
- **ARN**: l'acide ribonucléique
- **ASCO**: American Society of Clinical Oncology
- **ATP** : adénosine-triphosphate.
- **BCat (CTNNB1)**: beta-catenine
- **CBNP** : cancer bronchique a non petites cellules
- **CBPC** : cancer bronchique à petites cellules
- **CDk 2** : kinase dépendante des cyclines
- **Chr**: chromosome
- **Ck7/20**: cytokératine 7/20
- **COSMIC**: COSMIC cancer database
- **DAB** : 3,3'-Diaminobenzidine
- **Del**: deletion
- **EGFR** : epidermal growth factor récepteur / Récepteur du facteur de croissance épidermique
- **EML4**: echinoderm microtubule associated protéine like 4
- **ERBB2** : récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER)
- **FDA**: Food and drug administration
- **FFPE**: formalin-fixed, paraffin-embedded
- **GFRI** : inhibiteur du récepteur du facteur de croissance épidermique
- **GLUT 4** : transporteur de glucose 4
- **GRB2** : protéine liée au récepteur du facteur de croissance 2.
- **GSK-3 $\beta$** : Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$
- **H2O2** : Le peroxyde d'hydrogène
- **HE** : hémato xylène
- **HE**: hematoxylin and eosin stain
- **HER**: Human Epidermal Growth Factor Receptor

- **HER2:** humain epidermal growth factor receptor
- **HRP :** La peroxydase de raifort
- **IHC:** immunohistochimie
- **INCa:** l'institut national du Cancer
- **JAK:** Janus Kinase
- **KDa :** (Métrologie) Symbole du kilodalton, unité de mesure de masse moléculaire
- **Kras :** Kristen rat sarcoma virus
- **MAPK:** mitogene activated protéine kinase
- **MEK:** mitogene activated protéine kinase kinase
- **MET:** mesenchymal to epithelial transition
- **MTor:** mammalian target of rapamycin
- **MTOR:** mammalian target of rapamycin
- **Myc:** Master Regulator of Cell Cycle Entry and Proliferative Metabolism.
- **NF- $\kappa$  B:** Nuclear factor-kappa B
- **NK:** natural killer
- **OMC :** observation mondiale du Cancer
- **P63 :** Tumor protein 63s
- **PCR :** Polymérase Chaîne Réaction
- **PCR :** réaction en chaîne par polymérase
- **PI3K:** phosphoinositide 3 kinase
- **PIP2:** phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate
- **PIP3:** phosphatidylinositol-3, 4, 5-triphosphate
- **PKC:** protein kinase C
- **PLC :** phospholipase C
- **PTEN:** Phosphatase and TENsin homolog deleted on chromosome
- **PTEN:** Phosphatase and Tensin homologue
- **PTP :** Protein Tyrosine Phosphatase
- **PTP:** protéine phosphatase
- **RET :** Réarrangé pendant la transfection
- **ROS1:** proto-oncogene 1 récepteur tyrosine kinase
- **SH2:** src homology 2
- **Src :** proto-oncogène tyrosine-protéine kinase
- **SSP :** survie sans progression
- **STAT:** Signal Transducer and Activator of Transcription
- **STAT3 :** transducteur de signal et activateur de transcription 3

- **TBS:** Tris-Buffered Saline
- **TDM:** therapeutic drug monitoring
- **TGF- $\alpha$ :** Transforming growth factor alpha
- **TK:** tyrosine kinase
- **TKI:** tyrosine kinase inhibiteurs
- **TNM:** tumor (T), nodes (N), métastase (M)
- **TRS:** Target Retrieval Solution
- **TTF1:** thyroid transcription Factor -1
- **UX:** user experience
- **VIH:** human immunodeficiency virus
- **VPH:** Virus du papillome humain
- **Wnt:** wingless/integrated
- **WT:** wild type

# *Introduction*

### Introduction

Le cancer bronchique constitue un problème majeur de santé par sa fréquence et sa mortalité élevée, et présente un problème de santé majeur dans le monde et en Algérie. Le risque de ce cancer diffère selon l'âge, l'intensité du tabagisme et sa durée, qui reste la principale cause de cette maladie, cependant il peut aussi survenir chez des patients non-fumeur, le type histologique le plus répandu est l'adénocarcinome ou la mutation d'EGFR est la plus démontrée chez des patient non-fumeurs avec un taux de 15%.<sup>1</sup>

Parmi les facteurs incriminés dans les mécanismes de cancérogenèse, le récepteur de facteurs de croissance épidermique (EGFR) au niveau de la surface des cellules tumorales et leur rôle consiste à envoyer un signal de croissance au noyau de la cellule et qui se trouve surexprimé dans l'ensemble des carcinomes bronchiques non à petites cellules (CBNPC).<sup>3</sup>

Les cellules tumorales porteuses de mutations de l'EGFR sont très sensibles aux traitements anticancéreux appelés « Thérapies ciblées » ou « Inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR ». <sup>2</sup> Il est important d'identifier les mutations de l'EGFR pour proposer le traitement le plus approprié selon le statut mutationnel de la tumeur, le médecin proposera une prise en charge adaptée.

Dans le cadre de notre projet de fin d'études nous avons effectué une étude rétrospective concernant 19 patients atteints d'adénocarcinome bronchique avec mutation de l'EGFR.

L'objectif de ce travail était de Rapporter, Analyser et discuter les données épidémiologiques, histologique, immunohistochimique et moléculaire relative à la cohorte étudiée.

Etudier la distribution des mutations de l'EGFR d'une série de 19 patients et montrer l'intérêt thérapeutique d'ITK d'EGFR.

# *Chapitre I: Généralités*

## Chapitre I Généralités

### 1. Cancer de poumon

#### 1.1. Définition du cancer de poumon

Le cancer du poumon, appelé également "cancer bronchique" ou "cancer broncho-pulmonaire", est une tumeur maligne développée à partir des cellules de revêtement des bronches, des bronchioles ou des alvéoles pulmonaires.<sup>4</sup> Et se développe lorsqu'un groupe de cellules anormales commence à se multiplier et à former des bosses appelées tumeurs. Le cancer du poumon peut également se propager vers d'autres parties du corps (**figure 1**).<sup>1</sup>

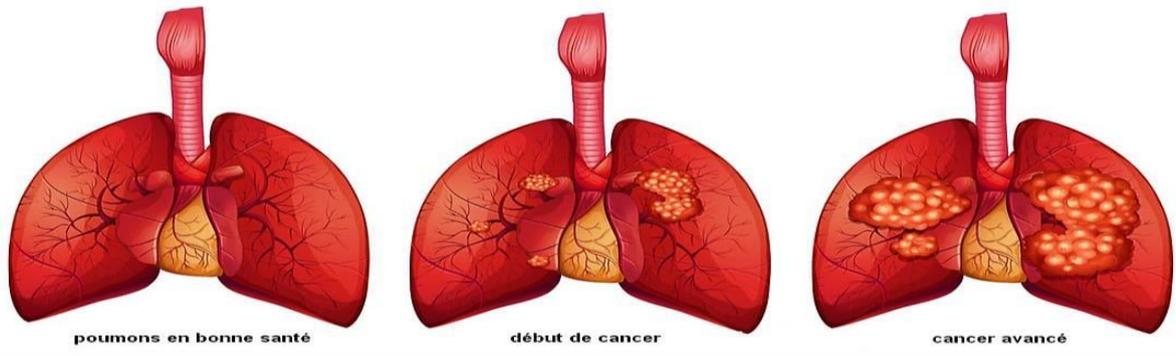


Figure 1. Évolution du cancer des poumons.<sup>4</sup>

#### 1.2. Métastase du cancer bronchique

Le cancer qui prend naissance dans les poumons est différent porte le nom de cancer primitif du poumon, les métastases entraînent finalement des symptômes qui varient selon la topographie.<sup>43</sup> Si le cancer du poumon se propage, au dépend des organes suivants: <sup>2</sup>

Tableau 1. La localisation préférentielle des métastases en fonction des tumeurs primitives.<sup>2</sup>

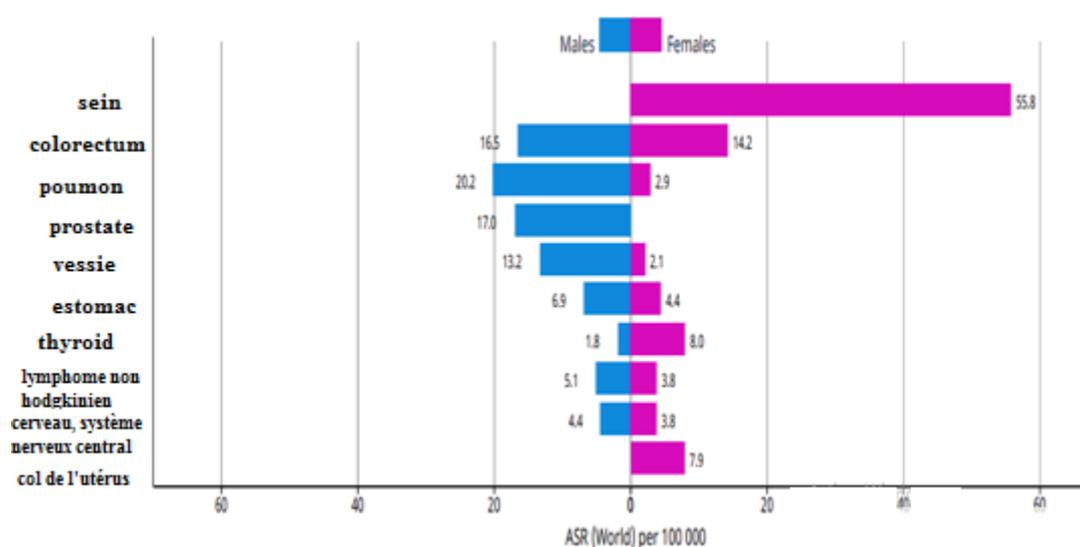
Localisation préférentielle des	Métastases en Fonction des tumeurs primitives :
Tumeur primitive	Fréquence métastatique
Cancer broncho-pulmonaire	<p><b>Foie</b> : entraîne des douleurs, des nausées, une satiété précoce et, au stade ultime, une insuffisance hépatique.</p> <p><b>Encéphale</b> : métastases cérébrales peuvent être la 1ere manifestation clinique du carcinome cause de troubles du comportement, confusion mentale, aphasia, convulsions, parésies ou paralysies, nausées et vomissements et, au stade ultime, le coma et la mort.</p> <p><b>Os, peau</b></p> <p><b>Glandes surrénales, Ganglions lymphatiques</b> à intérieur et La membrane autour du poumon et du thorax et autour de la Clavicule, paroi thoracique, trachée.</p> <p>Diaphragme, Colonne vertébrale, Autre poumon, Œsophage et Cœur.</p>

## 2. Epidémiologie

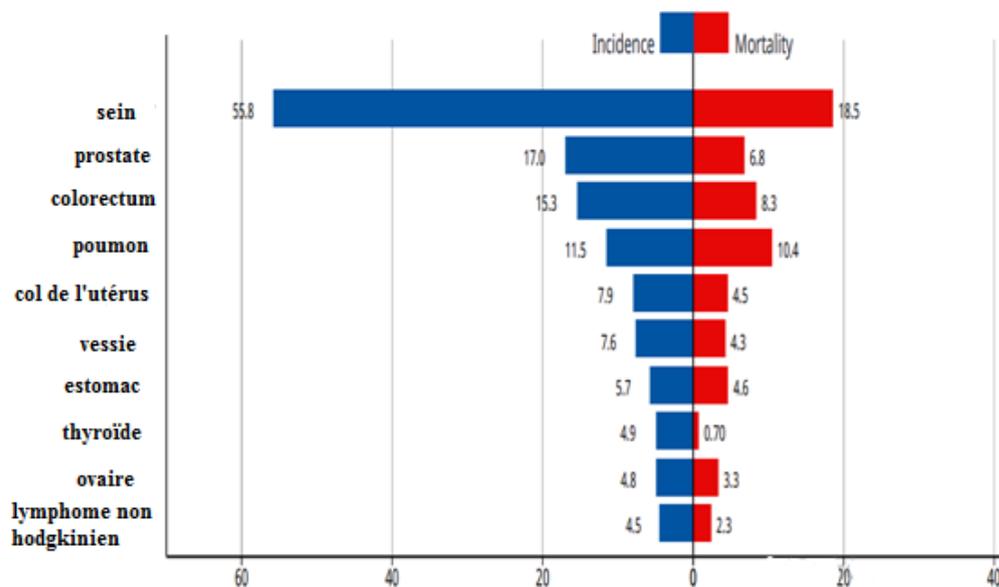
À l'origine de près de 10 millions de décès en 2020, le cancer est l'une des principales causes de mortalité dans le monde. Le cancer du poumon était un des cancers le plus courants en termes de nombre de cas recensés se classant en deuxième place en terme d'incidence (2,21 millions de cas) et le premier en termes de décès (1,80 million).<sup>3</sup> Selon l'OMS, le registre algérien des cancers indique un nombre de 4 774 nouveaux cas de cancer broncho pulmonaire ce qui représente (8,2%) des nouveaux cas en 2020 pour les deux sexes et tous âges confondus et 4 159 (15,2%) cas de sexe masculin.<sup>4</sup>

**Tableau 2.** Incidence, mortalité et prévalence selon le siège du cancer en 2020 en Algérie.<sup>4</sup>

Cancer	nouveaux cas				morts				Prévalence sur 5 ans	
	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Rank	(%)	Cum.risk	Number	Prop. (per 100 000)
Breast	12 536	1	21.5	5.62	4 116	2	12.5	1.96	38 886	179.22
Lung	4 774	2	8.2	1.41	4 333	1	13.2	1.29	5 006	11.42
Colon	3 811	3	6.5	1.05	2 174	3	6.6	0.55	9 263	21.12
Prostate	3 597	4	6.2	1.89	1 635	6	5.0	0.19	12 533	56.57
Bladder	3 201	5	5.5	0.93	1 861	5	5.7	0.45	8 823	20.12
Rectum	2 575	6	4.4	0.71	1 380	8	4.2	0.34	6 804	15.52
Stomach	2 396	7	4.1	0.68	1 947	4	5.9	0.54	3 482	7.94
Thyroid	2 170	8	3.7	0.51	310	20	0.95	0.07	7 145	16.29



**Figure 2.** Diagramme Taux d'incidence normalisés selon l'âge (monde) par sexe, 10 principaux cancers en 2020 en Algérie.<sup>4</sup>



**Figure 3.** Diagramme du Taux d'incidence et de mortalité normalisés selon l'âge (monde),des 10 principaux cancers en2020 <sup>4</sup>.

### 3. Les facteurs de risque du cancer broncho-pulmonaire

#### 3.1. Tabagisme active

Les symptômes du cancer du poumon se manifesteront à mesure que la maladie progresse.

Le tabagisme est considéré comme le facteur de risque majeur et le mieux établi de cancer du poumon. Le risque relatif de développement de ce dernier chez un fumeur de longue date comparé avec un jamais-fumeur est estimée à 10 à 30 fois.<sup>5</sup>

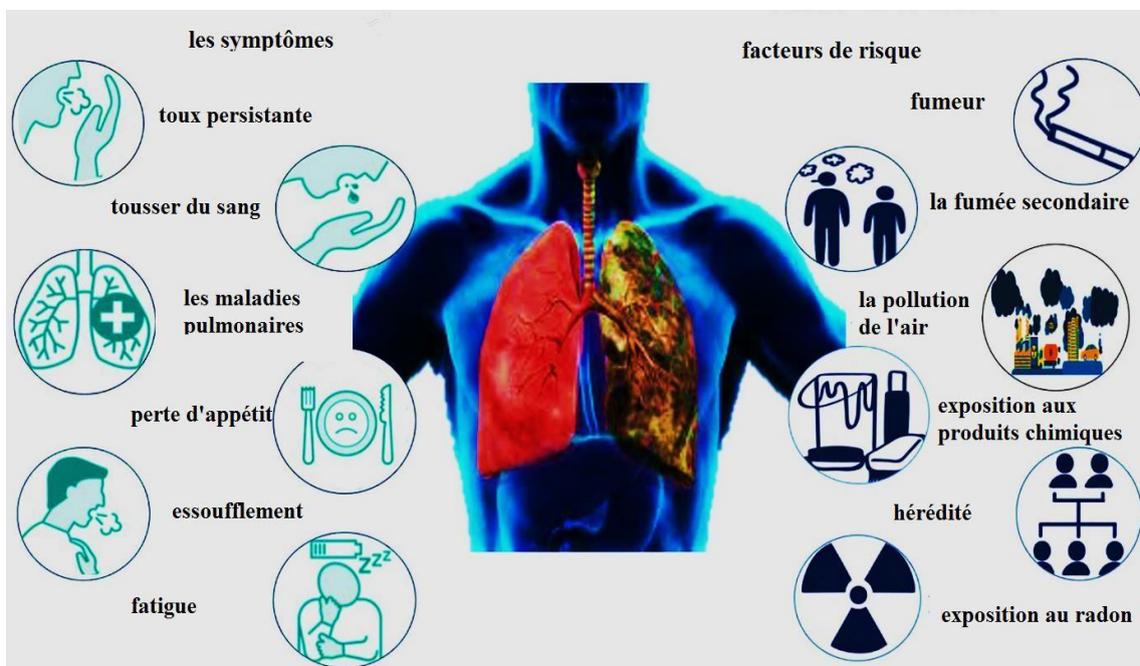
#### 3.2. Tabagisme passif

Ces dernières années on a observé un nombre croissant de cancers pulmonaires survenant chez les non-fumeurs, qui se défini comme des personnes ayant fumé moins de 100 cigarettes au cours de leur vie. Ce groupe comprend 15 % à 25 % de la population atteinte de cancer du poumon, avec 300 000 décès survenant chaque année. Ce sous-ensemble de patients atteints d'un cancer du poumon est plus susceptible d'être des femmes, ou le sous-types histologiques le plus fréquemment retrouver est l'adénocarcinome.<sup>6</sup>

### 3.3. Autres facteurs

De plus, bien qu'il soit établi que le tabagisme est la principale cause du cancer de poumon ; la pollution de l'air, l'exposition environnementale, les mutations et les polymorphismes mono nucléotidiques, l'exposition au radon, les risques professionnels, la fumée de combustible domestique (biomasse) et les maladies inflammatoires sont connus pour être associés aux développements cancer de ce dernier. <sup>7</sup>

En outre une mauvaise alimentation, la consommation d'alcool, la consommation de cannabis, les œstrogènes, les infections par le virus du papillome humain (VPH), le VIH sont suggérés comme étant liés à la carcinogénèse du poumon, mais des preuves claires pour déterminer leur relation ne sont pas disponibles (**figure 4**).<sup>7</sup>



**Figure 4.** Quelques symptômes et facteurs de risque causant le NSCLC chez l'homme.<sup>8</sup>

Le cancer du poumon non-fumeur est différent du cancer du poumon fumeur<sup>9</sup> :

- Habituellement, les patients atteints de cancer du poumon qui fument développent un cancer dans les cellules épithéliales squameuses, qui sont les zones les plus proches du centre des poumons.
- Cependant, les non-fumeurs atteints d'un cancer du poumon développent un cancer au centre des poumons et à la périphérie des poumons, loin des bronches.

## 4. Classification histologique

Le cancer du poumon est classé en 2 catégories principales :

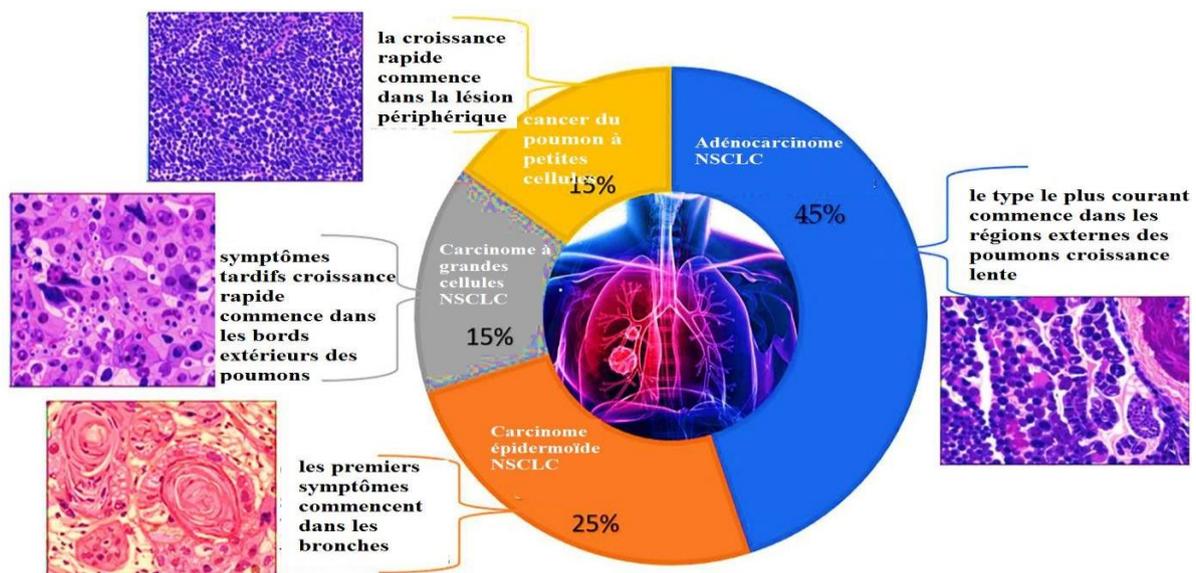
- Cancer du poumon à petites cellules, environ 15% des cas.
- Cancer du poumon non à petites cellules, environ 85% des cas

### 4.1. Le cancer du poumon à petites cellules (CBPC)

Qui se différencie des autres types de cancer du poumon par son origine neuroendocrine, un taux de doublement très rapide, pouvoir métastatique très important, grande sensibilité à la radiothérapie et à la chimiothérapie. Se croît rapidement et se propage souvent à d'autres parties du corps-ce cancer est lié au tabagisme et est rarement diagnostiqué chez les non- fumeurs.<sup>10</sup>

### 4.2. Cancer du poumon non à petites cellules (CBNPC)

Dérivent des cellules souches épithéliales de la muqueuse broncho-pulmonaire, est le type de cancer de poumon le plus répandu et qui se développe lentement. Le CNPC, est une catégorie constituée majoritairement par l'adénocarcinome. Lors du diagnostic, environ 70% des patients présentent une maladie localement avancée et/ou métastatique et ne sont pas opérables, on les classe comme suit <sup>10</sup> :



**Figure 5.** Un graphique circulaire représentant la classification du cancer du poumon ainsi que les caractéristiques, l'origine et l'histopathologie de chaque type.<sup>8</sup>

La plupart des cancers du poumon sont des carcinomes, en générale ils se développent à partir de l'épithélium bronchique des voies respiratoires larges et moyennes, et des alvéoles pulmonaires.<sup>11</sup> la figure 6 montre les filiations entre les différents types de cellules de l'épithélium broncho-pulmonaire et les carcinomes qui en dérivent. La flèche en pointillé illustre le caractère hypothétique de la filiation entre la cellule précurseur des carcinomes neuroendocrine et les cellules-souches de l'épithélium.<sup>11</sup>

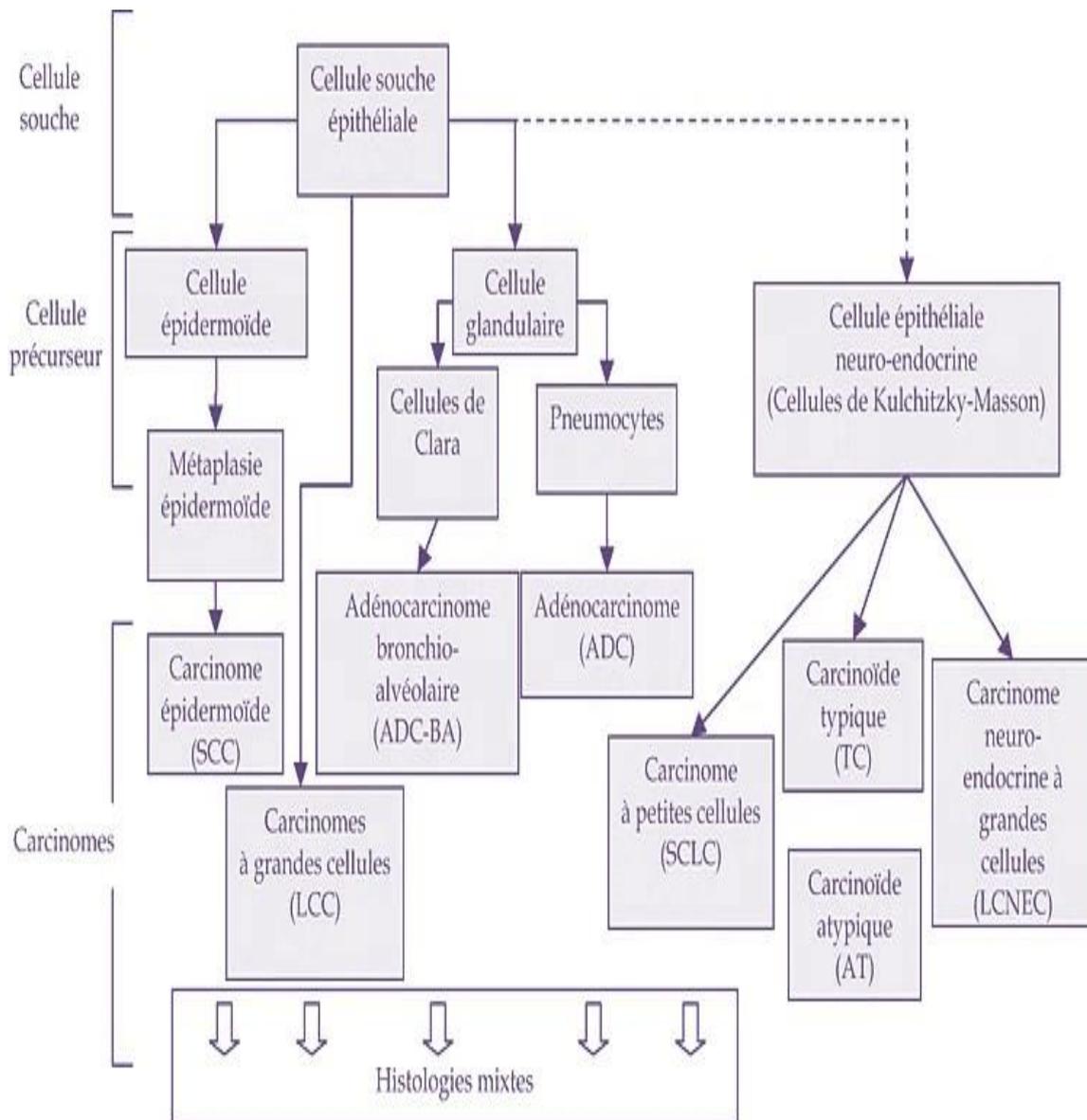
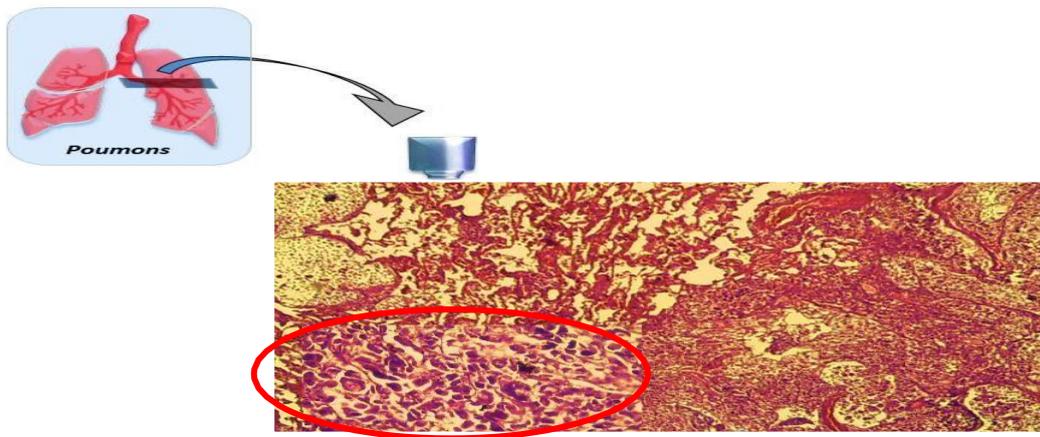


Figure 6. Histopathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires.<sup>11</sup>

**4.2.1. L'adénocarcinome**

L'adénocarcinome pulmonaire, représente plus du tiers des cancers non à petites cellules dont l'incidence est en augmentation constante depuis une décennie. C'est le type de cancer du poumon le plus commun chez la femme et chez les non-fumeurs.

L'adénocarcinome se développe dans les zones périphériques du poumon, en particulier au niveau des lobes supérieurs et près de la plèvre. La prolifération tumorale se fait à partir des glandes muqueuses situées sur la surface extérieure du poumon. Les adénocarcinomes peuvent varier à la fois par leur taille et par leur rapidité de développement.<sup>12</sup>



**Figure 7.** Une coupe histologique d'une pièce d'adénocarcinome pulmonaire par microscope optique (X4, X40) Hôpital BENI MESSOUS.

En immunohistochimie, ces cancers sont positifs pour un marquage par le Thyroïde Transcription Factor-1 (TTF1). Ils sont parfois associés à une addiction oncogénique, comme en cas d'une mutation d'EGFR (10% des cas), d'un réarrangement de ALK (5% des cas) ou un réarrangement de ROS1 (1% des cas).<sup>12</sup>. Il existe de nombreux sous-types différents d'adénocarcinome pulmonaire, tels que : solide, papillaire et mucineux. On les nomme en fonction de l'apparence des cellules observées au microscope, des différents aspects pris par les cellules ainsi que de la présence de mucus dans les cellules.<sup>13</sup>

**Tableau 3.** Les caractéristiques de l'adénocarcinome pulmonaire.<sup>13</sup>

Type histologique	Clinique	Macroscopie	Histologie	IHC	Diagnostic différentiel
ADC	Tabac Carcinome le plus fréquent chez les non-fumeurs (femme++)	Périphérique (sous pleural), blanc, lobulé, bien limité	Type mixte le + fréquent (80%) association de pattern acinaire, papillaire, broncho-pulmonaire, solide	CK7+ TTF+ CK20-	Métastase

**Le carcinome épidermoïde** représente le deuxième type le plus courant de cancer du poumon non à petites cellules.

**Le carcinome à grandes cellules** demeure un type très rare de cancer du poumon non à petites cellules.

### **5. Diagnostic**

#### **5.1. Étape clinique**

Les patients atteints d'un cancer du poumon sont presque toujours symptomatiques au moment du diagnostic. Les symptômes peuvent être causés par la tumeur primitive (p. ex., toux, hémoptysie); propagation intra thoracique (p. ex., syndrome de Horner, obstruction de la veine cave supérieure); et métastases à distance (p. ex., douleur osseuse).<sup>14</sup>

#### **5.2. Étape radiologique**

-Un cliché thoracique normal (5 % des cas) justifie la poursuite des explorations en cas de suspicion de cancer bronchique.

-La TDM thoracique en acquisition spiralée est plus sensible et est réalisée avant la bronchoscopie pour orienter les prélèvements endo-bronchiques des lésions périphériques.<sup>15</sup>

#### **5.3. Etape endoscopique**

Fibroscopie bronchique sous anesthésie locale (biopsies bronchiques, brossage à visée cytologique, lavage bronchique, ponction-aspiration trans-bronchique à l'aiguille) donne un diagnostic pour 90 % des tumeurs proximales.

#### **5.4. Autres moyens de diagnostic**

La cytologie d'expectoration ou d'aspiration bronchique peut être utile pour les tumeurs périphériques et les cancers bronchoalvéolaires.

La thoracotomie diagnostique (et thérapeutique) est proposée en l'absence de diagnostic Endoscopique si la probabilité de cancer est élevée et si le patient est opérable.

La ponction transpariétale à l'aiguille sous contrôle TDM est réservée aux patients inopérables ou en cas de faible probabilité de malignité ou si une chimiothérapie périopératoire, et donc une preuve histologique, est requise la médiastinoscopie, la ponction- aspiration transbronchique des ganglions médiastinaux et l'abord des métastases peuvent être utiles au diagnostic.<sup>15</sup>

#### **5.5. Étape anatomopathologique**

C'est l'étude histologique des prélèvements biopsiques avec immunohistochimie afin de confirmer le diagnostic.

## 6. CLASSIFICATION TNM 8ème EDITION

Les cellules cancéreuses se multiplient d'abord là où elles se trouvent et forment une masse. Lorsqu'il s'agit de stades avancés, le cancer se propage aux tissus et organes environnants <sup>16</sup>, le système **TNM** fournit une classification plus compréhensible des étapes :

- **T (évaluation par taille tumorale).**
- **N (évaluation selon l'envahissement ganglionnaire régional).**
- **M (métastase, évaluation selon atteinte tumorale à distance).**

Le stade anatomique de la maladie est déterminé en fonction des informations obtenues à partir du système **TNM**, qui seront discutées en détail ci-dessous. Ces stades vont de I à IV, et de petits nombres indiquent des stades précoces où le cancer s'est peu propagé, ce qui signifie que la tumeur est de petite taille. Ces étapes comptent parmi les déterminants les plus importants du plan de traitement.<sup>17</sup>

<b>T0</b>	Absence de tumeur
<b>TIS</b>	Carcinome in situ
<b>T1</b>	Tumeur < 3 cm entouré par du poumon ou plèvre viscérale sans invasion de la bronche lobaire
<b>T2</b>	Tumeur > 3 cm, envahissant plèvre viscérale ou associée à atélectasie, envahissement lobaire à plus de 2 cm de la carène
<b>T3</b>	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi, diaphragme, péricarde, à < 2 cm de la carène sans l'envahir
<b>T4</b>	Tumeur de toute taille envahissant cœur, gros vaisseaux, trachée, carène, œsophage, vertèbre, pleurésie maligne prouvé
<b>N0</b>	Pas de ganglion envahis
<b>N1</b>	Ganglion péribronchique ou hilair homolatéraux tumoraux
<b>N2</b>	Ganglions médiastinaux homolatéraux ou sous-carénaux tumoraux
<b>N3</b>	Ganglions hilaires ou médiastinaux controlatéraux, sus-claviculaires, scalènes tumoraux
<b>M0</b>	Absence de métastase à distance
<b>M1</b>	Présence de métastase à distance

Figure 8. Classifications TNM des CBNPC. <sup>17</sup>

**Le stade I :** est le stade où la tumeur ne se trouve que dans un poumon et non dans les ganglions lymphatiques.

**Le stade II :** est le stade où le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques autour du poumon où se trouve la tumeur (maladie localisé opérable et guérissable).

**Le stade III :** est le stade où le cancer s'est propagé aux ganglions lymphatiques autour de la trachée, de la paroi thoracique et du diaphragme du même côté que le poumon où se trouve la tumeur (maladie opérable).

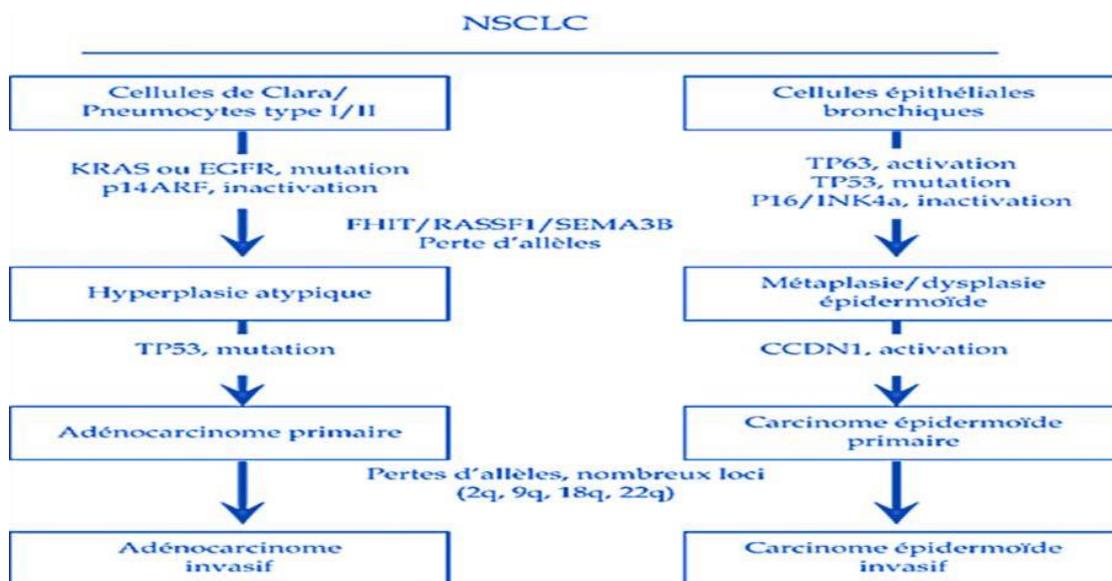
**Le stade III :** correspond à la propagation du cancer aux ganglions lymphatiques de l'autre poumon ou du cou.

**Le stade IV :** est le stade où le cancer s'est propagé au reste du corps et à d'autres parties des poumons (métastatique).

Les traitements des adénocarcinomes bronchiques dépendent du profil de biologie moléculaire.<sup>17</sup>

## 7. Cancérogenèse moléculaire broncho-pulmonaire

Les cancers broncho-pulmonaires se développent selon un processus multi-étape, caractérisé par une progression vers le phénotype invasif d'une ou d'un petit nombre de cellules « Initiées » par l'acquisition d'altérations génétiques leur conférant un avantage prolifératif. 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 hyper-méthylation des promoteurs) (**figure 9**).<sup>18</sup>



**Figure 9.** Les altérations génétiques et moléculaires fréquentes au cours de la progression des NSCLC (adénocarcinomes, carcinomes épidermoïdes).<sup>11</sup>

### 7.1. Les principaux composants des voies altérées dans les carcinomes broncho-pulmonaires

Les facteurs montrés dans la figure 10 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 cancérogènes environnementaux (tels que ceux présents dans la fumée du tabac).<sup>11</sup>

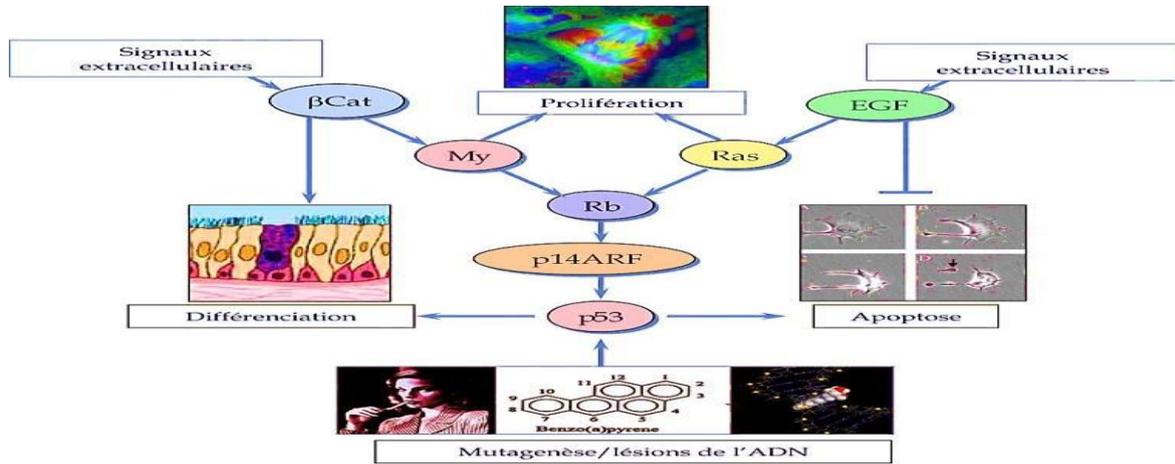


Figure 10. Mécanismes moléculaires de la cancérogenèse broncho-pulmonaire.<sup>11</sup>

## 7.2. Mutations courantes dans le carcinome non à petites cellules

Le type histologique seul ne suffit plus à la décision thérapeutique Il est recommandé depuis 2008 par les sociétés savantes et INCa de demander une recherche d'altérations moléculaires s'il y a suffisamment de matériel tumoral pour les patients ne relevant pas d'un traitement loco-régional pour : les CBNPC, non épidermoïdes de stade avancé et les cancers épidermoïdes chez les non-fumeurs. La recherche systématique de 7 biomarqueurs est réalisée en routine : les mutations EGFR, KRAS, BRAF, HER2 (Human epidermal growth factor receptor), MET (Mesenchymal to Epithelial Transition) et la recherche des réarrangements ALK et ROS1 (figure 11).<sup>19</sup>

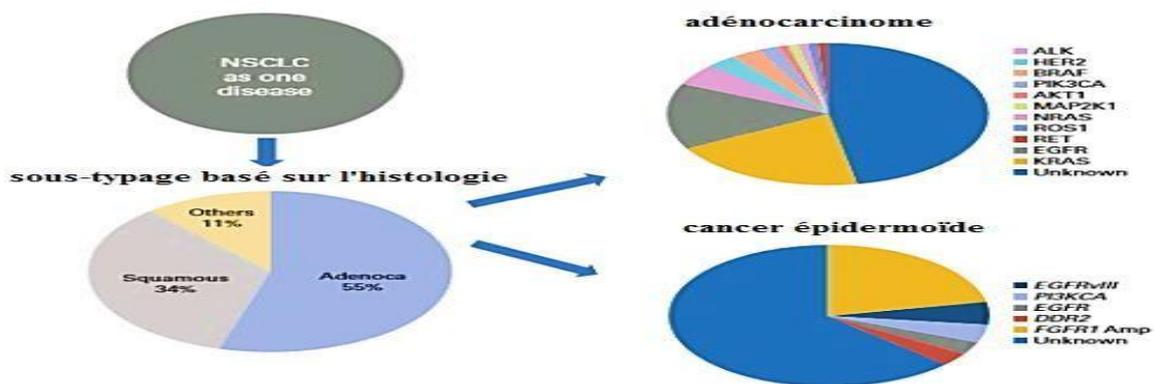


Figure 11. Evolution de la segmentation des CBNPC : l'histologie à la biologie moléculaire.<sup>19</sup>

7.2.1. Mutations associées au CBNPC/adénocarcinome pulmonaire

Trois mécanismes caractérisent ce cancer<sup>14</sup> :

- Mutation activatrice de gènes de récepteurs de facteurs de croissance (EGFR, HER2) et des voies de signalisation KRAS/BRAF/MEK et PIK3CA/AKT/mTOR.
- Une translocation des gènes ALK, ROS1, et RET.
- Des amplifications de gènes ou une surexpression de protéines membranaires (MET).

Les mutations les plus fréquemment retrouvées dans l'adénocarcinome pulmonaire sont mentionnées dans la figure 12. Ces mutations sont généralement activatrices et mutuellement exclusives.<sup>13</sup>

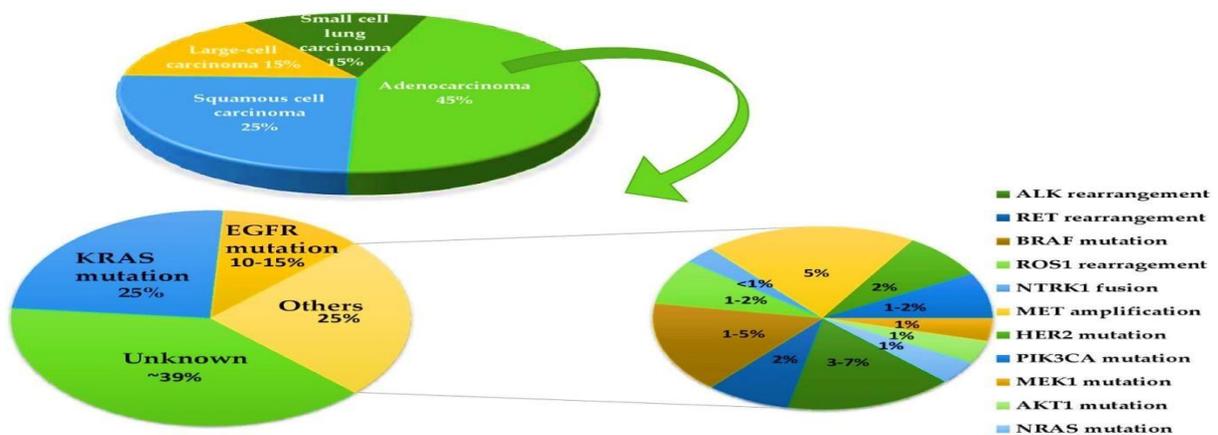


Figure 12. Un graphique circulaire déterminant les fréquences des différentes mutations motrices dans l'adénocarcinome pulmonaire.<sup>8</sup>

Les altérations génétiques les plus courantes dans l'adénocarcinome pulmonaire sont le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) après les mutations du KRAS, qui sert généralement à des insertions et les délétions et des mutations activatrices de KRAS.<sup>20</sup>

Tableau 4. Association possible entre le type d'altération génétique et l'adénocarcinome pulmonaire.<sup>21</sup>

Type de mutation/ altération	Sous-type histologique d'adénocarcinome
EGFR	Adénocarcinome bien différencié, avec composante bronchioloalvéolaire non mucineuse, papillaire et/ou micro-papillaire
KRAS	Adénocarcinome (bronchioloalvéolaire ou non) de type mucineux
BRAF	Adénocarcinome papillaire
ELM4-ALK	Adénocarcinome de type solide et/ou avec composante à cellules isolées
CTNNB1 (Bêta-caténine)	Adénocarcinome à cellules claires ou de type fœtal

L'apparition des tumeurs associée toujours avec une activation anormale des oncogènes et suppression des gènes suppresseurs des tumeurs, dans les tableaux suivants présent les principaux GST et oncogènes dans la tumorigènes des CBNPC.

**Tableau 5.** Principaux oncogènes activés dans la tumorigènes des CBNPC.<sup>22</sup>

Nom	Fonction	Mécanismes principaux d'activation	Fréquence
EGFR	Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER)	Mutations somatiques du domaine TK	10 à 40% ADC
		Amplification génique (copie du gène ou polysomie)	32 à 42% ADC
		Surexpression de la protéine	60% CBNPC (44% ADC - 82% SCC)
ERBB2	Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER)	Mutation du domaine TK	2 à 4% CBNPC (principalement ADC)
		Amplification génique	2 à 6% ADC
		Surexpression de la protéine	20% CBNPC
ERBB3	Récepteur aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase (famille HER)	Surexpression de la protéine	16% ADC - 29% SCC
K-Ras	Protéine G sous membranaire, transduction du signal de croissance	Mutations somatiques des codons 12 et 13	10 à 50% CBNPC (principalement ADC)
MET	Récepteur Tyrosine Kinase	Mutations somatiques	14% ADC
		Amplification génique	20% ADC
PI3KCA	Protéine kinase sous membranaire, transduction du signal de croissance	Amplification génique	4 à 6% CBNPC (surtout SCC)
		Mutations somatiques	2% CBNPC
TTF-1	Facteur de Transcription	Amplification génique et surexpression protéique	15% ADC
ALK	Récepteur Tyrosine Kinase	Fusion du gène ALK avec le gène EML4	3 à 7% CBNPC (presque exclusivement dans ADC)
c-Myc	Facteur de transcription	Amplification/Surexpression	2.5 à 10% CBNPC
β-caténine	Transducteur du signal de la voie Wnt	Mutations dans l'exon 3	10% des CBNPC (exclusivement ADC)

De nombreuses altérations génétiques ont été décrites dans le cancer bronchique, en particulier ce qui concerne la voie suppresseur de la tumeur p53 (tableau.6) et la voie oncogénique EGFR/KRAS (mentionner déjà dans tableau.5).<sup>23</sup>

**Tableau 6.** Principaux gènes suppresseurs de tumeur inactivés dans la tumorigènes des CBNPC.<sup>22</sup>

Nom	Fonction	Mécanismes principaux d'inactivation	Fréquence
p53	« Gardien du génome » : Facteur de transcription Contrôle du cycle cellulaire Réparation ADN Pro-apoptotique	Délétions homozygotes puis mutations	50% des CBNPC (dont 39 à 50% des ADC)
p16 <sup>INK4a</sup>	Inhibiteur des CDK 4/6 Régulation transition G1/S	Hyperméthylation du promoteur LOH ou Mutations ponctuelles Délétions homozygotes	40% à 58% des CBNPC (même fréquence SCC et ADC)
Rb	Contrôle du cycle cellulaire en G1/S par interaction avec E2F	LOH Inactivation de la protéine par hyper phosphorylation	15 à 30% des CBNPC (principalement dans SCC)
p14 <sup>ARF</sup>	Contrôle du cycle cellulaire G1/S/G2 Pro-apoptotique	LOH Hyperméthylation du promoteur	25% des CBNPC 40% des ADC
PTEN	Phosphatase à activité double (tyrosine et sérine/théonine). Cible majeure : AKT	Hyperméthylation du promoteur Délétions homozygotes Mutations ponctuelles	24% des cancers broncho-pulmonaires
FHIT	Dinucleoside hydrolase Arrêt du cycle G0/G1 Pro-apoptotique	LOH perte du bras court 3p Délétions homozygotes	40 à 80% CBNPC (principalement dans SCC)
RASSF1A	Régulateur négatif de G1/S Pro-apoptose	LOH perte du bras court 3p Hyperméthylation du promoteur	30 à 40% CBNPC
LKB1 /STK11	Sérine/théonine kinase Régulateur négatif du cycle en G1	Mutations Ponctuelles Délétions	8% des CBNPC (dont 34% ADC)

Dans le cancer bronchique, la TP53 est inactivée dans 40 à 60 % des cas, souvent par mutation d'un allèle et la délétion de l'autre allèle. Cette inactivation est précoce au cours de carcinogénèse bronchique puisqu'elle est détectée dès le stade d'hyperplasie adénomateuse atypique (lésion précurseur des adénocarcinomes). Une autre méta-analyse incluant 43 articles a trouvé que la p53 aberrante était un facteur de mauvais pronostic de survie avec le type histologique adénocarcinome pulmonaire.<sup>23</sup>

## 8. EGFR

Le gène **EGFR** également appelé ERBB1/HER1, est l'un des récepteurs tyrosine kinases de la famille des facteurs de croissance épidermiques (ERBB)<sup>24</sup>, code pour 1210 acides aminés avec une masse moléculaire d'environ 134 kDa situé sur le chromosome 7p12, est composé de 28 exons et 27 introns et code pour une protéine transmembranaire comportant un site extramembranaire (récepteur d'une courte séquence transmembranaire et d'une région cytoplasmique qui incorpore un domaine de protéine tyrosine kinase et un domaine de phosphorylation C-terminal).<sup>25</sup>

Cette glycoprotéine transmembranaire, fut le premier récepteur à tyrosine kinase caractérisé, ainsi que l'un des premiers proto-oncogènes identifiés. EGFR présente un rôle physiologique préférentiel dans le développement des tissus d'origine épithéliale<sup>30</sup> et des tissus nerveux et musculaires squelettiques<sup>24</sup>. Ainsi impliqué dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la métastase ainsi que la différenciation cellulaire, et favorisant la prolifération cellulaire, l'angiogenèse, l'invasion tumorale.<sup>26</sup>

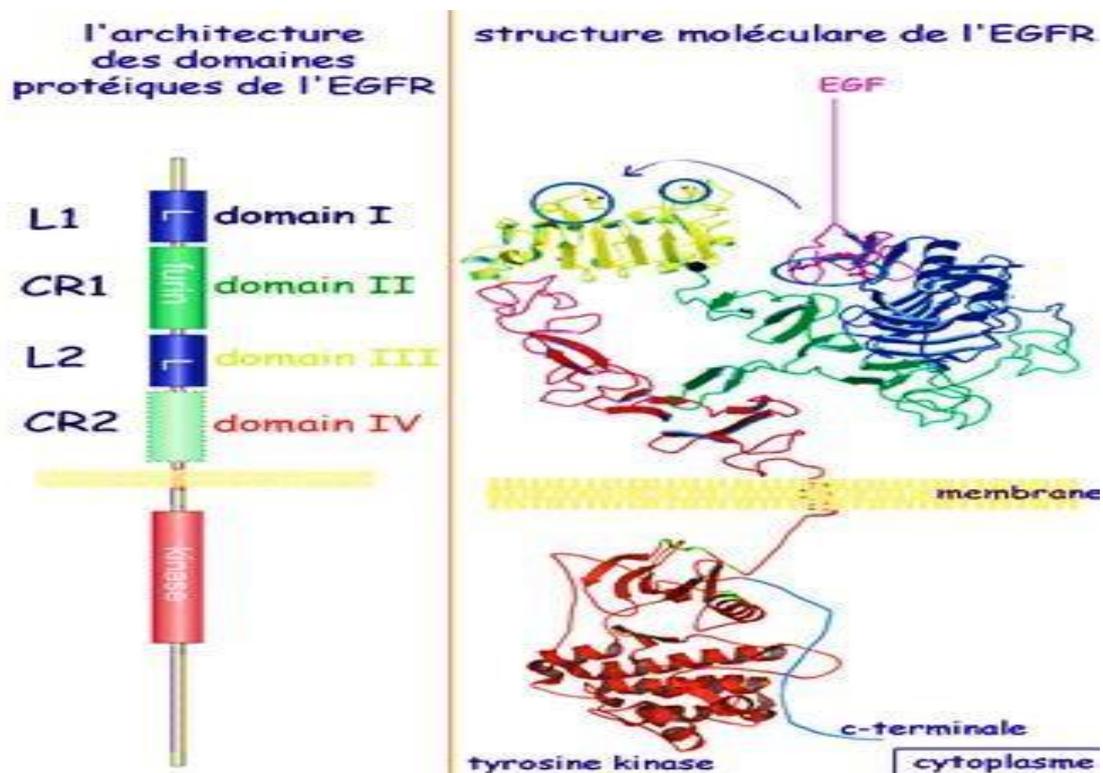


Figure 13. Les domaines protéiques et la structure moléculaire du récepteur à l'EGFR.<sup>27</sup>

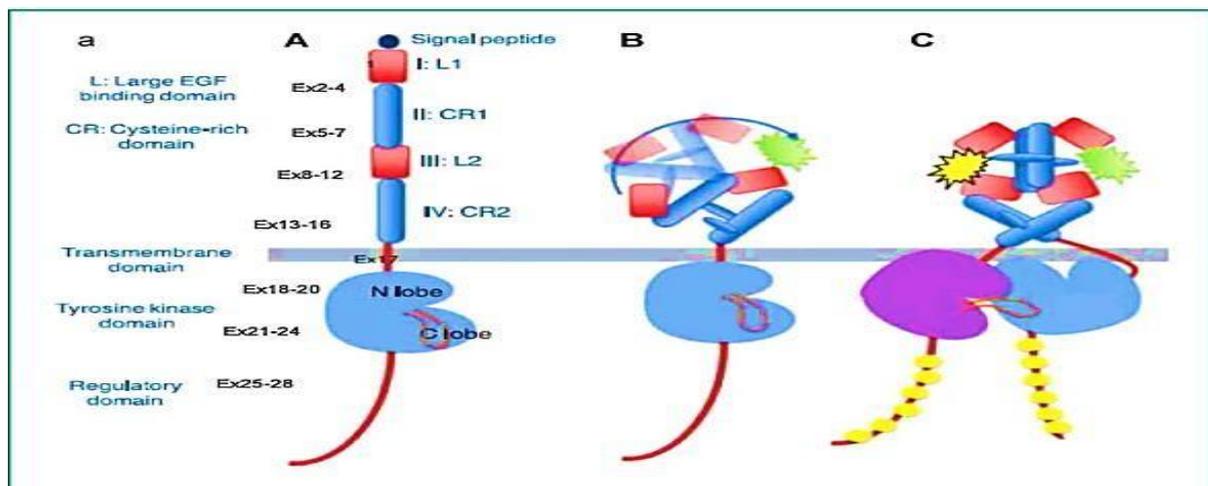
L'EGFR correspond au prototype des récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase et présente trois domaines fonctionnels<sup>26</sup>:

- ✓ Un domaine extracellulaire NH<sub>2</sub>-terminal situé dans le milieu extérieur qui contient le site de liaison capable de fixer ses ligands spécifiques.
- ✓ Un domaine transmembranaire, hydrophobe, qui permet au récepteur de rester ancré dans la membrane plasmique.
- ✓ Un domaine intracellulaire COOH-terminal, présentant une activité enzymatique tyrosine kinase. Ce domaine comporte un petit lobe qui contient un site de liaison de l'ATP et un grand lobe qui contient le site catalytique de l'enzyme et une extrémité riche en résidus tyrosine qui vont subir une phosphorylation.

Le récepteur est inactif sous sa forme de monomère, la fixation du ligand au domaine extracellulaire entraîne un changement de conformation qui favorise le rapprochement de deux monomères.<sup>26</sup>

Différents ligands de l'EGFR sont connus. L'EGF a été un des premiers facteurs de croissance découvert et fait partie d'une grande famille de facteurs de croissance comprenant le TGF- (Transforming Growth Factor- $\alpha$ ), l'amphiréguline, l'-celluline, l'épiréguline et l'héparine-binding EGF. Le TGF- et l'EGF sont des ligands spécifiques de l'EGFR qui jouent un rôle clé dans la modulation de la biologie cellulaire.<sup>26</sup>

Le récepteur activé est formé d'un homo- ou d'un hétéro-dimère, entre l'EGFR et un autre récepteur de la famille Erb. Le rapprochement des deux domaines TK aboutit à l'activation de cette fonction et permet l'auto- ou la trans-phosphorylation des différents résidus tyrosine situés à l'extrémité COOH-terminale intracellulaire du récepteur.<sup>26</sup>



**Figure 14.** Structure du récepteur du facteur de croissance épidermique, fixation du ligand et activation du récepteur par dimérisation.<sup>26</sup>

Le récepteur activé va pouvoir s'associer à différentes protéines adaptatrices intracellulaires permettant la transduction du signal implique essentiellement trois types de molécules : les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinases avant d'emprunter différentes voies de signalisation.<sup>26</sup>

### 8.1. Régulation de l'activité de récepteur tyrosine kinase l'EGFR

Deux processus existent donc pour arrêter le signal qui sont opérationnels dans toutes les cellules<sup>27</sup> :

- Par une protéine phosphatase (PTP) qui déphosphorylent la phosphotyrosine, évitant ainsi l'attachement des protéines effectrices.
- Internalisation et dégradation des récepteurs 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.<sup>27</sup>

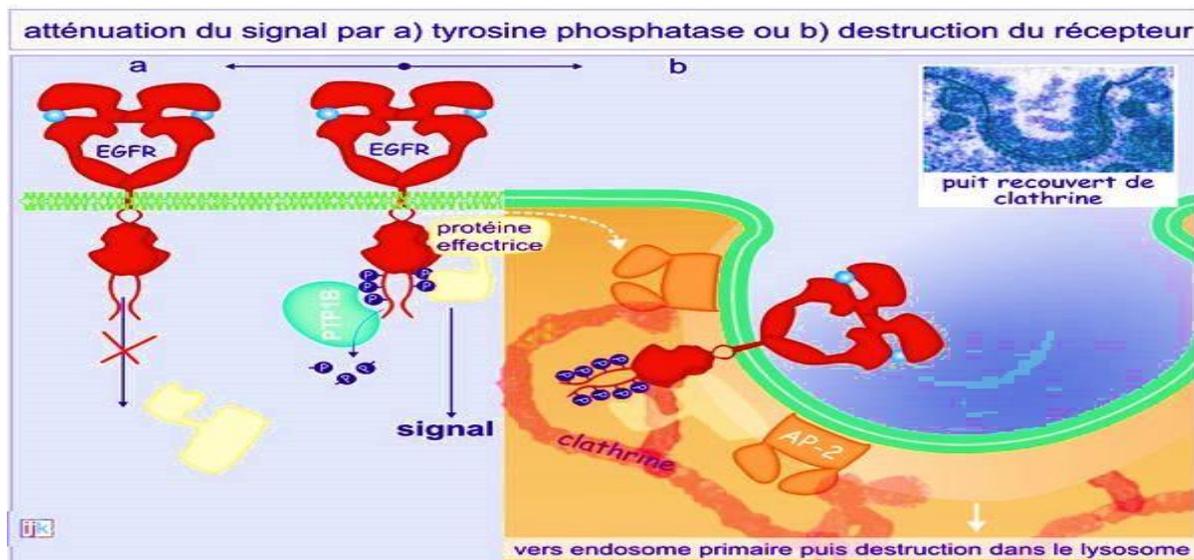


Figure 15. Montre la Régulation de l'activité du récepteur de l'EGFR<sup>27</sup>

Le domaine intracellulaire du côté C terminale constitué de 542 AA avec un domaine de liaison à l'ATP, Ce domaine comporte 2 lobes qui sont séparés par la fente de liaison à l'ATP (fig.16), le lobe N formé de brins  $\beta$  et de l'hélice  $\alpha$ C régulatrice et le lobe C est principalement  $\alpha$ -hélicoïdal et contient la boucle d'activation (boucle A) ou bien un site catalytique de l'enzyme plus une extrémité riche en résidus tyrosine qui vont subir une phosphorylation.<sup>26</sup>

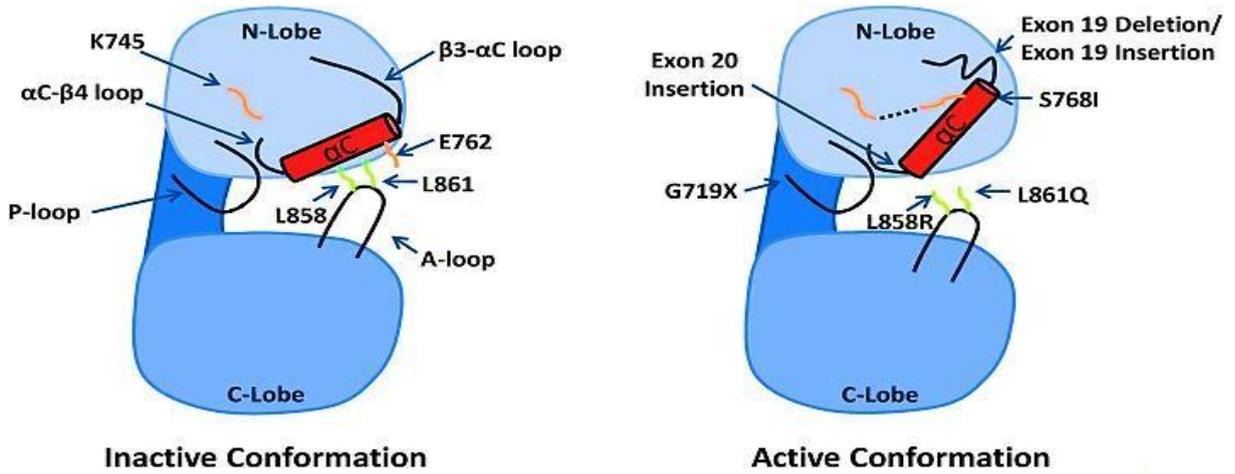


Figure 16. Caricature montrant la structure du domaine EGFR kinase dans la conformation active et inactive.<sup>28</sup>

A gauche, la conformation inactive est indiquée, et les résidus importants et les caractéristiques structurales sont étiquetés. A droite, la conformation active est indiquée et l'emplacement approximatif des mutations signalées dans le NSCLC est étiqueté. (Les lignes pointillées indiquent les interactions sel-pont).<sup>28</sup>

Des études structurales ont montré que les délétions de L858R et de l'exon 19 (Ex19Del) déstabilisent la conformation inactive du récepteur et entraînant une dimérisation et une activité accrue du récepteur.<sup>28</sup> Ces mutations activatrices classiques comprennent la grande majorité des mutations de l'EGFR et sont bien définies comme de puissants prédictors d'une bonne réponse clinique aux inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR (EGFRi).<sup>28</sup>

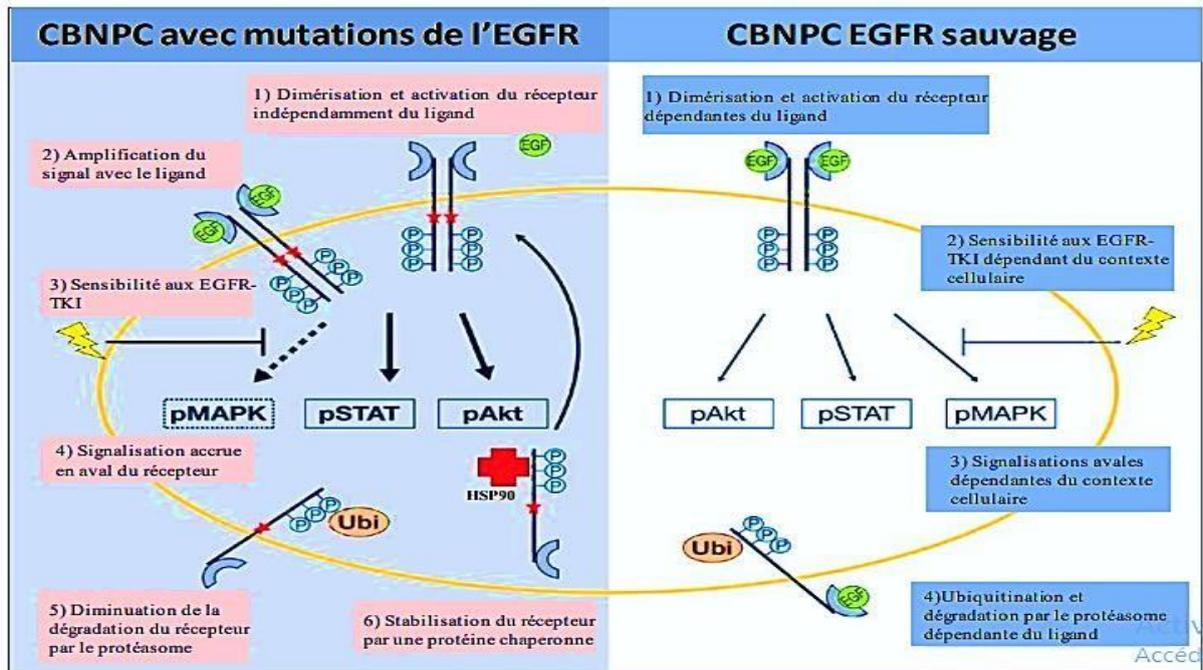


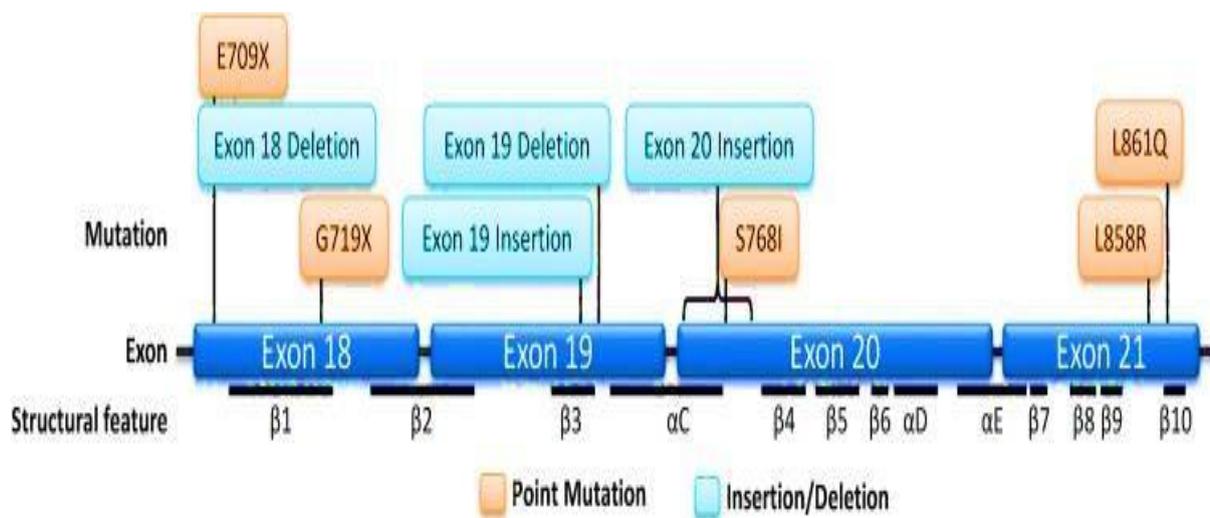
Figure 17. Conséquences biologiques des mutations L858R et Del19 de l'EGFR dans les CBNPC.<sup>22</sup>

La modulation de l'activité de l'EGFR peut schématiquement se faire à différents niveaux et de manière non exclusive et développement des phénomènes de résistance aux anti-EGFR peuvent résulter de plusieurs anomalies moléculaires<sup>29</sup>, Parmi les modes d'activation oncogénique d'EGFR ont été décrits<sup>12</sup> :

- Augmentation de l'expression d'EGFR par divers mécanismes : augmentation de la transcription, stabilisation par inhibition de son internalisation ou de sa dégradation, ou encore amplification du gène, dans environ 60 % des carcinomes épidermoïdes et 40 % des adénocarcinomes et carcinomes indifférenciés à grandes cellules.
- Sécrétion par la cellule de son propre ligand, EGF ou TGF- $\alpha$ , aboutissant à une activation autocrine du récepteur.
- Apparition de mutations oncogéniques activatrices.
- Activation indépendante ou constitutive d'effecteurs intracellulaires en aval d'EGFR, de voies de signalisation Les mutations d'EGFR sont le deuxième événement moteur oncogène le plus courant dans NSCLC.

## 8.2. Mutations d'exons du gène d'EGFR

Les mutations somatiques sont localisées dans les 4 exons du gène de l'EGFR codant pour l'activité tyrosine kinase (codons 18 à 21). Elles se situent au niveau du site de fixation de l'ATP qui est aussi le site de fixation des ITK. Elles correspondent à des délétions respectant le cadre de lecture, des insertions ou des mutations ponctuelles faux-sens.<sup>29</sup>



**Figure 18.** Diagramme de sucette montrant la position des mutations de l'EGFR et les caractéristiques structurales de l'EGFR. (Les cases oranges indiquent des mutations ponctuelles, les cases bleues indiquent des mutations d'insertion/délétion).<sup>28</sup>

### 8.2.1. Exon 18

Au sein de l'exon 18, il s'agit de mutations touchant le codon 719 et à l'origine une substitution d'une glycine par une cystéine, alanine ou sérine (G719X) représentant 4 % des mutations ou S720F.<sup>29</sup>

### 8.2.2. Exon 19

Au sein de l'exon 19, il s'agit de délétions, intéressant toujours la leucine en 747 et la glutamine en 749 et représentant 44 % des mutations de l'EGFR. Il existe plus de 20 variantes de délétion de l'exon 19, également des insertions représentant 1 % des mutations.<sup>29</sup>

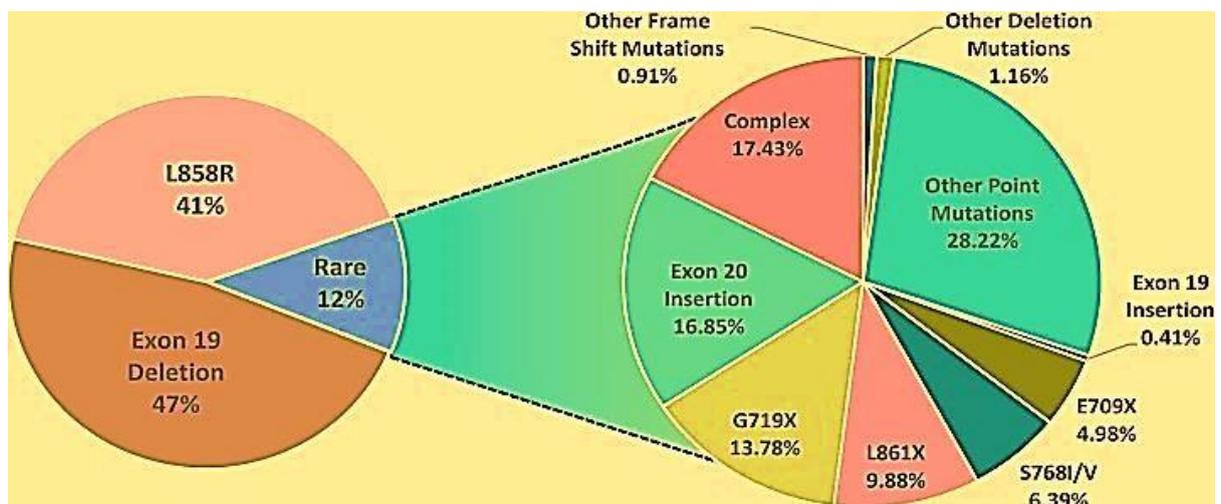
### 8.2.3. Exon 20

Au sein de l'exon 20, il s'agit d'insertions représentant 3% des mutations, dont la plus fréquente est la substitution T790M. Moins de 1% des mutations concernent les mutations ponctuelles (V765A et T783A).<sup>29</sup>

### 8.2.4. Exon 21

La mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représente 41 % des mutations activatrices de l'EGFR, la mutation ponctuelle L861Q 2 %. La mutation L861R a aussi été recensée dans l'exon 21.<sup>29</sup>

Les mutations d'EGFR des exons 18, 19, 20 et 21 d'EGFR sont utilisées comme marqueur prédictif de réponse dans le cas des cancers bronchiques non à petites cellules traités par inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR.<sup>30</sup>



**Figure 19.** Diagramme circulaire montrant les fréquences des mutations de l'EGFR dans le NSCLC. Les données ont été acquises à partir des bases de données COSMIC.<sup>37</sup>

### 8.3. Les voies de signalisation d'EGFR

La fixation du ligand au niveau du domaine extracellulaire stimule l'activité TK intrinsèque des récepteurs et déclenche l'autophosphorylation de résidus tyrosine spécifiques. Les transducteurs de signal initient plusieurs voies en aval telles RAS-RAF-MEK-MAPK, PI3K, PTEN-AKT et STAT.<sup>24</sup> Les progrès considérables dans la connaissance de ces voies de signalisation impliquées dans l'oncogénèse et le maintien du phénotype tumoral constituent une avancée majeure en oncologie.<sup>31</sup>

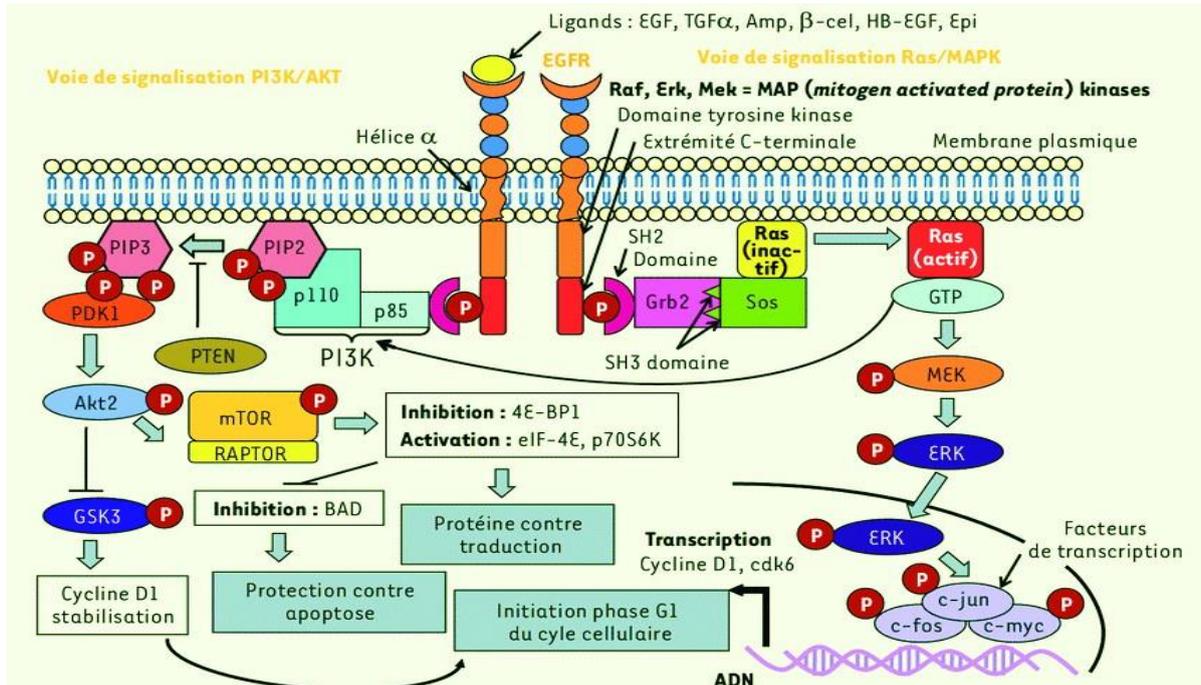


Figure 20. Voie de signalisation de l'EGFR.<sup>36</sup>

Les principales voies des PI3K/AKT, la voie des RAS/RAF/MAPK, la voie de JAK/STAT3 et Src/PLCγ. Les résidus tyrosine phosphorylés d'EGFR servent de sites d'ancrage pour des adaptateurs intracellulaires tels que Grb2, des enzymes intracellulaires telles que PLCγ, ou encore des facteurs de transcription tels que STAT3. Le couplage des récepteurs HER à ces voies de signalisation permet une grande diversité de réponses cellulaires (prolifération, survie, migration...)<sup>30</sup>

#### 8.3.1. La voie des RAS/RAF/MAPK

La voie des RAS/RAF/MAPK présente un rôle central dans la régulation de la croissance et de la survie cellulaire, la réplication et dans le cycle cellulaire d'un large spectre de tumeurs humaines. Cette voie de signalisation est largement impliquée dans les phénomènes de résistance aux thérapies ciblées anti-EGFR.<sup>36</sup>

### 8.3.2. La Voie PI3K /AKT/mTOR)

Plusieurs fonctions cellulaires sont régulées par la voie de signalisation des PI3K/AKT, telles que le métabolisme cellulaire glucidique via GLUT4 et lipidique, et également insulinique au niveau hépatique. L'activation de cette voie en pathologie cancéreuse favorise le développement tumoral et l'angiogenèse, stimule la prolifération cellulaire et réprime l'apoptose. Cette voie est également impliquée dans les phénomènes de diffusion métastatique.<sup>30</sup>

### 8.3.3. La voie des JAK/STAT

Les kinases JAK peuvent servir de relais entre l'EGFR activé et les facteurs de transcription STAT par l'intervention de la kinase Src ou encore directement par liaison au récepteur par interaction avec leur domaine SH2 pour induire la signalisation, cette activation va déclencher une cascade de phosphorylation qui provoque des modifications transcriptionnelles régulant de multiples fonctions cellulaires et immunitaires telles que la prolifération, la différenciation, la migration, l'apoptose ou la survie.<sup>32</sup>

Dans le cadre d'une stimulation autocrine et paracrine des cellules tumorales, les facteurs de croissance capable de lier l'EGFR sont très souvent surexprimés notamment le Tumor Growth Factor- $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) qui est surexprimé chez plus de 60% de patients atteints de CBNPC et l'amphiréguline (AREG) est plus fréquemment exprimée dans les ADC (~58%) que dans les carcinomes épidermoïdes (~40%), et corrèle dans les deux cas à une diminution significative de la survie globale de ces patients, induisent une résistance aux EGFR-TKI dans les ADC pulmonaires mucineux.<sup>22</sup>

### 9. Traitement

L'objectif du traitement est d'enlever la tumeur ou les métastases, de contrôler la propagation de l'adénocarcinome pulmonaire, de prévenir les récurrences, et bien sûr de traiter les symptômes.

Ce traitement varie selon le type de cancer et le stade de la maladie. Si la résection chirurgicale de la tumeur est possible, on commencera par pratiquer cette intervention. La décision de la chirurgie est fonction de la localisation de la tumeur et de l'état de santé général du patient.

Dans le cas d'un adénocarcinome pulmonaire est également fréquent de faire appel à une combinaison de plusieurs formes de traitement qui sont : la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicaux (comme la chimiothérapie), la thérapie ciblée (TKI).

#### 9.1. Thérapies ciblées

Ce sont des nouvelles stratégies thérapeutiques qui sont aujourd'hui possibles grâce aux progrès récents en oncologie, ils font partie de la nouvelle génération de médicaments anticancéreux.<sup>33</sup> Ces traitements atteignent plus spécifiquement les cellules cancéreuses en perturbant les mécanismes biologiques qui conduisent à leur multiplication : ils agissent essentiellement au niveau des récepteurs du facteur de croissance.<sup>33</sup>

Leur utilisation en cancérologie a permis une amélioration conséquente du pronostic de plusieurs pathologies cancéreuses.<sup>30</sup> Ces molécules sont généralement divisées en trois catégories<sup>41</sup> :

- Les anticorps monoclonaux spécifiques d'un oncogène : ces anticorps sont souvent dirigés contre le domaine de fixation du ligand au récepteur, pour bloquer l'activation de celui-ci ou sa dimérisation avec un autre récepteur membranaire.
- Les oligonucléotides anti-sens : plus rarement utilisés, ils consistent à bloquer spécifiquement l'expression des oncogènes en entraînant la dégradation de leur ARNm.
- Les inhibiteurs de TK : ces molécules chimiques inhibent l'activité enzymatique de certains autres oncogènes de façon réversible ou irréversible.<sup>41</sup>

### 9.1.1. Les TKI et leur ciblage selon les mutations d'EGFR

Au cours de la dernière décennie, d'importants progrès thérapeutiques ont été réalisés avec le développement et l'application de nouvelles thérapies ciblant des voies de signalisation impliquées dans la croissance et la survie des cellules cancéreuses (thérapies ciblées) et adaptées en fonction des caractéristiques morphologiques et moléculaires de la tumeur (thérapies personnalisées).

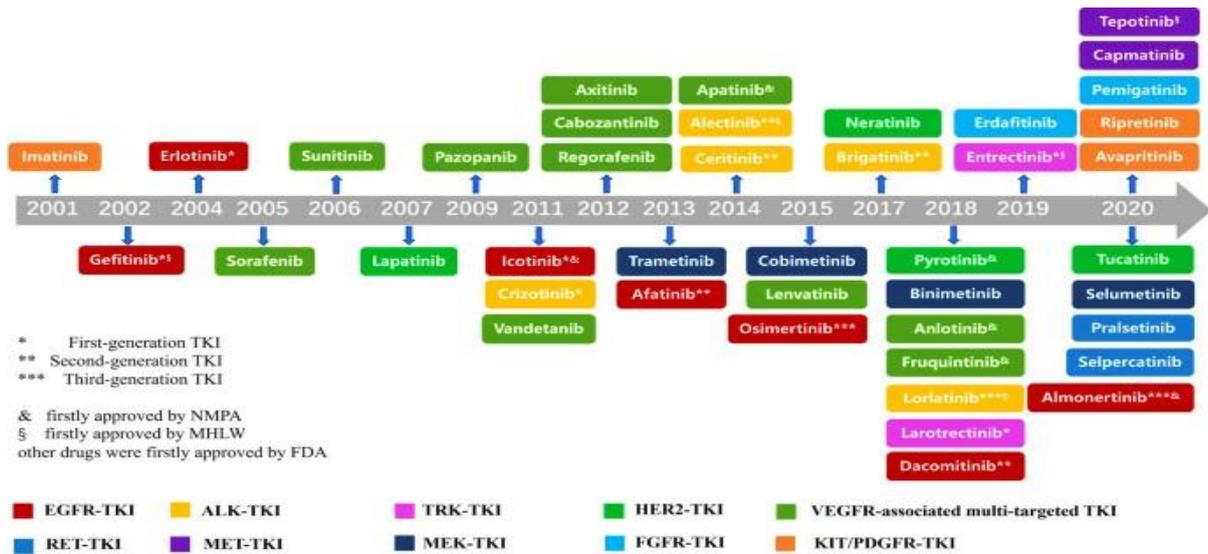


Figure 21. Chronologie de développement de TKI EGFR.<sup>34</sup>

L'identification du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) en tant que cible moléculaire a radicalement changé le traitement du cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC) métastatique, passant d'une chimiothérapie standard à une thérapie personnalisée et ciblée.<sup>44</sup>

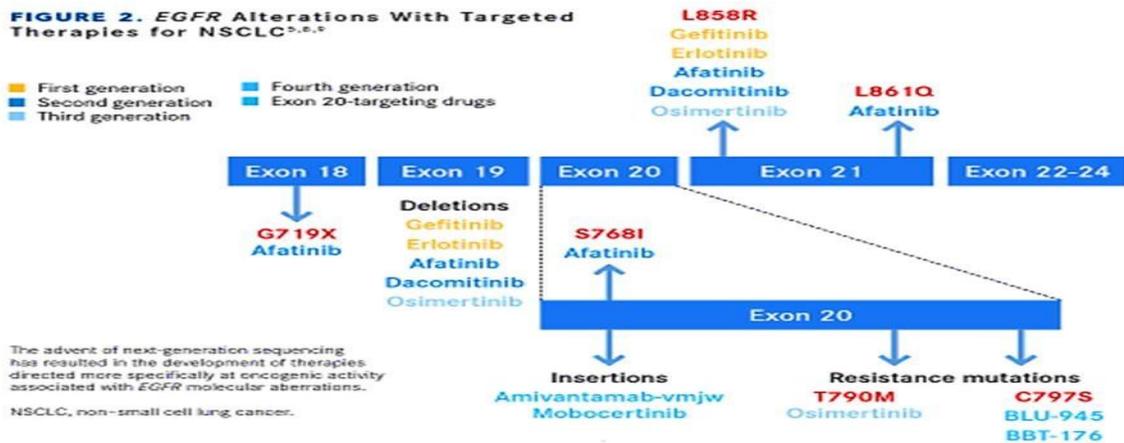


Figure 22. Les altérations d'EGFR avec la thérapie ciblée dans CBNPC.<sup>44</sup>

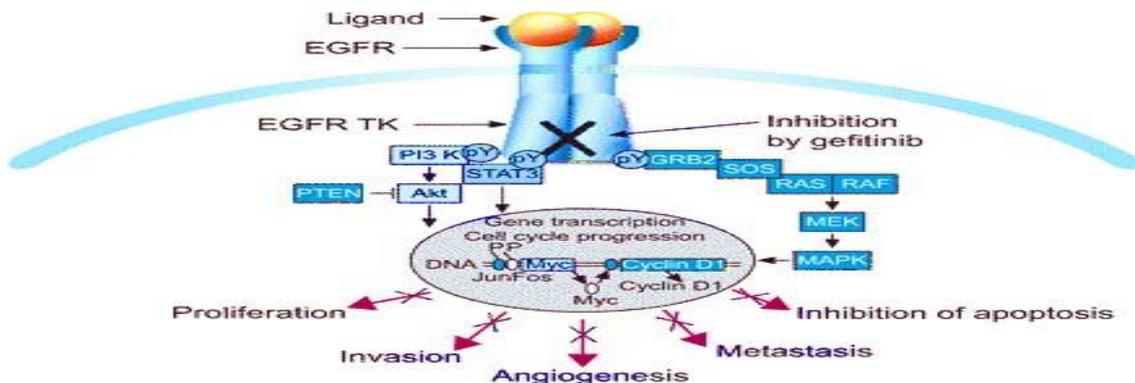
Les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) de l'EGFR de première, deuxième et troisième génération sont désormais disponibles pour le traitement des patients atteints de CBNPC mutant de l'EGFR.<sup>44</sup>

**Tableau 7.** Les inhibiteurs spécifiques de la tyrosine kinase (TKI) qui ciblent le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR).<sup>44</sup>

Table EGFR-TKIs
First-generation (reversible) TKIs
- Erlotinib, gefitinib
Second-generation (irreversible) TKIs
- Afatinib, dacomitinib, neratinib
Third-generation TKIs
- AZD9291 (osimertinib), CO-1686 (rociletinib), HM61713, EGF816X, ASP8273
EGFR: epidermal growth factor receptor; TKI: tyrosine kinase inhibitor

Les ITK EGFR de première génération (gefitinib, erlotinib et icotinib) se lient de manière réversible à l'EGFR et inhibent la liaison de l'ATP au domaine TK. Ce bloc entrave la prolifération cellulaire, conduisant finalement à la mort cellulaire. Le géfitinib et l'erlotinib sont approuvés à l'échelle mondiale pour le traitement des patients atteints d'un CPNPC avec mutation de l'EGFR, tandis que l'icotinib est approuvé en Chine.<sup>44</sup>

### 9.1.1.1 Géfitinib



**Figure 23.** Représentation schématique du rôle du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dans le cancer et son inhibition par le géfitinib.<sup>30</sup>

Le géfitinib est un médicament qui inhibe la tyrosine kinase de l'EGFR en ciblant la fente ATP dans l'EGFR pour empêcher l'autophosphorylation de l'EGFR<sup>35</sup>, il inhibe l'activité TK du domaine EGFR TK, bloquant les voies de signalisation importantes pour la survie et la prolifération des cellules tumorales.<sup>30</sup>

### 9.1.1.2 Erlotinib

L'erlotinib est un inhibiteur compétitif de faible poids moléculaire, réversible, inhibe la phosphorylation intracellulaire de l'EGFR. Dans les tumeurs positives à la mutation EGFR, l'erlotinib se lie étroitement au site de liaison de l'ATP dans le domaine kinase muté, ce qui entraîne un blocage puissant de la signalisation MAP-kinase. Le blocage de la signalisation entraîne l'interruption de la prolifération des cellules tumorales et l'activation de la voie intrinsèque de l'apoptose.<sup>35</sup>

Le géfitinib et l'erlotinib ont été développés en monothérapie pour le traitement des patients en rechute après une ou plusieurs chimiothérapies.<sup>43</sup>

- Les inhibiteurs de deuxième génération, dont l'afatinib et le dacomitinib, sont des inhibiteurs irréversibles, qui se lient de manière covalente à l'EGFR approuvé à l'échelle mondiale pour le traitement de première ligne des patients mutants de l'EGFR, tandis que le dacomitinib est également à l'étude pour une approbation réglementaire.<sup>35</sup>

### 9.1.1.3 Afatinib Gilotrif

L'afatinib est le premier bloqueur oral irréversible de la famille ErbB par inhibition leurs activité. La FDA américaine a approuvé Giotrif pour la prise en charge des patients localement avancés ou métastatiques atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules présentant les caractéristiques suivantes : EGFR del19 ou L858R.<sup>35</sup>

### 9.1.1.4 Dacomitinib

Dacomitinib a été développé par Pfizer en tant que TKI EGFR irréversible de deuxième génération. Il s'agit d'un inhibiteur pan-HER.<sup>35</sup>

- les EGFR-TKI de troisième génération tels que l'osimertinib et le rociletinib ont gagné en importance en raison de leur haut niveau d'efficacité et de leur faible profil de toxicité et qui font partie des thérapies ciblées les plus prometteuses en oncologie en référence aux essais récemment publiés montrant un bénéfice clinique impressionnant dans le cancer du poumon EGFR T790M+, mais des mécanismes de résistance hétérogènes ont toujours émergé et il existe actuellement un besoin évident de stratégies thérapeutiques.

35

### 9.1.1.5 Osimertinib

L'osimertinib est un TKI EGFR de 3eme génération disponible par voie orale, puissant et irréversible de l'altération moléculaire sensibilisant à l'EGFR et résistant au T790M, a une sélectivité élevée pour l'EGFR-T790M ou l'EGFR-L858R par rapport à la forme sauvage. Il a démontré un taux de réponse objectif élevé chez les patients atteints de CPNPC T790M positif qui ont progressé sur un EGFR-TKI de première génération et ont donc été classés comme un composé révolutionnaire pour un développement accéléré, a été associé à une amélioration significative de la survie sans progression (SSP).<sup>35</sup>

L'évaluation de l'efficacité potentielle des traitements anti-EGFR chez des patients avec un CNPC est malheureusement compliquée du fait qu'il existe de nombreuses mutations différentes de l'EGFR. Certaines mutations de l'EGFR comme T790M (primaire ou secondaire), en diminuant l'affinité du médicament avec l'EGFR, prédisent à l'inverse une résistance à la thérapie.<sup>36</sup>

Les données ont été filtrées pour ne contenir que les mutations de l'adénocarcinome pulmonaire. Les mutations de résistance courantes T790M et C797S ont été filtrées.<sup>28</sup>

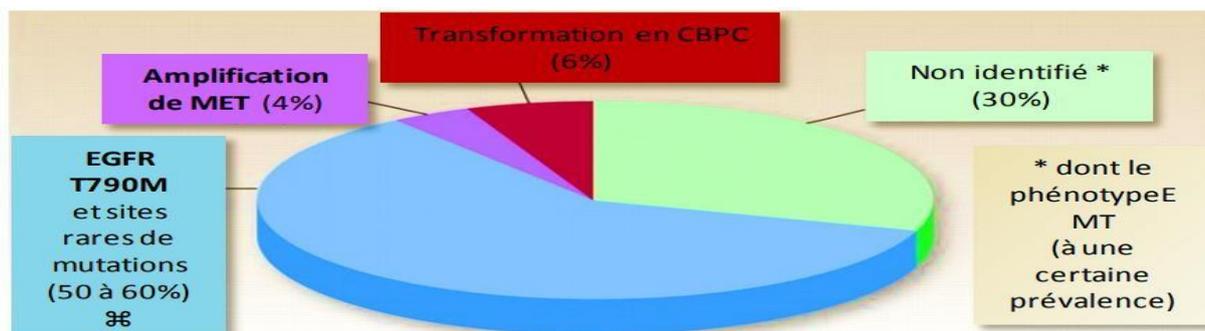


Figure 24 : Répartition des facteurs de résistance acquise aux EGFR-TKI.<sup>22</sup>

Le mécanisme majeur de résistance acquise aux EGFR-TKI est la mutation T790M de l'EGFR qui représente la moitié des résistances secondaires, responsable d'une moindre affinité du récepteur pour l'inhibiteur.<sup>37</sup> L'amplification de MET représente ici les cas où la mutation T790M ne coexiste pas. Cependant, 3 à 4% des cas d'amplification de MET présentent aussi la mutation T790M.<sup>22</sup> L'utilisation d'inhibiteurs de haute affinité la 3eme génération (« irréversibles »), est envisagée chez ces patients.<sup>37</sup> Également nombreux efforts sont en cours, combinant les TKI EGFR avec d'autres médicaments, y compris des agents anti-angiogéniques, une chimiothérapie, une immunothérapie ou d'autres agents ciblés.<sup>38</sup>

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

## Chapitre II MATERIEL ET METHODES

Ce présent travail est une étude prospective et rétrospective portant sur 19 dossiers de patients atteints d'adénocarcinome bronchique reçu au service d'anatomie et de cytologie pathologique du centre HOSPITALO-UNIVAIRSITAIRE ISSAD HASSANI durant une période de 14 mois du janvier 2021 au février 2022.

Notre étude a pour but de mettre en évidence les Caractéristiques épidémiologiques, le statut mutationnel de l'EGFR ainsi que le profil immunohistochimique de la population étudiée en utilisant les techniques suivantes :

- ✓ La PCR en temps réel via le test idylla.
- ✓ La technique d'immunohistochimie.
- ✓ Le logicielle Microsoft Excel pour les graphes.

### 1. Matériel

#### 1.1. Matériel biologique

Des coupes histologiques de 5 µm de biopsie fixées au formol et incluses en paraffine (FFPE) dérivées de 19 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire communiqué au service d'anatomie et de cytologie pathologique du centre HOSPITALO-UNIVAIRSITAIRE ISSAD HASSANI.

#### 1.2. Matériell non biologiques

Convient à tout matérielles nécessaires à l'étude du statut mutationnel EGFR et l'étude immuno-histochimique (annexes I).

## 2. Méthodes

### 2.1. L'étude histologique

✓ La préparation des prélèvements (les biopsies) et leur conditionnement influence la qualité des résultats de l'étude

**2.1.1. La fixation** : est indispensable pour conservation des structures cellulaires dans un état aussi proche que possible de leur état vivant, avec arrêt de toutes activités mitotique et enzymatique, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement.

-La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie

-Nature du fixateur : le fixateur le plus habituellement utilisé est le formol Tamponné à 10 % à pH neutre.

**2.1.2. Déshydratation** : Les prélèvements sont déposés dans des cassettes en plastique, Puis les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage dans six bains successifs d'alcool de concentration croissante :50%~75%~96%~100%. Pendant 2h pour chacun, l'alcool est éliminé par des solvants (xylène).

**2.1.3. Inclusion en paraffine** : la paraffine liquide à 56 °C imprègne les tissus présents dans la cassette laquelle est déposé sur un moule en métal ensuite refroidie toute la nuit pour le durcissement du bloc.

**2.1.4. Coupes et colorations** : après refroidissement et démoulage, Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames.

Ensuite les lames passent au séchage à l'air et Après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, viens l'étape de la coloration qui permet la mise en évidence de la morphologie des cellules (cytoplasme, noyaux,) ainsi que leur répartition structurale.

La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire L'hématoxyline, qui colore seulement les noyaux en bleu violet et un colorant acide cytoplasmique qui colore le cytoplasme et les autres éléments cellulaire en rose.

## 2.2. Recherche des mutations du gène EGFR par PCR en temps réel

### 2.2.1. Le test idylla de mutation EGFR

Le test de mutation Idylla™ EGFR, réalisé sur le système Biocartis Idylla™, est un test de diagnostic in vitro pour la détection qualitative des mutations EGFR à partir de tissus humains fixés au formol et inclus dans de la paraffine provenant d'un tissu de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC).

C'est une plate-forme de diagnostic moléculaire entièrement intégrée qui effectue automatiquement toutes les étapes nécessaires de la PCR en toute rapidité et facilité d'utilisation avec une sensibilité et des capacités de multiplexage élevées. Elle permet la détection sensible de 51 mutations dont l'exon 18 (G719A/C/S), l'exon 21 (L858R, L861Q), mutations de l'exon 20 (T790M, S768I), délétions de l'exon 19 et insertions de l'exon 20 dans l'oncogène EGFR en un seul test. Le processus complet prend moins de 2,5 heures et à un LOD de  $\leq 5\%$  pour toutes les mutations EGFR les plus répandues.

Le processus complet de liquéfaction de l'échantillon, de préparation des acides nucléiques, de PCR en temps réel, d'analyse des données et de création de rapports est entièrement automatisé.

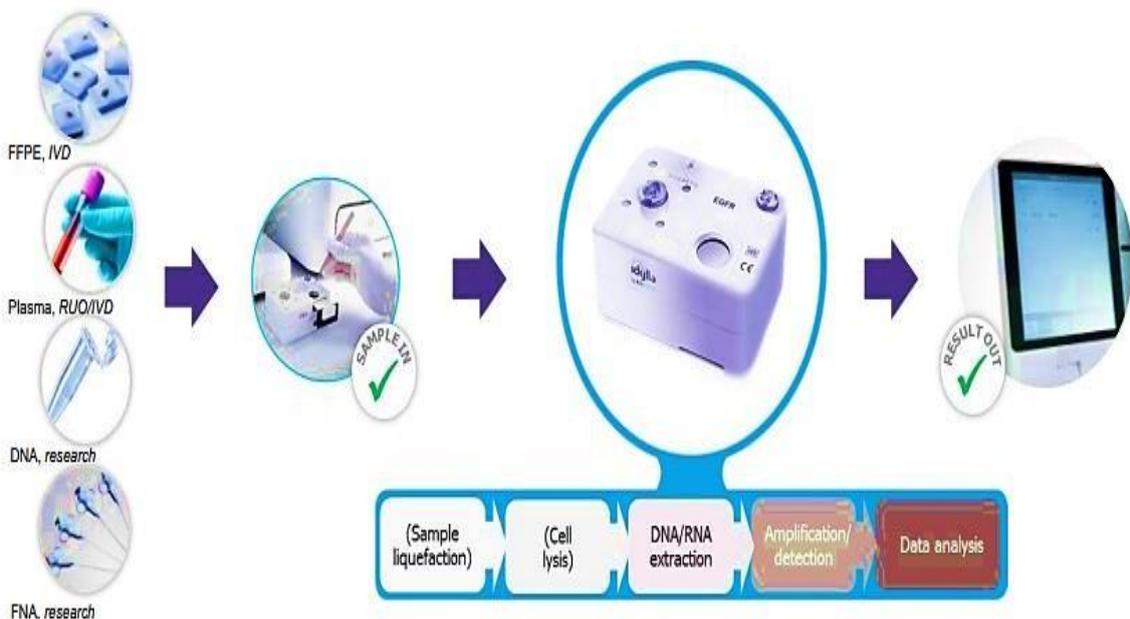


Figure 25. Présentation générale du principe des dosages Idylla™<sup>47</sup>

### 2.2.2. Le principe de PCR en temps réel

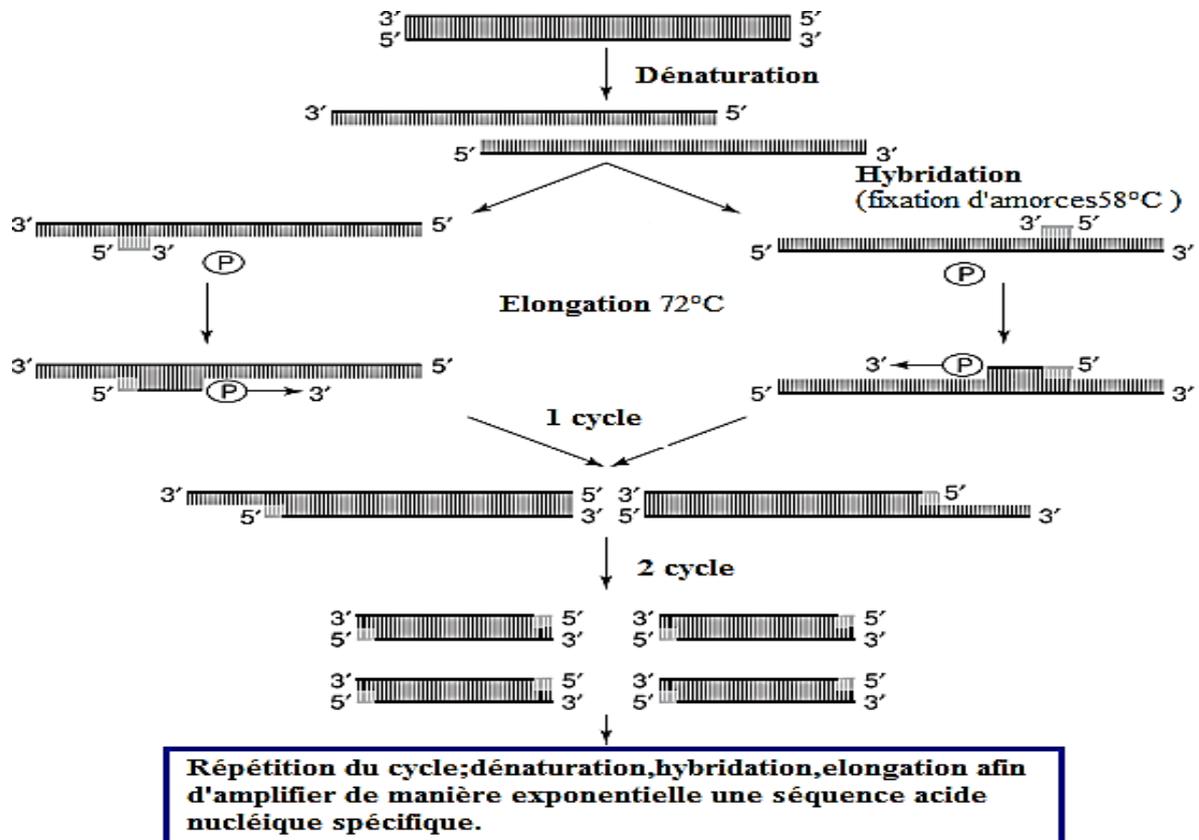


Figure 26. Schéma représentant le principe de la PCR en temps réel <sup>48</sup>.

**Dénaturation** : les deux brins d'ADN sont séparés par chauffage (92° to 96°C).

**Hybridation** : en abaissant la température (50-70 °C), des amorces constituées de courts fragments d'ADN viennent s'hybrider sur les brins d'ADN.

**Élongation** : une enzyme polymérase, la Taq polymérase, complète la synthèse du brin d'ADN à partir de l'amorce grâce aux oligonucléotides présents dans le milieu de réaction.

-La technologie de la PCR en temps réel repose sur la détection et la quantification d'un marqueur fluorescent. L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR.

- En mesurant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant la phase exponentielle où la première augmentation significative dans la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible.

-Donc après isolation de l'ADN, les séquences géniques cibles sont amplifiées (amplicons) et, si elles sont présentes, sont détectées au moyen de sondes pour hydrolyse fluorescentes. Le signal de fluorescence augmente avec la quantité d'amplicons formés détectée ensuite par l'unité optique d'un instrument de PCR en temps réel.

-La réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, ou quantitative, représente une méthode rapide, sensible et spécifique pour la mise en évidence d'agents pathogènes.

-Par la détection directe de l'ADN ou de l'ARN de l'agent pathogène, la PCR en temps réel permet d'établir rapidement un diagnostic très précis, et ainsi d'administrer à chaque patient un traitement rapide et sélectif.

### 2.2.3. Principe de dosage Idylla™

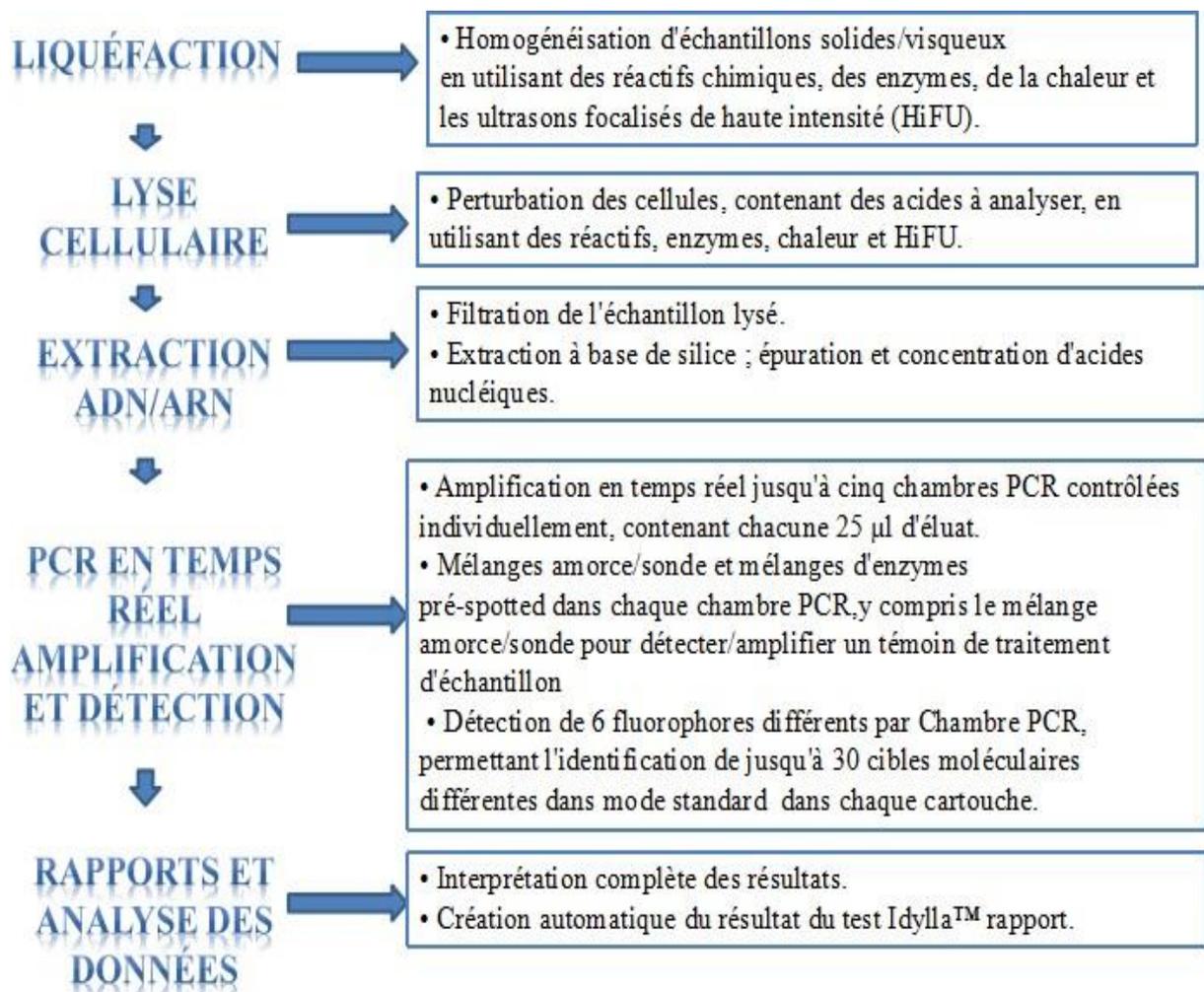


Figure 27. Principe de dosage Idylla™.

## 2.2.4. Les étapes de réalisation de l'étude du statut mutationnelle d'EGFR

1. Générer votre demande de test
  - Scannez ou entrez manuellement l'identifiant de l'échantillon.
  - Scannez la cartouche et confirmez la demande de test.
2. Sélection du bloc contenant le tissu tumoral nécessaire à l'analyse du statut mutationnelle de l'EGFR.
  - Les lames doivent contenir des coupes de 5 µm d'épaisseur coupé à l'aide d'un microtome.
3. Charger la cartouche
  - Grattez une section FFPE de la lame de verre ou utilisez le rouleau FFPE.
  - Prenez deux morceaux de papier filtres et les mouillez brièvement dans de l'eau distillé. Placez-les tous les deux sur une lame de microscope.
  - Placez l'échantillon sur un morceau de papier filtre humidifié.
  - Créez un sandwich avec le papier filtre et l'échantillon entre les deux et l'insérez dans la cartouche.
  - Pour un échantillon de biopsie liquide, pipetez le plasma directement dans la cartouche.
4. Retirez le clip de protection et scellez la cartouche Idylla™ et chargez-la dans l'instrument.

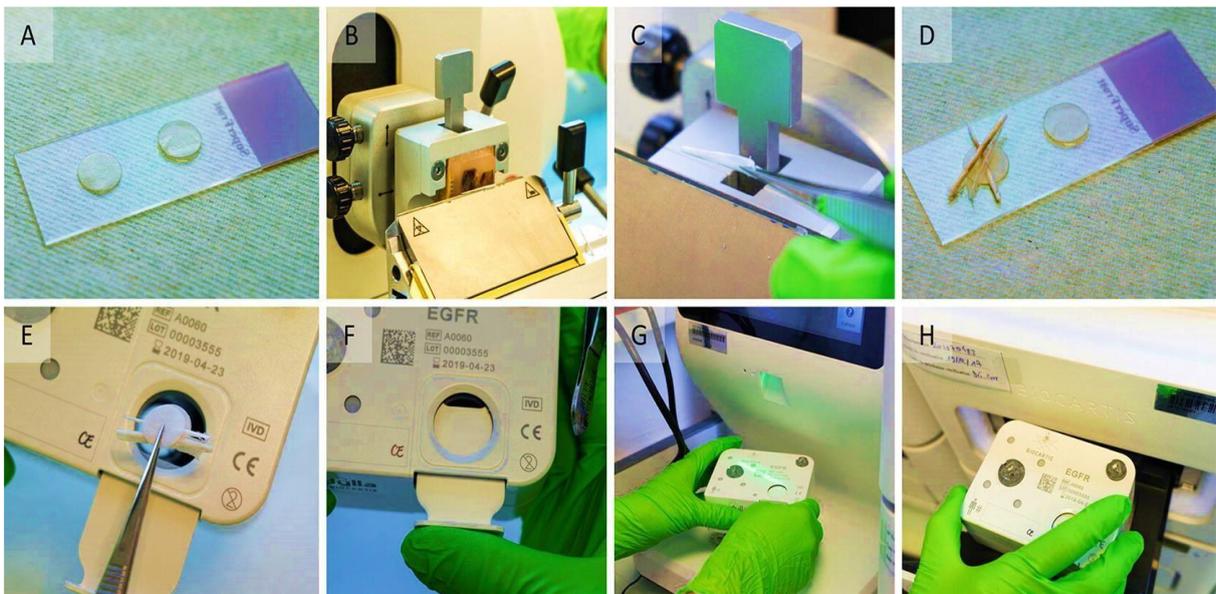


Figure 28. Présentation des étapes de réalisation du test de mutation EGFR Idylla™<sup>49</sup>.

### 2.2.5. Rapport et analyses des data

Le système Idylla™ rapport automatiquement les résultats de la recherche de mutation EGFR lequel inclue les mutations suivantes :

Exon 18 (G719A/C/S), exon 21 (L858R, L861Q), mutations de l'exon 20 (T790M, S768I), délétions de l'exon 19 et insertions de l'exon 20. Et sont illustrés dans le tableau des résultats d'Idylla.

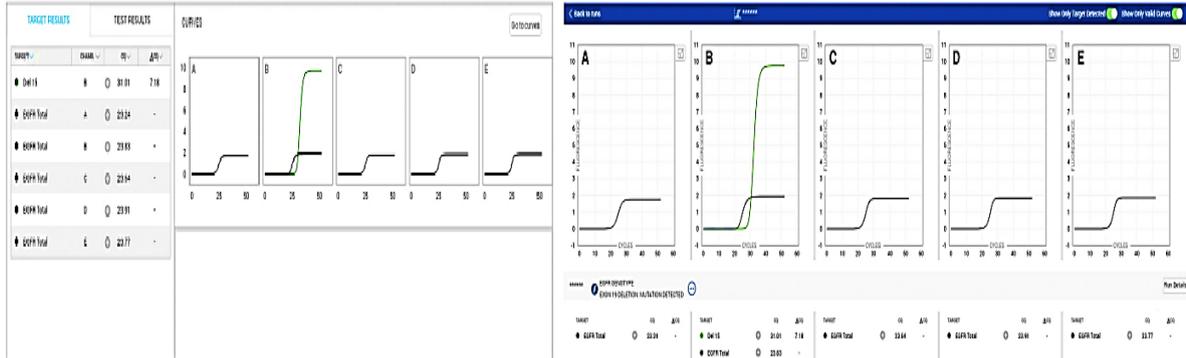


Figure 29 : présentation des résultats d'une mutation de l'exon 19 rapporté par Le système Idylla™.

<b>Num.de série de l'Instrument</b>	<b>SER2378</b>
<b>Version logicielle instrument</b>	<b>26.0</b>
<b>Numéro série console</b>	<b>C00001554</b>
<b>Version du logiciel</b>	<b>4.3.0.380</b>
<b>Demande de test terminée</b>	<b>20 Jan 2021(08.08)</b>
<b>Début du test</b>	<b>20 Jan 2021(08.08)</b>
<b>Test terminé</b>	<b>20 Jan 2021(10.31)</b>
<b>état du test</b>	<b>Résultat publié:automatique,20/01/2021(10.31)</b>
<b>Opérateur</b>	<b>TECHNIQUE</b>

#### Idylla™ EGFR Mutation Test

<b>GENOTYPE EGFR</b>	
<b>L858R</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>SUPPRESSION DE L'EXON 19</b>	<b>MUTATION DETECTEE</b>
<b>T790M</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>G719A/C/S</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>INSERTION DE L'EXON 20</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>S768I</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>L861Q</b>	<b>AUCUNE MUTATION DETECTEE</b>
<b>CQ DU CONTRÔLE EGFR</b>	<b>26.17</b>

Figure 30. Rapport du résultat du test Idylla™.

## 2.3. Etude immunohistochimique

### 2.3.1. Technique d'immunohistochimie

L'immunohistochimie consiste à mettre en évidence divers antigènes (Ag) cellulaires, ou extracellulaires, grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux, sur des préparations cytologiques (immunocytochimie), ou sur des coupes de tissus congelés, ou fixés, et inclus en paraffine.

En gros, l'immunohistochimie est basée sur l'affinité antigène-anticorps. Il s'agit de déterminer les dilutions et les temps d'incubation optima des anticorps primaires, anticorps secondaire et des systèmes de révélation. Et également de déterminer le meilleur moyen de démasquage des sites antigéniques pour le blocage des sites aspécifiques.

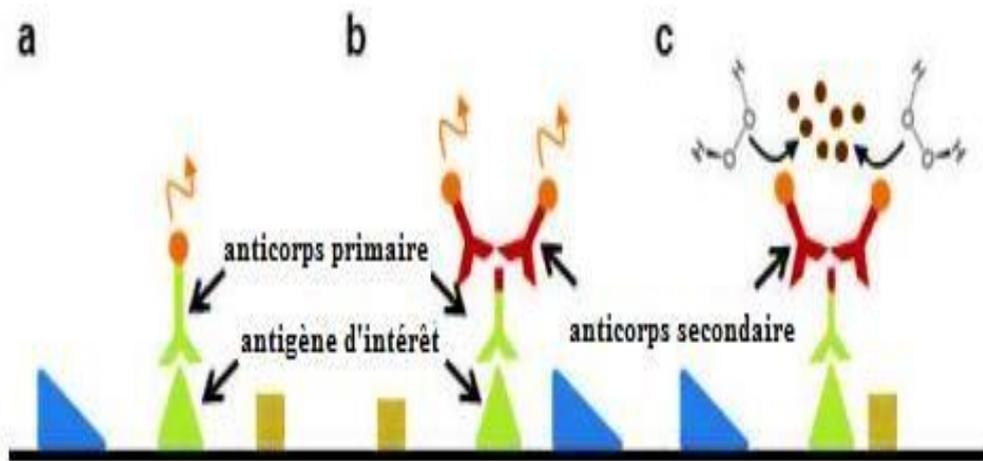


Figure 31. Principe de l'immunohistochimie.

### 2.3.2. Principe de l'immunohistochimie

- a) Immunohistofluorescence directe. Le premier anticorps a pour le but de détecter l'antigène.
- b) (B-C) Immunohistochimie indirecte. Le deuxième anticorps reconnaît le premier anticorps et amplifie le signal.<sup>50</sup>

### 2.3.3. Protocole général d'immunohistochimie (IHC)

La préparation de l'échantillon de tissu revêt une importance capitale car toute manipulation inappropriée est susceptible d'altérer la structure du tissu, de réduire l'affinité de liaison de l'anticorps, voire d'empêcher totalement la liaison. L'objectif est de préserver le tissu proche de ses conditions de vie réelle.

**1. Confections des coupes :**

- Réalisation des coupes du tissu infiltré de paraffine sur un microtome de 2 à 5 microns d'épaisseur, puis leur étalement sur des lames.
- Une fois les lames montées, elles passent au séchage dans une étuve pendant une journée ou 1h à 60°.
- Étiquetez les lames (mentionnez le numéro du malade plus l'anticorps demandé).

**2. Déparaffinage :** élimination de la paraffine par un passage du prélèvement dans six bains de xylène de 5 min chacun.

**3. Réhydratation des tissus :** pour réaliser une réaction antigène/anticorps, il faut réhydrater les sections dans des bains d'alcool à concentration décroissante 96%,80%,70% pendant 5min chacun, puis rincez à l'eau du robinet.

**4. Démasquage de l'antigène :** Ce traitement permet de rendre accessibles les épitopes masqués naturellement ou à la suite de la fixation afin d'assurer la liaison anticorps-antigène, Ce démasquage avant l'incubation aux anticorps s'avère particulièrement recommander pour la détection des divers récepteurs dans le cas d'échantillons inclus à la paraffine. Différentes méthodes sont possibles à haute température : la cocotte-minute, le four à micro-ondes et le bain-marie.

- Les lames disposées sur un portoir sont Immergées dans un bac contenant une solution de démasquage (TRS= Target Retrieval Solution 50x), qui est ensuite incubée à 96°-98°C dans un bain-marie pendant 40 minutes.
- Une fois retiré de bain marie, Laissez refroidir 20 min.
- Rincez bien les lames à l'eau distillée puis au TBS (Tris Buffer Saline) pendant 5 min.
- Préparation d'une chambre humide qui contient de la gaze mouillée.
- Faites une délimitation des zones de traitement tissulaire, à l'aide d'un marqueur hydrophobe nommé "dako pen" (hydrophobic pen) sur les lames silanisées chargées.  
Pour délimiter et tenir le produit

**5. La technique de IHC :**

- **Blocage :** Déposez de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% (qui permet d'éviter aux anticorps de se fixer de manière non spécifique ailleurs que sur les antigènes) et les laisser reposer 5 à 10 min sur un gaz mouillé (chambre humide) puis rincer à l'eau distillée.
- Lavez dans 3 récipients du tampon TBS de lavage pendant 5 min.

- **Incubation de l'anticorps primaire** : Application un volume suffisant pour couvrir la coupe de tissu de l'anticorps primaire (TTF1, P63) ensuite incubé pendant 30 min dans la chambre humide, suivi par un Lavage dans le tampon TBS.
  - **Incubation de l'anticorps secondaire** : Appliquez l'anticorps secondaire (HRP : polymère d'enzyme) incubé pendant 30 min dans la chambre humide.
  - Lavez 3 fois dans le tampon TBS pendant 5 min.
  - Ajoutez 1 à 2 gouttes du substrat dans 1ml du chromogène (DAB) et appliquez aux lames et incubé 5 min puis rincez à l'eau distillée.
- 6. Contre coloration** : Colorez à l'hématoxyline pendant 5 à 9 min.
- Ajoutez de l'ammoniac dans un bac contenant de l'eau du robinet et y immergez les lames ensuite rincé à l'eau distillée.
  - Déshydratez le tissu dans 2 bains d'alcool benzylique à 96% pendant 5 minutes chacun.
  - Lavez le tissu dans 2 bains de xylène pendant 2 minutes chacun.
  - Montez la lame pour l'observation.

***Chapitre III:***  
***Résultats***

## Chapitre III Résultats

### 1. Caractéristiques de la population étudiée

**Le sexe :** La population étudiée comprend 19 patients dont 8 sont de sexe féminin (42%) et 11 de sexe masculin (58%) avec un sexe ratio de 1.37 H/F.

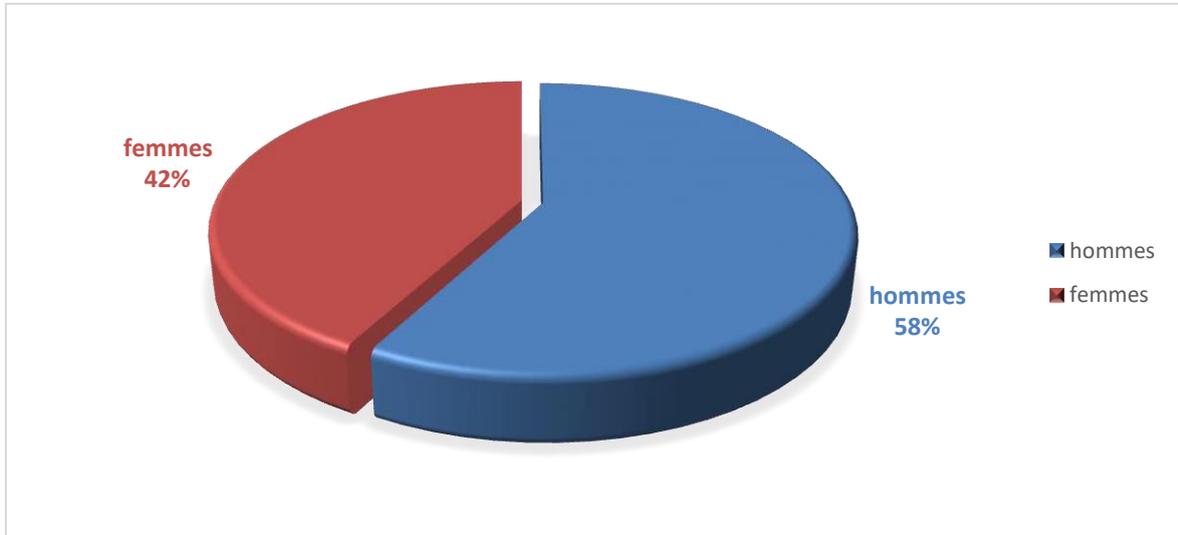


Figure 32. Distribution des patients par sexe.

**L'âge :** L'âge de cette série de patients varie entre 45 et 80 ans, et pour un effectif de 17 patients l'âge moyen est de 63.64 ans. Précisons que l'âge n'a pas été mentionné chez 2 patients.

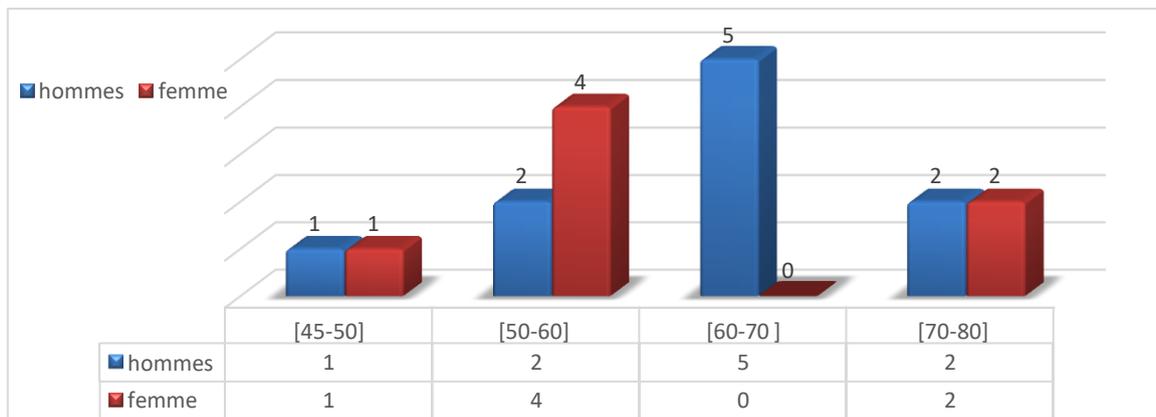


Figure 33. Répartition des patients par tranche d'âge et par sexe

**Le statut tabagique :** Le statut tabagique n'a pas pu être recueilli pour 8 patients. Parmi les 10 patients restants, 3 d'entre eux étaient fumeurs dont 1 était un fumeur passif. Et 7 non-fumeurs.

## 2. Profil histologique

**Type histologique :** Nous avons constaté que 100% des patients manifestaient l'aspect d'un carcinome bronchique non à petit cellule en faveur d'un adénocarcinome broncho- pulmonaire.

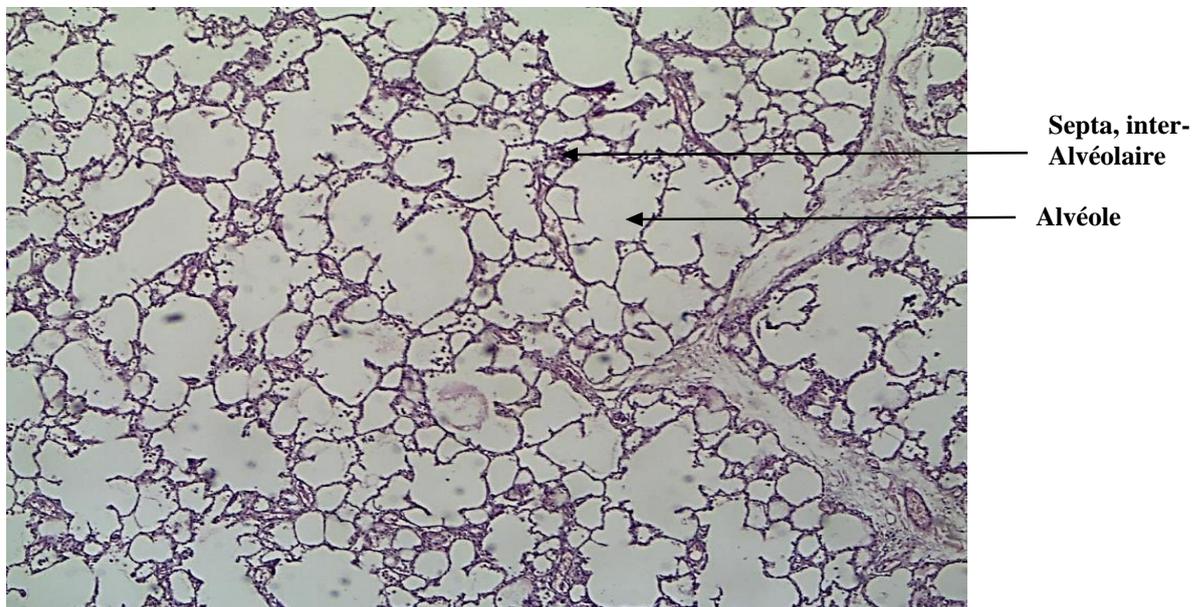


Figure34. Vue microscopique d'un parenchyme pulmonaire sain HE (Gx4).

### Cas 1 :

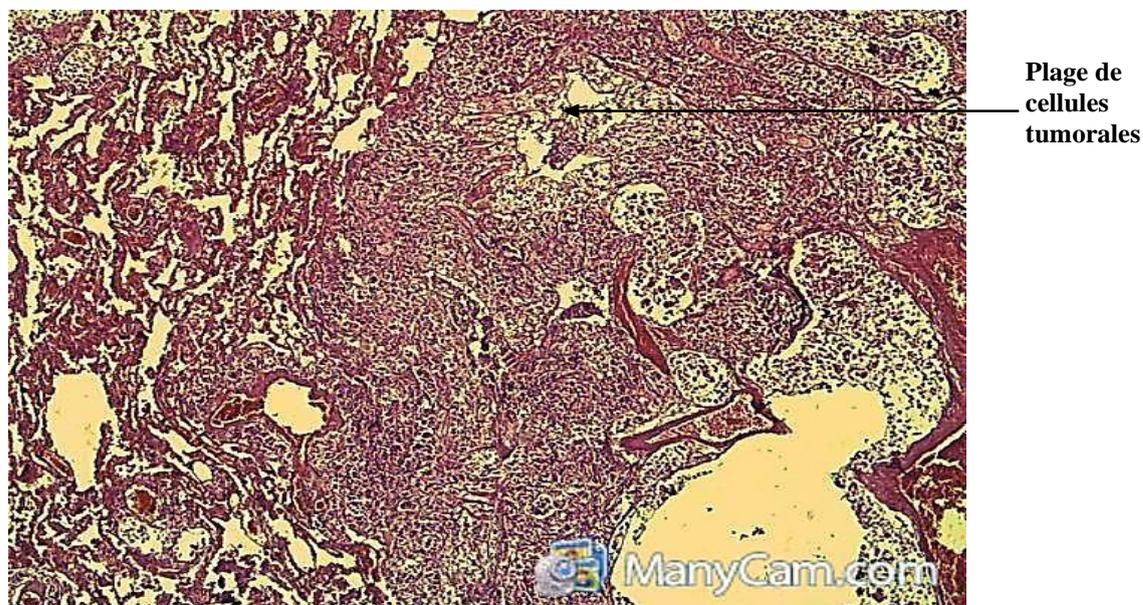
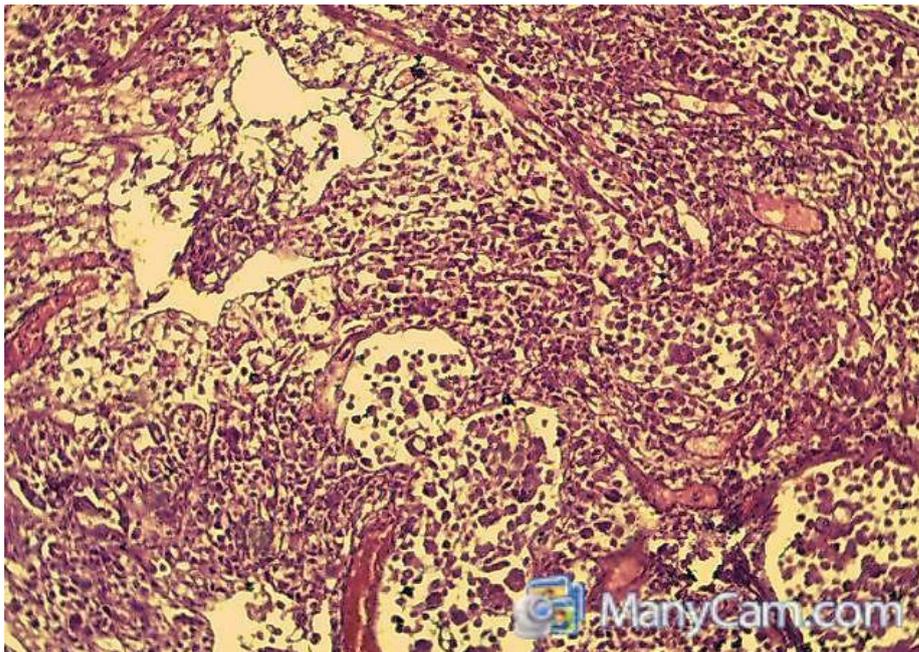
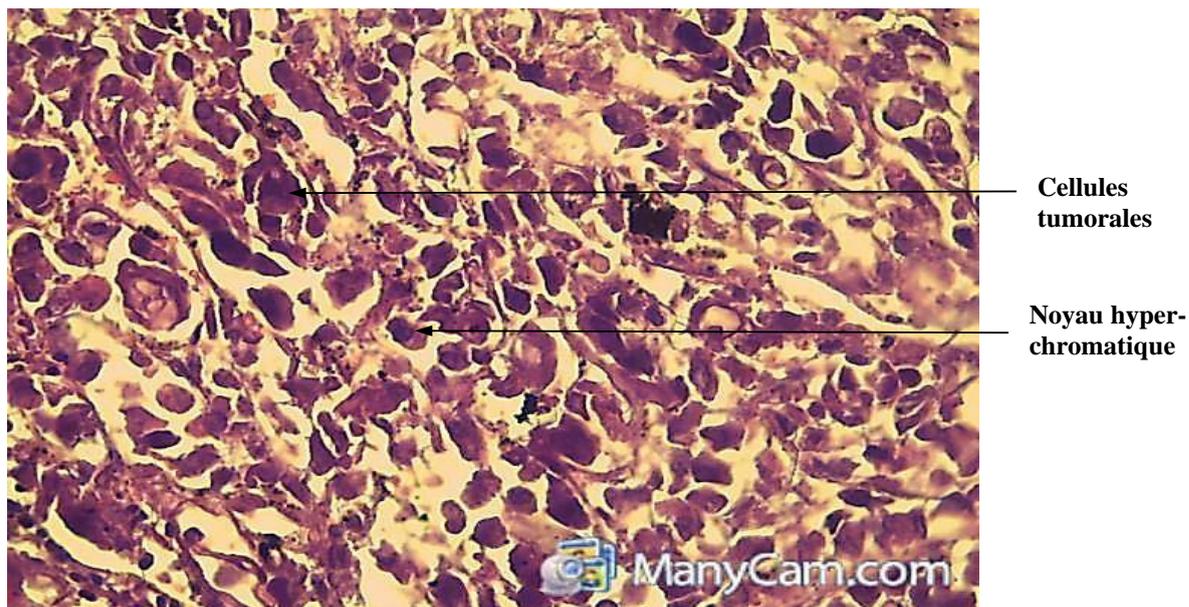


Figure 35. Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4).

Vue microscopique au faible grossissement montrant un parenchyme pulmonaire siège d'un adénocarcinome agencé en plage



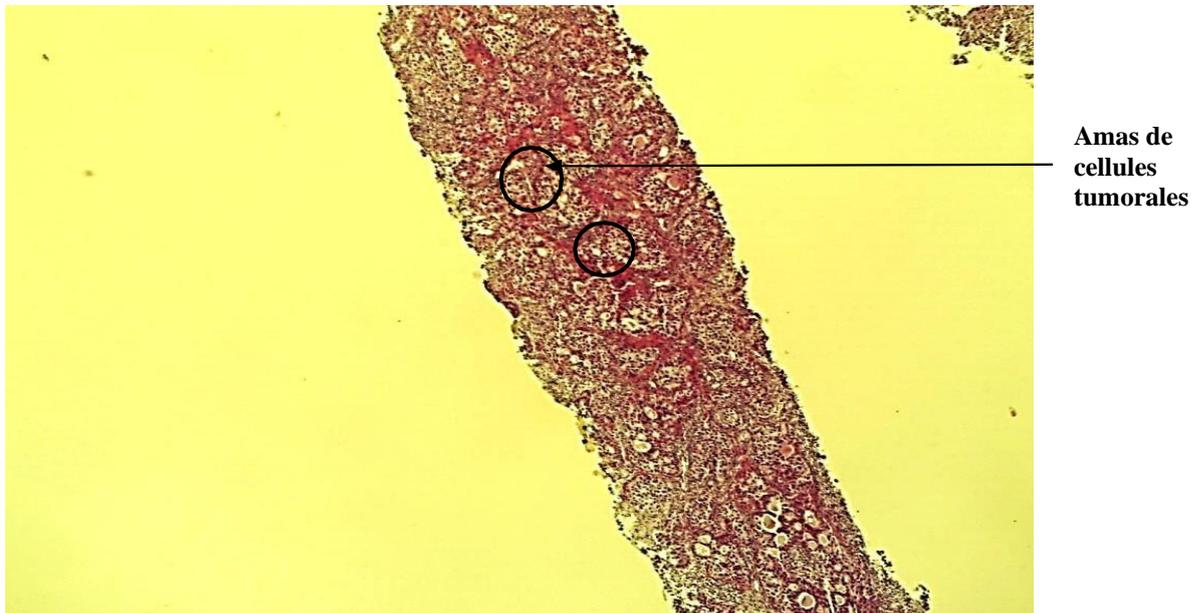
**Figure 36.** Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10).



**Figure 37.** Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40).

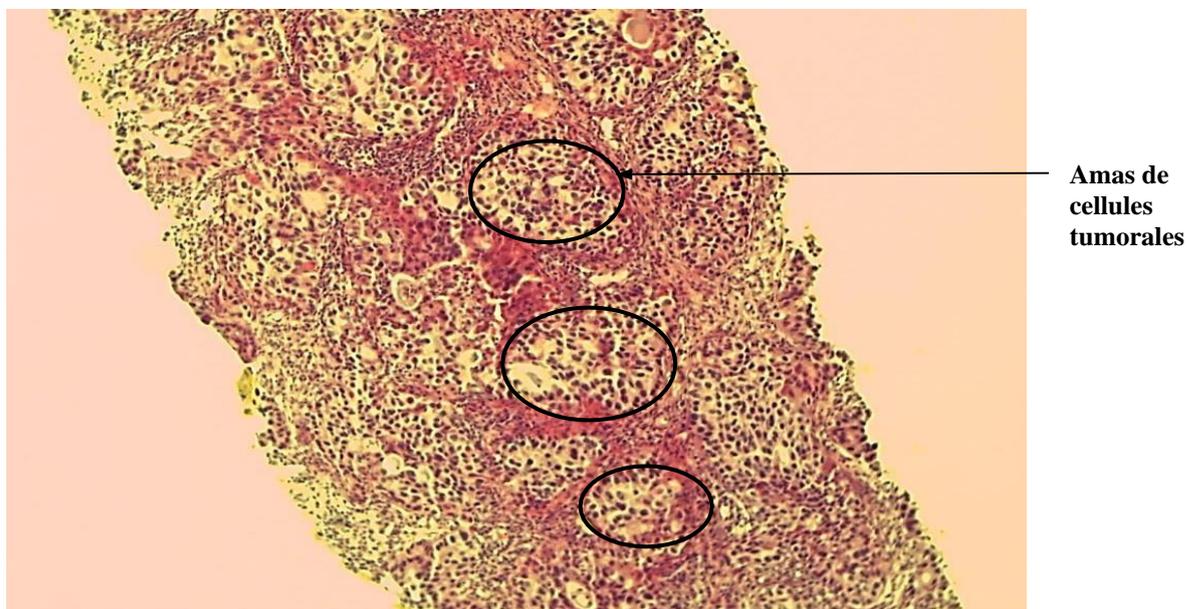
Vue microscopique au fort grossissement montrant des cellules tumorales de tailles et de formes variables, aux noyaux volumineux hyper-chromatiques et anisocaryotiques.

Cas 2 :

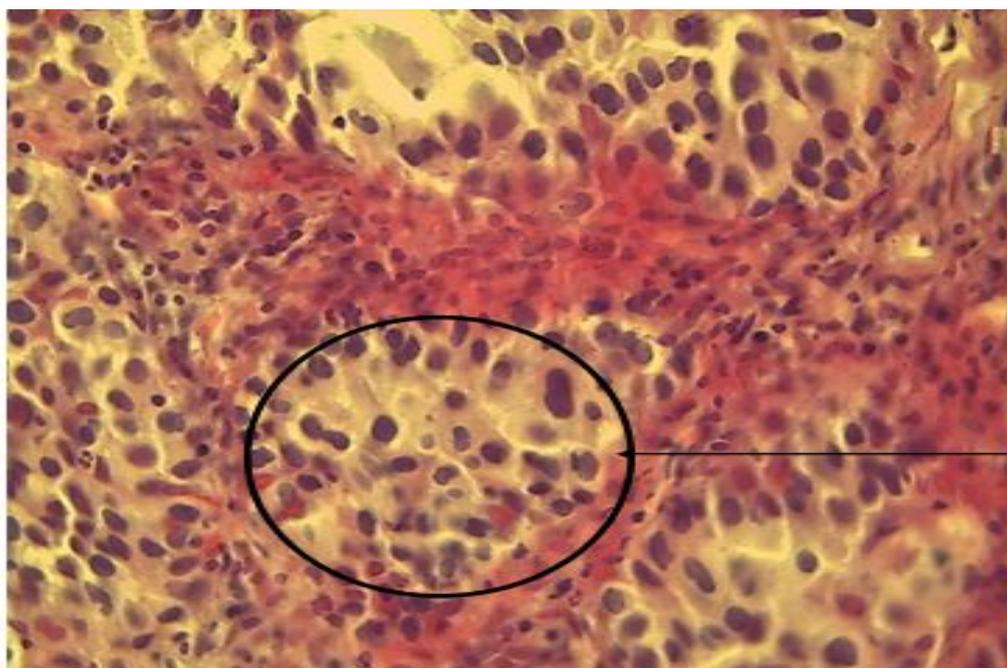


**Figure 38.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4).

Vue microscopique au faible grossissement montrant une prolifération tumorale agencée en amas

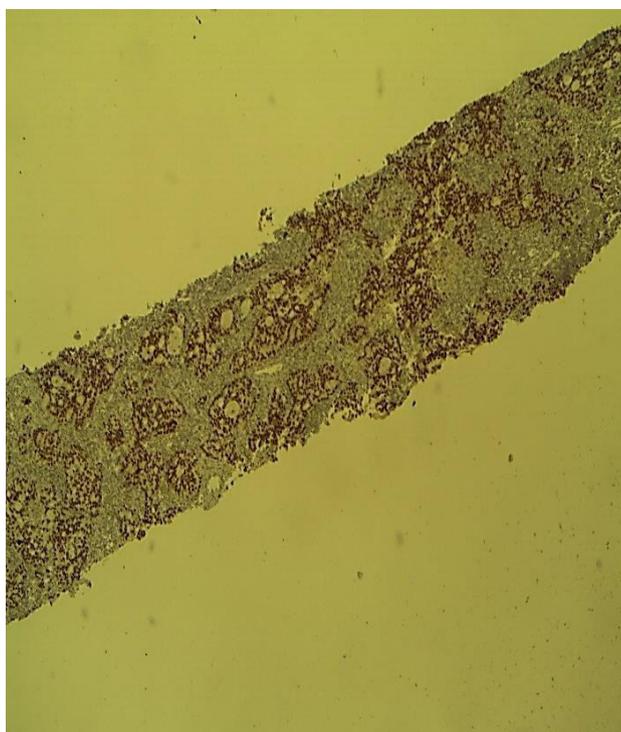


**Figure 39.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10).

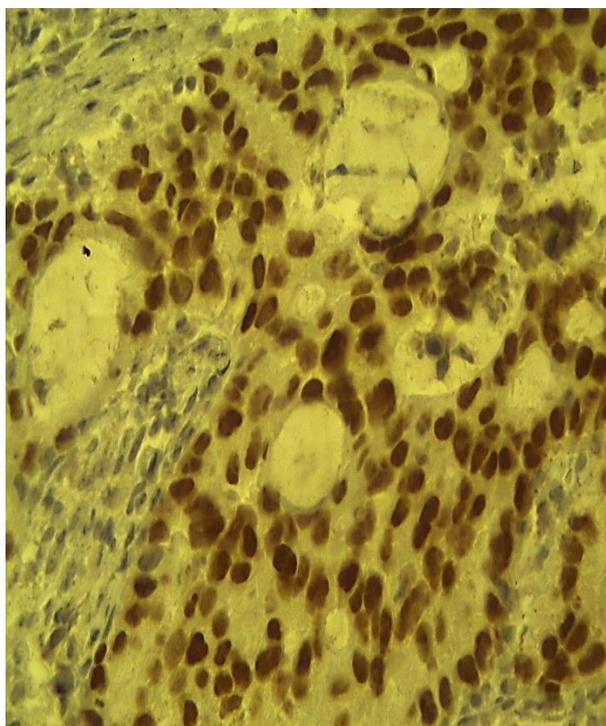


Amas de  
Cellules  
Tumorales  
Aux Noyaux  
anisocaryotiques

**Figure 40.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40).

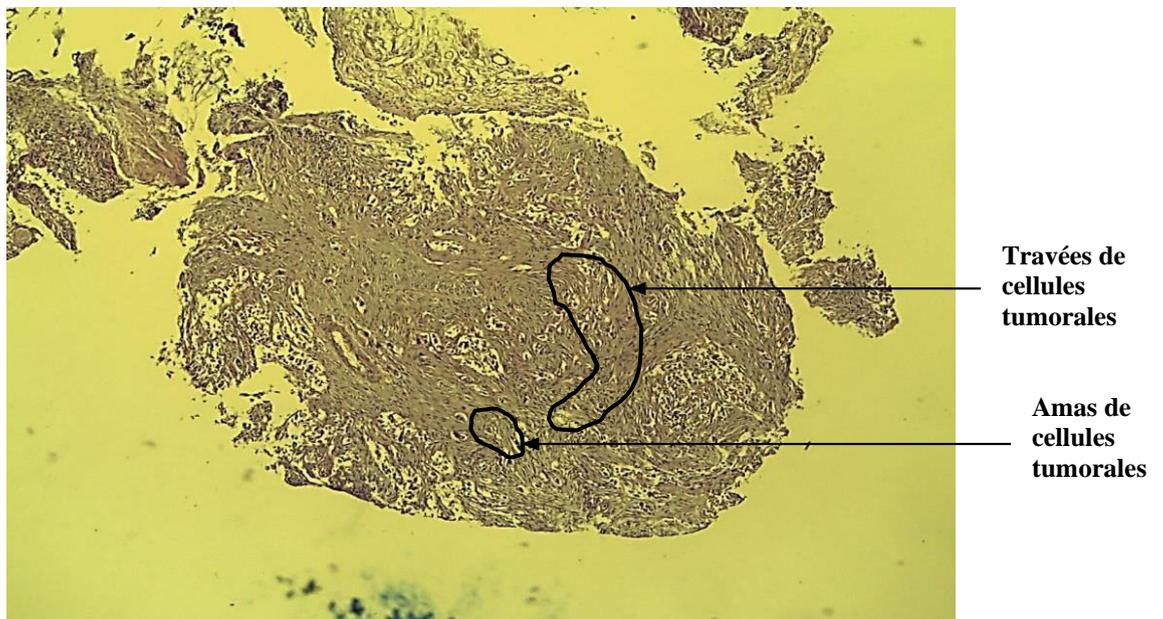


**Figure 41.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire TTF1 positif marquage nucléaire intense et diffusion des cellules tumorales IHC (Gx4).



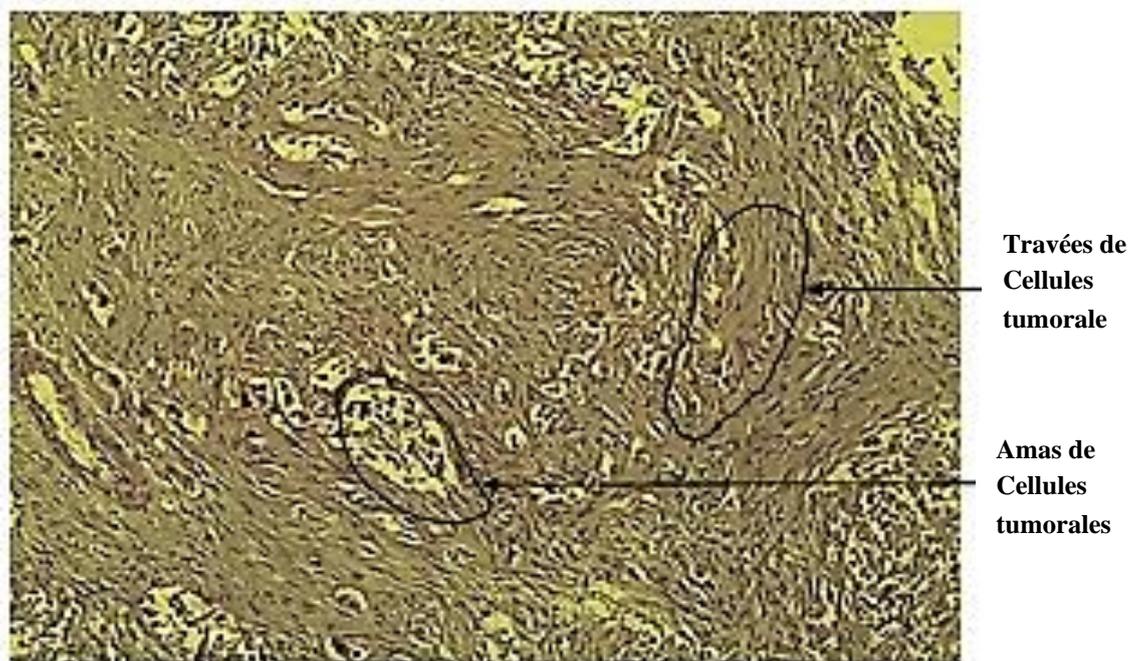
**Figure 42.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome Pulmonaire TTF1 positif IHC (Gx40).

**Cas 3 :**

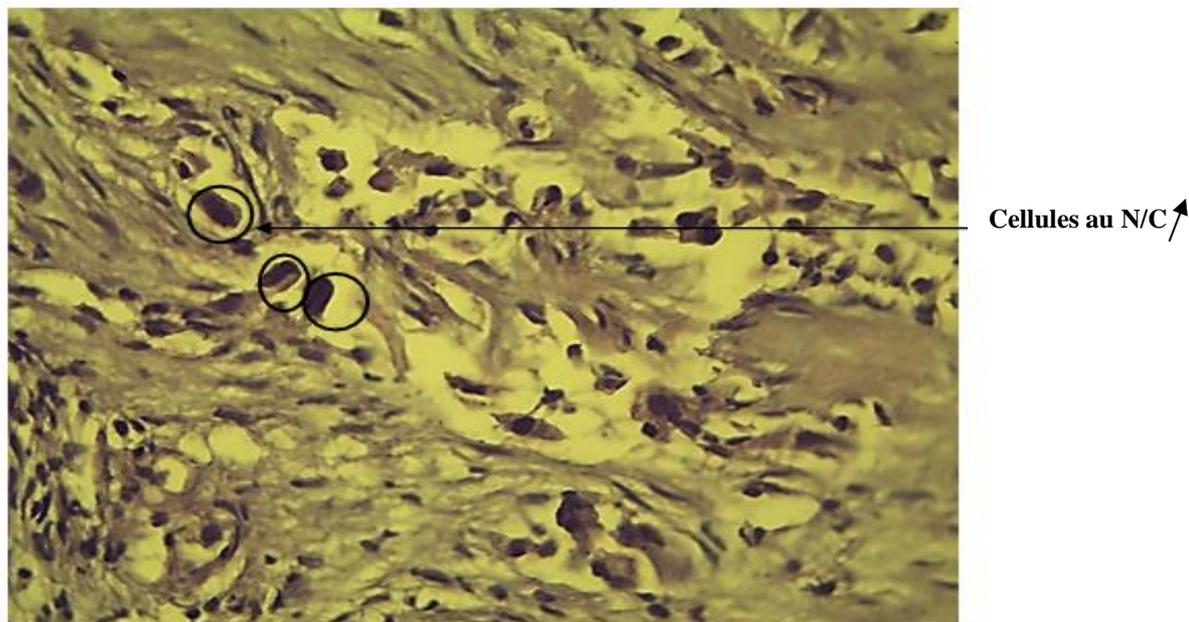


**Figure 43.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx4).

Vue microscopique au faible grossissement montrant un adénocarcinome pulmonaire agencé en amas, en travées de cellules tumorales

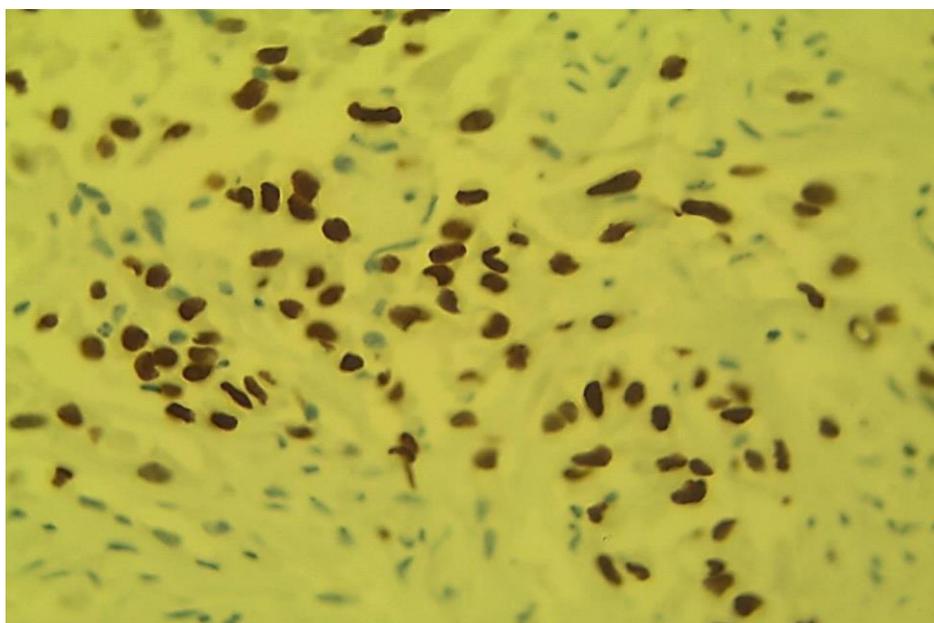


**Figure 44.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx10).



**Figure 45.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire HE (Gx40).

Vue microscopique au fort grossissement montrant des cellules tumorales de taille variable aux noyaux irréguliers



**Figure46.** Biopsie bronchique d'Adénocarcinome pulmonaire TTF1 positif IHC (Gx40).

### 3. Résultats de la technique de la PCR

Au sein de la population étudiée, sur les 19 échantillons où l'analyse a été réalisée, 9 mutations du gène EGFR étaient détectées. Soit 47% des cas, la recherche des mutations n'a pas pu être réalisée en raison de l'insuffisance en matériel tumoral chez 3 cas, soit dans 16 % de la population étudié et L'analyse a contribué à des résultats négatifs dans 7 patients soit dans 37 % des cas.

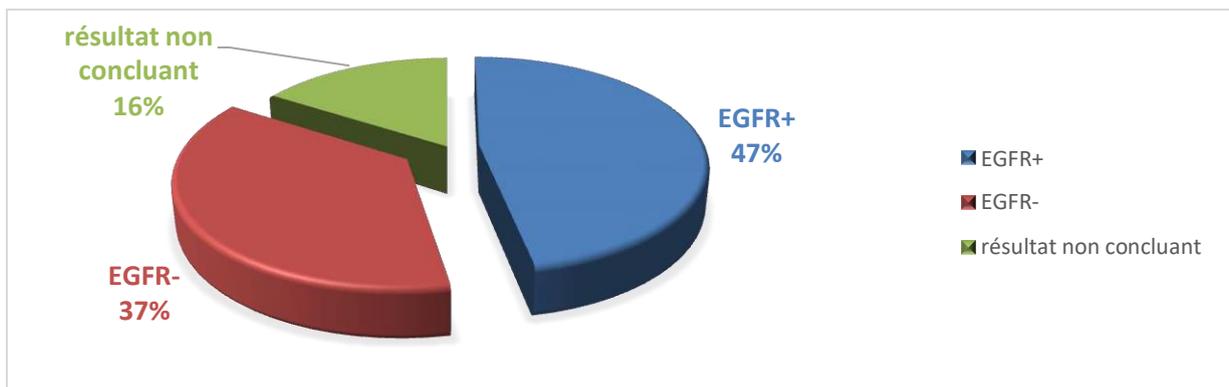
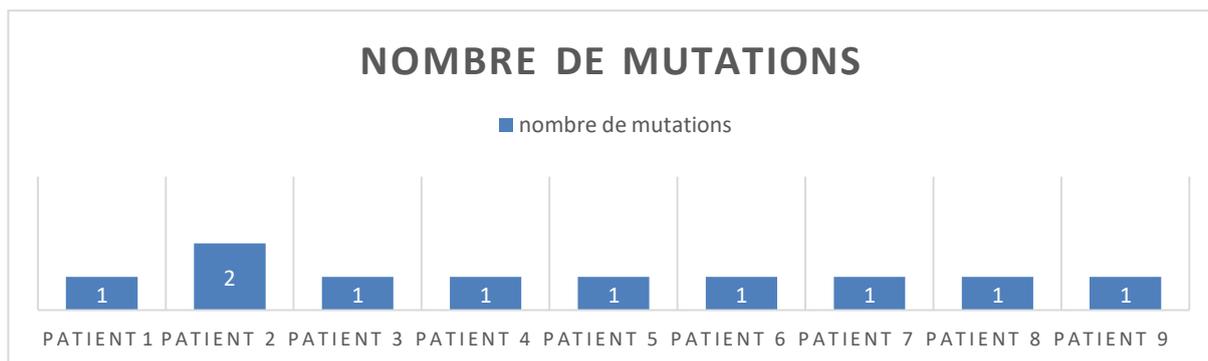


Figure 47. Nombre de patients qui manifestent la mutation EGFR.

Tableau 8. Répartition du nombre de mutation par patient.

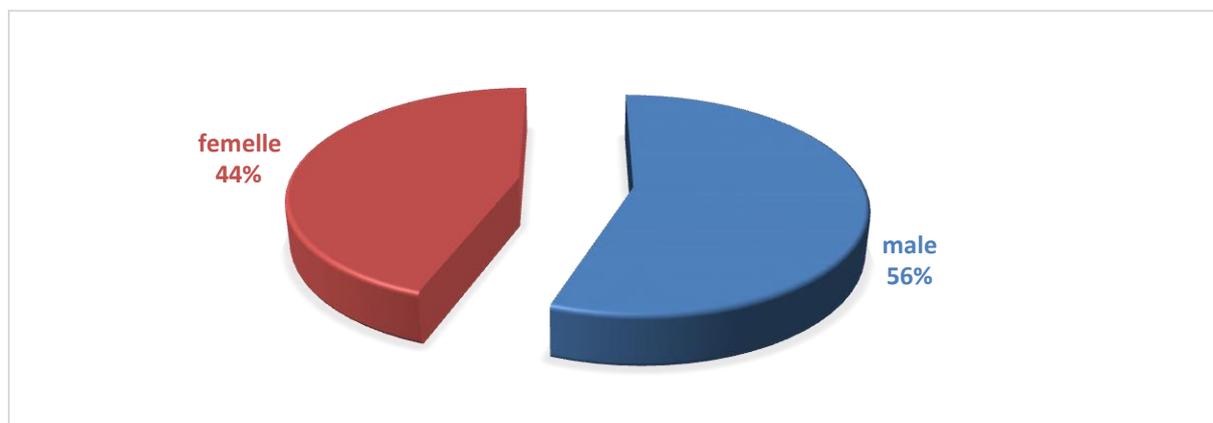
Patients	Nombre de mutation	Sexe F/M
1	1=délétion de l'exon 19	M
2	2=exon18 (G719/A/C/S) Exon20=S768I	M
3	1=délétion de l'exon 19	M
4	1= exon18 (G719/A/C/S)	M
5	1= délétion de l'exon 19	F
6	1=insertion de l'exon 20	F
7	1= délétion de l'exon 19	F
8	1= délétion de l'exon 19	M
9	1=délétion de l'exon 19	F

- ✓ Les mutations de l'exon 19 et l'exon 21 sont les mutations de l'EGFR les plus courantes, dans notre étude nous remarquons la présence de suppression de l'exon 19 chez 60% des cas et absence de mutation de l'exon 21.
- ✓ Les mutations de l'exon 18 (G719X) et l'exon 20 (S768I) sont quant à eux Des mutations peu fréquentes, la mutation (G719X) de l'exon 18 est présente chez 20% des cas, également 2 mutations de l'exon 20, une mutation S768I et une insertion sont présente chez 20% des cas.
- ✓ En outre, une mutation composée, combinaisons de 2 mutations peu communes G719X / S768I a été détectée.



**Figure 48.** Répartition de mutations par patients.

- ✓ Nous avons noté que 8 patients (89%) présentés 1 mutation chacun et 1 patient porteur de 2 mutations représentant (11%) des cas.



**Figure 49.** Répartition des mutations par sexe.

### 3.1. Type de mutations du gène de l'EGFR trouvés

Les résultats du test de recherche des mutations EGFR s'est avéré positif chez 9 patients soit 47% des cas, sur les 9 patients, où l'analyse a été réalisée, il a été détecté 10 mutations du gène EGFR.

- **Exon 18** Il a été détecté 2 mutations G719A de l'exon 18 soit 20%.
- **Exon 19** Il a été détecté 6 suppressions de l'exon 19 soit 60%.
- **Exon 20** Il a été détecté 2 mutations de l'exon 20, 1 mutation S768I et une insertion soit 20%.
- **Exon 21** Aucune mutation de l'exon 21 n'a été détectée soit 0%.

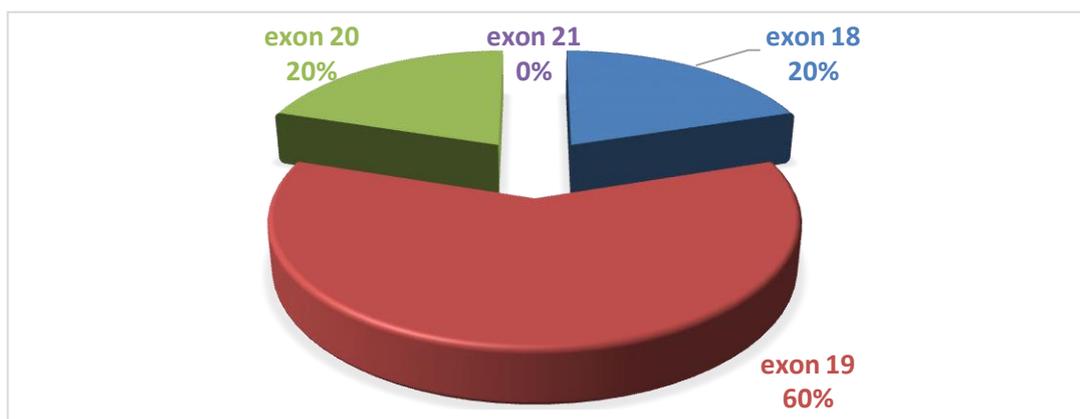


Figure 50. Répartition des mutations du gène EGFR.

#### 4. Etude immunohistochimique

Un aspect morphologique et un profil immunohistochimique d'un carcinome non à petites cellules en faveur d'un adénocarcinome convient à l'expression de TTF1+ et P63- .

Pour prouver le diagnostic posé l'étude de l'expression de TTF1 et P63 a été réalisé.

Ck7/ck20 et wt1 ont notamment été analysés chez un groupe de cas.

Les résultats de l'étude immunohistochimique figurent chez 15 cas sur 19 de notre série de patients.

Tableau 9. Tableaux résumant le profil mutationnel EGFR et le profil immunohistochimie chez une série de 19 patients.

Patients	Profil mutationnelle EGFR	Etude immunohistochimique
1	RESULTAT NON CONCLUANT	-----
2	EGFR+	P63-/TTF+
3	EGFR+	TTF1+
4	EGFR+	TTF1+/P63-
5	EGFR-	CK7+CK20-P63-
6	EGFR-	TTF1-
7	EGFR-	TTF1+P63-
8	EGFR-	TTF1+
9	EGFR+	TTF1+/P63-
10	RESULTAT NON CONCLUANT	CK7+/TTF1-/P63-
11	EGFR+	-----
12	EGFR+	-----
13	EGFR-	TTF+/CK7+/CK20-
14	RESULTAT NON CONCLUANT	CK7+/CK20-
15	EGFR+	TTF1+
16	EGFR+	-----
17	EGFR-	TTF1+/P63-
18	EGFR-	CK7+/TTF1-/P63-
19	EGFR+	TTF1+/CK20-

*Chapitre IV :*  
*Discussion*

## Chapitre IV Discussion

Ce travail est une étude rétrospective menée au service d'anatomie et de cytologie pathologique ISSAAD HASSANI Beni Messous, concernant l'étude du statut mutationnelle EGFR chez une série de 19 patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire par PCR en temps réel utilisant logiciel nouvellement établi Idylla. Les résultats obtenus ont été récupérés de dossier provenant de l'archive du service d'anatomie et de cytologie pathologique dans une durée de 14 mois du janvier 2021 au février 2022.

Nos Résultats sont en désaccord avec le littérature qui conclut que l'adénocarcinome pulmonaire touche essentiellement la population féminine, près de 50-65% des femmes souffrant d'un cancer du poumon ont un adénocarcinome. Alors que représentent 25-40% chez l'homme.<sup>1</sup>

Également autre recherche à mentionner qu'un tiers des patients sont des femmes, près de 35 % des patients touchés par un cancer du poumon en 2020 sont, en effet, des femmes. La proportion était à 16 % en 2000. « **Jusqu'à présent, le profil classique du cancer bronchique était un homme ouvrier fumeur. Ce n'est plus le cas. On peut même parler d'une pandémie mondiale de cancer du poumon chez les femmes** » selon Didier Debieuvre.<sup>2</sup>

Aux États-Unis, la maladie est déjà la première cause de mortalité par cancer chez la femme. En France, il s'agit de la deuxième cause aujourd'hui. « **C'est directement lié à l'augmentation du tabagisme chez les femmes et à un tabagisme plus tardif,** assure **Didier Debieuvre.**<sup>2</sup>

- ✓ Cette différence trouve son origine dans des différences quantitatives entre les différents sexes dans les séries étudiées.

On observe d'après le résultat obtenu que l'adénocarcinome pulmonaire est le type de CBNPC plus fréquente, qui est relative au d'autres recherches qui montre que les sous-types les plus fréquemment rencontrés sont dans un l'ordre décroissant, les adénocarcinomes (40- 60%), les carcinomes épidermoïdes (30-40%) et les carcinomes à grandes cellules (10%).<sup>63</sup>

On observe que notre résultat est en accord avec une recherche de 2017 en France métropolitaine qui a trouvé que pour les personnes âgées de 85 ans et plus, 37 305 décès par

cancers sont estimés, soit 24,8 % de l'ensemble de la mortalité par cancer. Chez l'homme, le cancer du poumon (14 198 décès), Chez la femme, cancer du poumon (6 306 décès).<sup>3</sup>

De même, La survie nette à 10 ans dans les cancers du poumon est de 9 %, tous âges confondus. Elle passe de 17 % pour les sujets de 15-44 ans (13 % chez l'homme et 25 % chez la femme) à 5 % chez les 75 ans et plus (5 % chez l'homme et 4 % chez la femme).<sup>3</sup>

- ✓ Cette similarité due à l'augmentation régulière de l'incidence du cancer bronchique au cours de la vie et un pronostic très sombre qui est lié à la longue latence de ce cancer qui est souvent diagnostiqué à un stade tardif. La maladie toujours diagnostiquée à un stade trop avancé diminue la chance de la survie et de la guérison.

L'aboutissement a notre résultat se conforme à plusieurs travaux réalisés qui élucident que le tabaca beau être l'un des premiers facteurs de risque dans le développement du cancer du poumon, il est loin d'être le seul. Les personnes n'ayant jamais touché à une cigarette de leur vie peuvent donc être concernées par cette maladie.

Chez les patients du cancer du poumon, la proportion des non-fumeurs a passé de 7,2 % en 2000 à 12,6 % en 2020, selon une nouvelle étude dévoilée lors du Congrès de pneumologie de langue française, qui s'est tenu du 21 au 23 janvier.<sup>2</sup>

Les scientifiques rencontrent encore des difficultés à livrer une explication solide à cette augmentation, mais plusieurs hypothèses sont avancées. **« La part des non-fumeurs augmente dans toutes les tranches d'âge, surtout chez les personnes âgées. Si on est optimiste, on pourrait dire que peut-être la lutte contre le tabagisme commence à porter ses fruits »**, éclaire le docteur **Didier Debievre**, investigateur de l'étude et chef du service de pneumologie de l'hôpital Emile Muller à Mulhouse.<sup>2</sup>

**« L'autre raison probable, c'est que la proportion des personnes âgées augmente dans la population et tout simplement le risque de cancer augmente naturellement avec l'âge. »**<sup>2</sup>

En France, on estime qu'une personne sur quatre atteintes d'un cancer du poumon n'a jamais fumé. Ce cancer bronchique du non-fumeur est la septième cause de mortalité par cancer dans le monde et au neuvième rang chez les femmes en Europe.<sup>4</sup>

Au Royaume-Uni, où a été menée la présente étude, les chercheurs estiment qu'environ "6 000 personnes qui n'ont jamais fumé meurent chaque année d'un cancer du poumon",

avance le professeur **Paul Cosford**, directeur de la protection de la santé et directeur médical, Public Health England.<sup>4</sup>

Il peut également survenir chez les non-fumeurs. Ces derniers représentent entre 10% et 25% des cas. Dans une nouvelle étude, publiée le 6 septembre 2021 dans la revue *Nature Genetics*, des chercheurs américains du National Cancer Institute (NCI) se sont penchés sur ces patients et ont décrit pour la première fois trois sous-types moléculaires de cancer du poumon, auxquels ils ont attribué des noms musicaux : piano, mezzo forte et forte chez des personnes n'ayant jamais fumé.<sup>48</sup>

- ✓ Cette ressemblance expliquée comme suite, pendant trop longtemps, le cancer du poumon n'a été considéré que comme une maladie liée au tabagisme, mais comme le montrent ces travaux y a la nécessité de poursuivre les recherches sur le cancer bronchique du non-fumeur, mais aussi d'attirer l'attention sur les facteurs de risque sous-jacents que constituent, par exemple, le tabagisme passif et l'exposition professionnelle à des agents cancérigènes, le radon ou la pollution extérieure<sup>4</sup>, les facteurs hormonaux chez la femme ou encore les facteurs génétiques ou alimentaires.<sup>2</sup> Ainsi que, 40 % des cancers bronchiques du non-fumeur restent inexpliqués.

Une mutation du gène de l'EGFR a été retrouvée chez le tiers de nos patients porteurs d'un adénocarcinome pulmonaire malgré leur statut tabagique et moyenne d'âge qui est en arrangement avec d'autres travaux qui clarifient que les patients atteints de cancers du poumon avec des mutations de l'EGFR ont tendance à avoir peu ou pas d'antécédents de tabagisme. Mais des mutations de l'EGFR peuvent apparaître chez les patients atteints d'un cancer du poumon avec différents sous-types et antécédents de tabagisme.<sup>5</sup>

Dans une étude la fréquence des mutations de l'EGFR était de 40% chez les non-fumeurs et 7% chez les fumeurs. Enfin, ladite fréquence était de 16 % dans les adénocarcinomes et de 3 % dans les autres formes histologiques.<sup>6</sup>

Aussi une autre étude a démontré que la présence d'une mutation est plus fréquente chez certaines catégories de patients. Elle se retrouve, en effet, plus souvent chez les femmes, les non-fumeurs, les personnes d'origine asiatique ou chez les personnes atteintes d'adénocarcinome.<sup>7</sup>

- Les mutations de classe I comprennent de courtes délétions comme dans l'exon 19. Les mutations de classe II sont des substitutions d'un seul nucléotide qui peuvent se

Produire dans les exons 18 à 21. Mutations de classe III sont des duplications et/ou des insertions dans le cadre qui se produisent principalement dans l'exon 20. Parmi toutes les mutations du domaine TK, 85 à 90 % sont des délétions de l'exon 19 de classe I et des mutations de l'exon 21 L858R.<sup>8</sup>

La mutation EGFR est présente quasi exclusivement pour les adénocarcinomes.<sup>9</sup> Parmi les mutations de l'EGFR détectées, dans notre étude, la mutation de l'exon 19 est la plus fréquente représentant 60 % des cas. Ensuite les mutations de l'exon 18 présentées chez 20 % des cas ainsi que l'exon 20 et Les mutations de l'exon 21 représentent 0 % des mutations identifiées. Nos résultats rejoignent les données de l'Institut national du cancer (INCa), qui a retrouvé 55 % des mutations identifiées sont localisées sur l'exon 19 du gène EGFR, également en France plus précisément en Lorraine. Parmi les mutations de l'EGFR détectées, la mutation de l'exon 19 est la plus fréquente et représente 57,3 %.<sup>53</sup>

Dans notre étude, nous avons noté que la mutation d'exon 19 est la plus courante. Nos résultats rejoignent ceux de **Clinical Cancer Research "Truini et al."** en 2019 qui a retrouvé les mutations des délétions de l'exon 19 de l'EGFR (Ex19Del) représentent environ 60 % des mutations de l'EGFR associées au cancer du poumon et comprennent un groupe hétérogène de mutations. Bien qu'ils soient associés aux avantages des inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK), la sensibilité relative aux inhibiteurs des mutations Ex19Del individuelles est inconnue.<sup>10</sup>

Délétions de l'exon 19 et mutations ponctuelles dans l'exon 21 constitue 80–90% des mutations EGFR, Ces mutations sont connues sous le nom de mutations communes. Cette littérature est en accord de nos résultats à propos de la première partie qui parle de la fréquence des mutations d'exon 19, mais en désaccord avec la deuxième partie concernant la mutation d'exon 21. Cette dissemblance revient toujours au nombre des patients étudiés.

- En Pilsen une étude sur les mutations de l'EGFR a trouvé que les mutations peuvent également se produire en combinaison, soit sous la forme de deux mutations communes, communes et rares ou de deux mutations rares ensemble. Les chercheurs de ce travail **Martin Svaton, MD, Ph.D et al.** Présentons un rapport de cas d'un patient avec deux mutations rares traité par gefitinib.<sup>11</sup> qui correspondant à notre cas a doublé mutation trouvé.

Dans nos résultats, Nous avons remarqué la présence d'une mutation rare chez 1 patient qui rejoignent ceux de l'expérience de La mutation EGFR au niveau d'une entreprise pharmaceutique suisse "**Roche Holding**" Etablie en janvier 2021 qui est en accord avec notre résultat obtenu, il existe quelques types de mutation rares qui sont traités différemment de ceux des mutations EGFR les plus courantes. L'exemple majeur de cela dans le cancer du poumon est l'insertion de l'exon 20 de l'EGFR. Il s'agit d'un type de mutation EGFR qui ne répond pas au traitement typique du cancer du poumon EGFR-positif, appelé inhibiteurs de la tyrosine kinase ou ITK, peuvent recevoir une chimiothérapie ou le médicament de thérapie ciblée Amivantamab-vmjw.<sup>5</sup>

Des données de la littérature qui vont dans le sens de nous résultat d'une double mutation 18 et 20 à la fois, au Japon **Naokata Kutsuzawa et al.** En septembre 2020, constate que la suppression de l'exon 19 et la mutation L858R dans l'exon 21 sont les mutations EGFR les plus courantes. Des mutations peu fréquentes, telles que G719X, S768I et L861Q, et des mutations composées, combinaisons de 2 mutations communes ou peu communes, ont également été rapportées.

Une autre étude française rétrospective sur mutations de l'EGFR des exons 18 et 20 : a montré que ces mutations représentent jusqu'à 10 % des mutations de l'EGFR, et seraient respectivement plus fréquentes chez les fumeurs et les non-fumeurs.<sup>12</sup>

Selon l'étude IHC, un marquage par des marqueurs moléculaire (TTF1, CK7) est positif réfère à l'adénocarcinome.

Le facteur de transcription TTF-1 (thyroid-transcription factor-1) TTF-1 est un des gènes de régulation du développement pulmonaire. Son expression est corrélée au degré de différenciation cellulaire dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. TTF-1 est spécifiquement exprimé dans les adénocarcinomes pulmonaires et dans les 3 formes acinaire, papillaire et bronchioalvéolaire. De plus, TTF-1 semble être impliqué dans la prolifération des adénocarcinomes pulmonaires.<sup>13</sup>

Plusieurs études rétrospectives ont été réalisées pour déterminer la valeur pronostique de TTF-1 dans les carcinomes pulmonaires et particulièrement dans les NSCLC. Certaines études montrent que la présence de TTF-1 dans les NSCLC est associée à un mauvais pronostic mais plusieurs autres s'accordent pour dire que son expression est associée à un bon pronostic : plus son expression est forte, plus le pronostic est favorable. De plus, les études

d'**Anagnostou et al.** Et **Barlesi et al.** Montrent que les patients atteints d'adénocarcinomes de type I, positifs pour TTF-1, ont un meilleur taux de survie que ceux n'exprimant pas TTF-1. Enfin, **Barletta et al.** Concluent qu'une perturbation de son expression (absence ou surexpression) est de moins bon pronostic.<sup>13</sup>

TTF-1 est donc un bon marqueur diagnostique dans les cancers pulmonaires, il permet de discriminer une tumeur pulmonaire primaire de celle d'une métastase dans le poumon. S'il est normalement exprimé, il est défini comme un facteur de bon pronostic dans les NSCLC mais sa valeur pronostique dans les SCLC reste à prouver.<sup>13</sup>

La cytokératine CK7 est exprimée dans les cancers pulmonaires. CK7+/TTF1+ étant observée dans environ 85 % des cancers pulmonaires.<sup>14</sup>

*Conclusion et  
perspective*

# Conclusion et perspective

À la fin de ce travail, nous avons atteint l'objectif important d'analyser le statut mutationnel de l'EGFR dans l'adénocarcinome, qui a permis l'identification des mutations de l'EGFR dans le but de fournir les thérapies les plus appropriées et ciblées pour réguler les voies de signalisation impliquées dans le processus oncogène de l'EGFR dans le cancer du poumon.

Aussi, pour clarifier les caractéristiques histologiques et moléculaires du carcinome broncho-pulmonaire.

Représentant la cause principale de mortalité dans le monde par cancer, cela principalement en raison du diagnostic non seulement retardé, mais aussi à un stade avancé. Le cancer pulmonaire non à petites cellules (NSCLC) représente 85% des cancers pulmonaires, et l'adénocarcinome est le type histologique le plus rencontré.

Le récepteur EGFR est exprimé par la plupart des NSCLC. Son importance relative dans la carcinogénèse et la progression tumorale semble varier grandement.

La recherche de mutations du gène EGFR est essentielle pour la décision thérapeutique devant un adénocarcinome (ADK) pulmonaire, parce que connaître le statut EGFR muté est nécessaire pour proposer un traitement par les inhibiteurs de la tyrosine kinase anti-EGFR adéquat. Donc Il est crucial d'avoir un diagnostic moléculaire afin de pouvoir initier une thérapie ciblée.

Bien que le tabac soit la principale cause de cancer du poumon, les agents cancérigènes environnementaux, tels que le radon, la pollution de l'air ; la bronchite chronique, jouant un rôle de plus en plus important dans le développement de cette maladie, soit de manière indépendante, soit par des effets additifs ou multiplicatifs. L'altérations de divers gènes est également impliqués.

L'EGFR transmet les signaux de prolifération et de survie cellulaires, et joue un rôle clé dans la pathogénèse et le traitement du cancer du poumon non à petites cellules. La présence d'une mutation EGFR est un facteur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK).

Toutes les mutations étant des mutation seul ou combiné n'entraînent pas les mêmes effets : certaines mutations sont associées à une résistance aux ITK.

Le traitement avec des inhibiteurs de la tyrosine kinase du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR-TKI) par blocage de ses voies de signalisations représente la meilleure approche pour améliorer le taux de survie des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire muté par l'EGFR. Savoir comment réduire la toxicité des traitements est essentiel pour une guérison réussie

Cependant cette approche thérapeutique est limitée en raison du développement de la résistance aux ITK-EGFR comme la mutation EGFR T790M dans l'exon 20 qui est l'altération la plus fréquente associée au développement de la résistance acquise

Comprendre et rechercher les altérations moléculaires, ainsi que détecter la mutation EGFR de résistance T790M dans l'exon 20 est une priorité élevée, Tout dans l'espoir d'augmenter considérablement les taux de guérison du cancer du poumon.

Une bonne communication clinicien-patient et la une coopération étroite entre les spécialistes devrait également devenir l'étalon-or dans les soins cliniques complets des patients atteints d'adénocarcinome avancé recevant des ITK.

## Références

1. EGFR - Mutation génétique du cancer du poumon. <https://www.roche.fr/fr/patients/info-patients-cancer/diagnostic-cancer/diagnostic-cancer-poumon/mutation-egfr.html>.
2. Canada, A. de la santé publique du. Cancer du poumon. <https://www.canada.ca/fr/sante-publique/services/maladies-chroniques/cancer/cancer-poumon.html> (2009).
3. Akciğer kanseri son evre ölüm belirtileri. *www.haberturk.com*  
<https://www.haberturk.com/akciger-kanseri-son-evre-olum-belirtileri-akciger-kanseri-son-evre-ne-kadar-yasar-htbl-3471761> (2022).
4. Cancer. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/cancer>.
5. Lahmadi, M. *et al.* Analysis of EGFR Mutation Status in Algerian Patients with Non-Small Cell Lung Cancer. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **22**, 1063–1068 (2021).
6. Pallis, A. G. & Syrigos, K. N. Lung cancer in never smokers: Disease characteristics and risk factors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **88**, 494–503 (2013).
7. Radiologic Clinics of North America.  
<https://radiologic.theclinics.com//retrieve/pii/S0033838912001236>.
8. Risk factors of Lung Cancer in nonsmoker - ScienceDirect.  
<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0147027216302124?via%3Dihub>.
9. Jain, A. S. *et al.* Everything Old Is New Again: Drug Repurposing Approach for Non-Small Cell Lung Cancer Targeting MAPK Signaling Pathway. *Front. Oncol.* **11**, (2021).
10. chosun, health. 담배 말고... 폐암 유발 원인 6 가지.  
[https://m.health.chosun.com/svc/news\\_view.html?contid=2022062102070](https://m.health.chosun.com/svc/news_view.html?contid=2022062102070).
11. cancer-poumon.
12. [https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre\\_3.html](https://www.ipubli.inserm.fr/bitstream/handle/10608/102/Chapitre_3.html).
13. InfoCancer - ARCAGY-GINECO - Cancer du poumon - Traitements - La chimiothérapie ciblée.  
<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/voies-aeriennes/cancers-poumon/traitements/la-chimiotherapie-ciblee.html/>.

14. Lee, S. Tumeurs cancéreuses du poumon. *Société canadienne du cancer*  
<https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/lung/what-is-lung-cancer/cancerous-tumours>.
15. Lung Cancer: Diagnosis, Treatment Principles, and Screening.  
<https://www.aafp.org/pubs/afp/issues/2015/0215/p250.html>.
16. Bizieux-Thaminy, A., Hureaux, J. & Urban, T. Cancers bronchiques primitifs : bilan diagnostique et traitement. *EMC - Médecine* **1**, 8–17 (2004).
17. Akciğer Kanseri Belirtileri ve Tedavi Yöntemleri. <https://www.medicalpark.com.tr/akciger-kanseri-belirtileri/hg-1773>.
18. Bajwa, D. W. Lung Cancer Overview. *Urine or Urout*  
<https://drwardabajwa.wordpress.com/2018/10/13/lung-cancer-overview/> (2018).
19. Yokota, J. & Kohno, T. Molecular footprints of human lung cancer progression. *Cancer Sci.* **95**, 197–204 (2004).
20. Moreau, D. *et al.* Profils moléculaires des cancers bronchiques non à petites cellules à la Réunion. *Rev. Mal. Respir. Actual.* **12**, 116–117 (2020).
21. Barta, J. A., Powell, C. A. & Wisnivesky, J. P. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann. Glob. Health* **85**, 8.
22. Thérapies ciblées du cancer pulmonaire : tests moléculaires à partir d'échantillons cytologiques. *Revue Medicale Suisse* <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2011/revue-medicale-suisse-303/therapies-ciblees-du-cancer-pulmonaire-tests-moleculaires-a-partir-d-echantillons-cytologiques>.
23. Ozenne, P. Contrôle de la signalisation oncogénique du mutant L858R de l'EGFR par la protéine suppresseur de tumeur p14ARF dans les adénocarcinomes pulmonaires. 188.
24. Id, H. Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14arf et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules. 254.

25. Lee, N. Y., Hazlett, T. L. & Koland, J. G. Structure and dynamics of the epidermal growth factor receptor C-terminal phosphorylation domain. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **15**, 1142–1152 (2006).
26. Kobayashi, Y. & Mitsudomi, T. Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci.* **107**, 1179–1186 (2016).
27. Ruppert, A.-M. *et al.* Un regard simple sur la biologie du cancer bronchique : EGFR. *Rev. Mal. Respir.* **28**, 565–577 (2011).
28. Cell Biology Promotion. <https://www.cellbiol.net/ste/alpHERCEPTIN3.php>.
29. Harrison, P. T., Vyse, S. & Huang, P. H. Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin. Cancer Biol.* **61**, 167–179 (2020).
30. Wissler, M.-P. 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. 136.
31. Signalisation en aval d'EGFR : 165.
32. Cortot, A. Rôle du récepteur à l'EGF dans la survenue et le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules – EGFR plays a key-role in the pathogenesis and treatment of non-small-cell lung cancer. 7 (2007).
33. JAK/STAT : une voie impliquée dans la pathogénèse de la DA.  
<https://www.abbviepro.com/fr/fr/immunologie/dermatologie/pathologies-et-environnement/jak-stat-voie-impliquee-dans-pathogenese-da.html>.
34. A schematic summary of the approved TKIs in 2001–2020. NMPA National... *ResearchGate*  
[https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-summary-of-theapproved-TKIs-in2001-2020-NMPA-National-Medical-Products\\_fig1\\_345808846](https://www.researchgate.net/figure/A-schematic-summary-of-theapproved-TKIs-in2001-2020-NMPA-National-Medical-Products_fig1_345808846).

35. Solassol, I., Pinguet, F. & Quantin, X. FDA- and EMA-Approved Tyrosine Kinase Inhibitors in Advanced EGFR-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer: Safety, Tolerability, Plasma Concentration Monitoring, and Management. *Biomolecules* **9**, 668 (2019).
36. Thérapies ciblées du cancer pulmonaire : tests moléculaires à partir d'échantillons cytologiques. *Revue Medicale Suisse* <https://www.revmed.ch/revue-medicale-suisse/2011/revue-medicale-suisse-303/therapies-ciblees-du-cancer-pulmonaire-tests-moleculaires-a-partir-d-echantillons-cytologiques>.
37. Masson, E. Mécanismes d'action des thérapeutiques ciblées... et mécanismes de résistance. *EM-Consulte* <https://www.em-consulte.com/article/146568/mecanismes-d-action-des-therapeutiques-ciblees?-et>.
38. Karachaliou, N., Fernandez-Bruno, M., Bracht, J. W. P. & Rosell, R. EGFR first- and second-generation TKIs—there is still place for them in EGFR -mutant NSCLC patients. *Transl. Cancer Res.* **1**, (2019).
39. Bollen, L. Rapid EGFR Mutation Testing in Lung Cancer Samples: The Idylla™ System. **1** (2019).
40. Kuslich, C. D., Chui, B. & Yamashiro, C. T. Overview of PCR. *Curr. Protoc. Essent. Lab. Tech.* **18**, (2019).
41. *Theranostics: Methods and Protocols*. vol. 2054 (Springer New York, 2019).
42. You, Z. Etude de la morphologie et de la distribution des neurones dans le cerveau de macaque par microscopie optique. (Université Pierre et Marie Curie, 2017).
43. Joobeur, S. et al. Adénocarcinome pulmonaire primitif: expérience d'un centre hospitalier tunisien. *Pan Afr Med J* **21**, 216 (2015).
44. Qi, Y. Cancer du poumon : la part des non-fumeurs double en vingt ans, selon une nouvelle étude. *Ouest-France.fr* <https://www.ouest-france.fr/sante/cancer/cancer-du-poumon-la-part-des-non-fumeurs-double-en-vingt-ans-selon-une-nouvelle-etude-8627e1b8-7dc4-11ec-92fb-6689e2d2ee1b> (2022).

45. Épidémiologie des cancers chez les patients de 65 ans et plus - Oncogériatrie. <https://www.e-cancer.fr/Professionnels-de-sante/L-organisation-de-l-offre-de-soins/Oncogeriatrie/Epidemiologie>.
46. pourquoidocteur.fr. Cancer du poumon : les non-fumeurs ne sont pas épargnés et sont souvent sous-diagnostiqués. [www.pourquoidocteur.fr](http://www.pourquoidocteur.fr)  
<https://www.pourquoidocteur.fr/Articles/Question-d-actu/29179-Cancer-poumon-non-fumeurs-epargnes-sont-souvent-sous-diagnostiques> (2019).
47. EGFR and Lung Cancer. <https://www.lung.org/lung-health-diseases/lung-disease-lookup/lung-cancer/symptoms-diagnosis/biomarker-testing/egfr>.
48. da Cunha Santos, G., Shepherd, F. A. & Tsao, M. S. EGFR mutations and lung cancer. *Annu. Rev. Pathol.* **6**, 49–69 (2011).
49. Truini, A. *et al.* The EGFR Exon 19 Mutant L747-A750>P Exhibits Distinct Sensitivity to Tyrosine Kinase Inhibitors in Lung Adenocarcinoma. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 6382–6391 (2019).
50. [www.Meditorial.cz](http://www.Meditorial.cz). Current Two EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma – Case Report.  
<https://www.prolekare.cz/en/journals/clinical-oncology/2015-2-3/current-two-egfr-mutations-in-lung-adenocarcinoma-case-report-51850>.
51. Younes, M. Etude des relations entre les mutations EGFR/KRAS et les altérations de la voie p53/p14arf et caractérisation d'une nouvelle cible thérapeutique, le complexe neurotensine et son récepteur1, dans les cancers bronchiques non à petites cellules. 254.
52. Gilbert-Sirieix, M. & Massaad-Massade, L. TTF-1 : ni ange ni démon. *médecine/sciences* **27**, 183–186 (2011).
53. Conduite à tenir devant des métastases hépatiques de primitif inconnu. *FMC-HGE*  
<https://www.fmcgastro.org/texte-postu/postu-2020-paris/conduite-a-tenir-devant-des-metastases-hepatiques-de-primitif-inconnu/>.

## Annexe I : Matériel non biologique utilisé

### Matériels pour le teste Idylla™ EGFR

- Test de mutation Idylla™ EGFR.
- Cercle de papier filtre qualitatif (ex : Whatman™ Grade 1, diamètre : 10 mm, taille des pores : 11 µm), (marque)
- lames de Microscope
- Eau distillé.
- Lames de rasoir stériles pour microtome.
- Pinces nettoyées et stérilisées pour transférer la coupe FFPE.
- Centrifugeuse de laboratoire avec rotor à godets oscillants atteignant au moins 2000g
- Microtome de laboratoire pour couper les blocs FFPE

### Matérielles pour la technique d'immunohistochimie

Tampons et réactif	Matériels de laboratoire
Eau distillés et eau de robinet	Bacs
TRS(tris bufferd saline)	Etuve,microtome, bain-marie
TBS(Target Retrieval Solution 50x)	Lame de microscope
Substrat + chromogène DAB	Micropipette
Anticorp primaire	De la gaz pour la chambre humide
Anticorp secondaire	Hydrophobic pen (dako pen)
H2O2(Le peroxyde d'hydrogène)	
Xylène et alcool	
Hémtoxylène pour la contrecoloration	

En pratique l'anatomie pathologique concerne les prélèvements cytologiques, les prélèvements biopsiques, les pièces opératoires et les autopsies. Elle comprend différentes techniques :

- La macroscopie
- L'histologie
- Les examens extemporanés
- La cytologie
- L'immuno-histochimie

Les Étapes :



L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire : la pièce est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée.

**Annexe II :** L'anatomie pathologique macroscopique (ou macroscopie), effectuée à l'œil nu

Le prélèvement est décrit et mesuré et, éventuellement, schématisé ou photographié (selon des protocoles pré-établis pour chaque organe). Ensuite, les fragments de petite taille (biopsie, etc) sont mis en totalité dans une cassette plastique. Pour les grosses pièces, on sélectionne des tranches d'intérêt suivant le protocole adapté à la pathologie.

- ✚ En cas d'échantillon dédié à l'IHC, il est recommandé de le prélever d'emblée et de le fixer avant l'étude macroscopique complète de la pièce.
- ✚ La fixation est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement. La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une biopsie et 48 heures pour une pièce opératoire.

Les étapes suivantes sont effectuées dans le but d'obtenir des coupes de tissus colorées à partir des fragments précédemment mis en cassette, afin de les observer au microscope.



**Annexe III :** Automate ancienne génération de déshydratation/hydratation



On effectue le moulage du prélèvement dans un bloc de paraffine

**Annexe IV:** Paraffinage (L'imprégnation en paraffine)

Les prélèvements (contenus dans les cassettes) ont préalablement été fixés en formaldéhyde ou en AFA (Alcool/Formol/Acide acétique) ce qui permet la conservation morphologique des structures tissulaires et cellulaires. Ensuite on remplace l'eau des prélèvements par de l'alcool (déshydratation), puis par du xylène et enfin par de la paraffine fondue. Cette imprégnation est effectuée dans un automate. Le cycle dure environ quatorze heures, ce qui explique que les résultats ne peuvent être adressés au plus tôt que le lendemain.



**Annexe V : Le microtome**

La microtomie : Après refroidissement et démoulage des blocs de paraffine, on y fait des coupes de 4 à 5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur (grâce à un microtome) pour obtenir une seule couche de cellules. Ces coupes s'attachent les unes aux autres pour former un ruban.



Quelques coupes du ruban sont étalées sur des lames à l'aide d'eau, sur une platine chauffante.

**Annexe VI : le montage / l'étalement**

- ✚ Séchage des lames à l'air chaud, les lames placées dans un sèche-lames quelques minutes pour augmenter l'adhérence des coupes sur les lames.



**Annexe VII : Coloration**

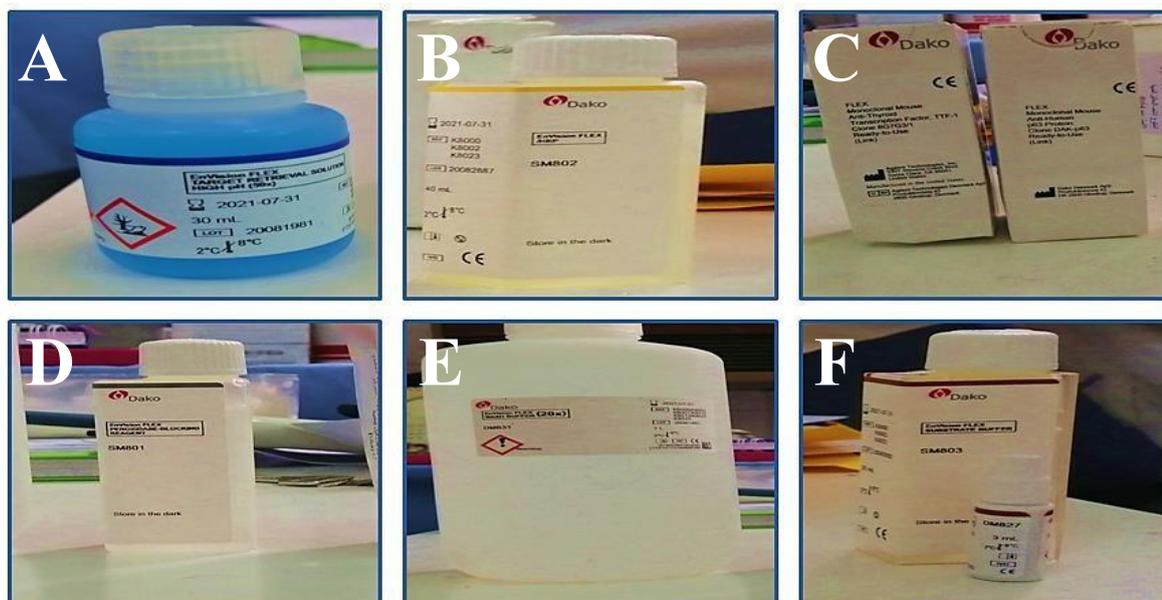
La coloration de routine (HES) est effectuée dans un automate. Après déparaffinage puis réhydratation, les coupes sont colorées par des passages dans des produits chimiques afin de différencier par des couleurs les composants du prélèvement (noyaux, cytoplasmes etc.).

- ✚ Ensuite, Le montage, après déshydratation, y a la colle d'une lamelle très fine sur la lame avec une goutte de baume/colle, pour une Lecture et interprétation et examinées au microscope.
- ✚ Archivage : Les lames et les blocs sont conservés indéfiniment.

- Compte-rendu : un compte-rendu dactylographié est adressé dans le service. Il est archivé sur ordinateur avec les renseignements cliniques et les conclusions codées.

<b>Exon 18</b>	G719A G719C G719S	c.2156G>C c.2155G>T; c.2154_2155delinsTT c.2155G>A
	Del9	c.2238_2248delinsGC c.2239_2248delinsC c.2240_2248del cc.2239_2247del
	Del12	c.2239_2251delinsC c.2240_2251del
<b>Exon 19</b>	Del15	c.2235_2249del c.2236_2250del c.2239_2253del c.2240_2254del c.2238_2252del c.2237_2251del c.2235_2252delinsAAT c.2237_2252delinsT c.2234_2248del c.2236_2253delinsCTA c.2237_2253delinsTA c.2235_2251delinsAG c.2236_2253delinsCAA c.2230_2249delinsGTCAA
<b>Exon 19</b>	Del18	c.2240_2257del c.2237_2255delinsT c.2239_2256del c.2236_2253del c.2239_2258delinsCA c.2237_2254del c.2238_2255del c.2237_2257delinsTCT c.2236_2255delinsAT c.2236_2256delinsATC c.2237_2256delinsTT c.2237_2256delinsTC c.2235_2255delinsGGT
	Del21	c.2238_2258del c.2236_2256del
	Del24	c.2253_2276del
	T790M	c.2369C>T
	S768I	c.2303G>T
<b>Exon 20</b>	insG insASV9 insASV11 insSVD insH	c.2310_2311insGGT c.2308_2309insGCCAGCGTG c.2308_2311delinsCCAGCGTGGAT c.2311_2312insGCGTGGACA c.2319_2320insCAC
<b>Exon 21</b>	L858R	c.2573T>G c.2573_2574delinsGT c.2573_2574delinsGA

Annexe VIII : les mutations EGFR détecte par le test Idylla™.



**Annexe IX :** Représentation des réactifs, tampon de lavage, solution de blocage (photo prise au centre hospitalo-universitaire ISSAD HASANI).

- A. TRS (Target retrieval solution high PH 50X°).
- B. L'anticorps secondaire (HRP : polymère d'enzyme).
- C. L'anticorps primaire (TTF1, P63).
- D. Réactif de blocage de la peroxydase.
- E. Solution de lavage TBS 20X.
- F. Substrat + chromogène DAB.



**Annexe X :** Automates d'Immuno-histochimie (Le BenchMark ULTRA).



**Annexe XI :** Système de test moléculaire basé sur la PCR en temps réel entièrement