

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

UNIVERSITE BLIDA-1-



FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

**Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du Diplôme de
MASTER**

*Option : BIOSIGNALISATION CELLULAIRE ET
MOLECULAIRE ; GENETIQUE DU CANCER*

THEME

***LE STATUT EGFR DANS LES ADENOCARCINOMES
PULMONAIRES***

Présenté et soutenu par :

M^r Soualmi Oussama

Devant le jury :

Mme MATAOUI H
Mme BEN AZZOUZ F
Pr. HANNACHI L
Mme. NADJI S

Maitre de Conférence B
Maitre Assistante A
Maitre de Conférence A
Maitre de Stage

Présidente
Examinatrice
Promotrice
Co-promotrice

-Promotion 2016-

Remerciements

Au terme de ce travail, je remercie Dieu de m'avoir donné le courage et la volonté pour bien mener ce mémoire de fin d'étude.

Ce travail est l'aboutissement d'un long cheminement au cours duquel j'ai bénéficié de l'encadrement, des encouragements et du soutien de plusieurs personnes à qui je tiens à dire profondément et sincèrement merci.

Je tiens à remercier ma promotrice Professeur Hannachi qui a bien voulu accepter de suivre ce travail et aussi pour sa disponibilité, son aide, son orientation, et son encouragement.

Ma co-promotrice Mlle Nadji siham pour son aide, son encouragement, et sa patience.

J'adresse aussi mes remerciements aux membres du jury :

- ❖ Mme Mataoui d'avoir accepté de présider ce jury.
- ❖ Mme Benazzouz d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Je tiens à remercier, tout particulièrement Mme saadi, chef de département et chef d'option «biologie moléculaire et cellulaire », de m'avoir suivi tout au long de ma spécialisation.

Je remercie aussi les enseignants qui nous ont guidés et transmis leurs connaissances tout au long de notre vie estudiantine.

Je remercie aussi mes parents pour leurs amours, leurs soutiens et leurs encouragements.

Dédicaces

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour, à ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans mes moments les plus difficiles et à ceux à qui je dois tant :

A mes parents Abderrahmen et Bahia, je tiens à vous exprimer ma gratitude et mon ressenti d'être la personne la plus chanceuse d'avoir des parents comme vous je vous aime tellement.

A la mémoire de ma grand-mère, aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour toi Yemma.

A ma grande sœur et ma deuxième maman Amina et à mon beau-frère et mon parrain Redha.

A mon frère et mon protecteur Karim et sa femme Farah.

A ma sœur et ma confidente Assia et mon frère de cœur Abdennour.

A ma Yasmine et son fiancé Billel.

A mes deux bébés d'amours Manel et Amel.

A mes neveux : Datou, Okba, Mamadou et Madjid.

A mes deux petites princesses : Hadil et Hawa.

A Tata Anima pour son aide et ces encouragements.

A mes oncles et mes tantes.

A mes cousins et mes cousines.

A Mohamed tmtc.

A ma meilleure amie, mon âme sœur et ma moitié Soumia.

A tous mes amis: Akram, Fouzia, Amira, Mimi, Fella, Louiza, Wissem, Billel, Wail, Sisi , Wiss , Sihem, Yasmine, Hadyl, Houcine, Zaki,Ouarda,Ichrak,Hadjer ,Oumria,el Hadi.

List des abréviations

CBNPC	carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules.
CBPC	carcinomes broncho-pulmonaires à petites cellules.
RTK	Récepteur à activité tyrosine kinase.
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor.
PI3-K	Phosphatidyl-Inositol 3-Kinases.
PTEN	Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10.
PI3,4,5;P3	Phosphatidyl-Inositol-3,4,5-triphosphate.
PDK1	Phosphatidylinositol 3-Dependent-Kinase 1.
TSC2	Tuberous Sclerosis Complex-2.
PLCg	la phospholipase C.
ITK-EGFR	Les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR.
EML4	Echinoderm microtubules associated protein like 4.
ALK	Anaplastic lymphoma kinase.
AMM	Autorisation de Mise sur le Marché.
ERK	Extracellular signal-Regulated Kinase.
MEK	MAPK-ERK-Kinase.
FFPE	fixés à la formaline, enrobés de paraffine.
ADN	Acide DésoxyriboNucléique.
PCR	Polymerase Chain Reaction.
AcSé	Accès Sécurisé à des thérapies ciblées.
INCa	Institut national du cancer.
ALK	Anaplastic Lymphoma Kinase.

Liste des figures

Figure 1 : Les poumons dans le système respiratoire	2
Figure 2 : La réparation des principaux types de cancer dans le monde selon l'atteinte.....	3
Figure 3: Carcinome épidermoïde bien différencié.....	9
Figure 4: Adénocarcinome bien différencié.....	10
Figure 5: Carcinome à petites cellules.....	10
Figure 6: Coupes histologiques montrant la transformation maligne d'un tissu sain	11
Figure 7: Structure du récepteur de l'EGF.....	12
Figure 8: L'EGFR et ses voies de signalisation.....	13
Figure 9: Voie de signalisation de PI3K, AKT, mTOR.....	15
Figure 10: Schéma simplifié de la voie RAS/MAPK.....	15
Figure 11: Schéma général simplifié des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT.....	16
Figure 12: Structure du récepteur de l'EGF et la situation des exons.....	17
Figure 13: Principe de la PCR en temps réel.....	25
Figure 14 : Coupes histologiques d'un adénocarcinome après coloration HE au microscope optique à différents grossissements	30
Figure 15 : Distribution des patients par sexe.....	31
Figure 16 : Répartition des prélèvements selon l'âge.....	32
Figure 17: La répartition des patients selon la tranche d'âge.....	33
Figure 18 : Nombre de patients représentant la mutation EGFR.....	33
Figure 19 : La mutation EGFR en fonction du sexe.....	34
Figure 20: Présence ou non de la mutation EGFR.....	35

Liste des figures

Figure 21: La classification des patients en fonction du type de mutation.....	36
Figure 22 : Nombre de mutation de chaque patient.....	36
Figure 23 : Les différents types de mutations sur les exons.....	37

Liste des tableaux

Tableau I : incidence du cancer bronchique en Afrique du nord.....	3
Tableau II: Principaux types histologiques des carcinomes broncho-pulmonaires.....	6
Tableau III : Les différentes formes d'adénocarcinomes.....	8
Tableau IV: Matériel non biologique.....	22
Tableau V : les volumes indiqués pour une réaction de 30µl.....	27
Tableau VI : la répartition des patients selon la tranche d'âge.....	32
Tableau VII : la classification des types de mutations.....	35
Tableau VIII: les différentes mutations selon les exons.....	37

TABLE DES MATIERES

Introduction.....	1
Chapitre I : Recherche bibliographique.	
I. 1. Rappel anatomique.....	2
I. 2. L 'épidémiologie.....	3
I.3.les causes.....	4
I. 3. 1. Le tabagisme.....	4
I. 3. 2. Le tabagisme passif.....	4
I. 3. 3. Le radon.....	4
I. 3. 4. L'amiante.....	5
I. 3. 5. Facteurs génétiques.....	5
I.4.La classification du cancer du poumon.....	5
I. 4. 1. Classification TNM.....	5
I. 4. 2. La classification en stade.....	6
I. 5. Les types du cancer du poumon.....	6
I. 5. 1. Les carcinomes broncho-pulmonaire non à petite cellule.....	6
I. 5. 1 .1 .Carcinome épidermoïde.....	7
I. 5. 1. 2. Adénocarcinome.....	7
I. 5. 1. 3. Carcinome à grandes cellules.....	8
I. 6. Les carcinomes broncho-pulmonaire a petite cellule.....	8
I. 7. Carcinogènèse tissulaire.....	11
I. 8. La transformation maligne.....	11

TABLE DES MATIERES

I. 9. Cancérogénèse moléculaire.....	12
I. 10. Le récepteur de l'EGF.....	12
I. 10.1. L'activation de l'EGFR.....	13
I. 10. 1. 1. La voie des phosphatidyl-inositol 3-kinases.....	14
I. 10. 1. 2. La voie des MAP-Kinases.....	14
I. 10. 1. 3. Interconnexion avec la voie PI3K/AKT et la voie des MAP-Kinases.....	16
I. 10. 2. L'altération de l'EGFR.....	17
I. 11. Les gènes suppresseurs de tumeurs.....	18
I. 11. 1. L'inactivation du gène P53.....	18
I. 11. 2. Dérégulation de la P63.....	18
I. 11. 3. La translocation de l'Alk.....	18
I. 11. 4. l'amplification de TTF1.....	19
I. 12. Les thérapies ciblées.....	19
I. 12. 1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR.....	19
I. 12. 2. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR.....	20

Chapitre II : Matériel et Méthodes

II. Cadre de l'étude.....	21
II. 1. Population étudiée.....	21
II. 2. Matériel non biologique.....	22
II. 3. Méthodes.....	22

TABLE DES MATIERES

II. 3. 1. La phase pré-analytique.....	22
II. 3. 2. Phase analytique.....	24
II. 3. 2. 1. Coloration histochimique.....	24
II. 3. 2. 2. Le test de PCR en temps réel (EGFR Mutation Test).....	25

Chapitre III : Résultats

III.1.l'étude histologique.....	30
III.2. Etude de la population générale.....	31
III. 2.1. Répartition des patients selon le sexe.....	31
III. 2.2. Répartition des patients selon l'âge.....	31
III. 2.3.Répartition des patients selon la tranche d'âge.....	32
III. 2.4. Répartition des patients selon la présence de la mutation.....	33
III. 2.4. Répartition des patients EGFR+ selon le sexe.....	34
III. 2.5. Répartition des patients EGFR+ par tranche d'âge.....	34
III. 2.6.le type de mutation.....	35
III. 2.7.Répartition des nombre de mutations de chaque patient.....	36
III. 2.8. Répartition des différentes mutations selon les exons et le type de la microlésion.....	37

Chapitre IV : Discussion

IV. Discussion.....	38
V. conclusion.....	41
VI. Référence bibliographique.	
VII. Annexes.	

RESUME

Résumé

Le cancer du poumon est désormais le cancer le plus mortel dans le monde autant chez les hommes que chez les femmes, puisqu'il touche un organe essentiel à notre système respiratoire.

Dans ce travail une détection de la mutation EGFR a été réalisée afin de classer les patients porteurs de la mutation pour bénéficier d'une thérapie ciblée avec une étude de l'aspect anatomo-pathologique et moléculaire du cancer broncho-pulmonaire.

Cette étude a été menée sur une période allant de décembre 2015 à Mai 2016 et sur une série de 30 patients atteints d'un cancer pulmonaire au niveau du laboratoire d'anatomo-pathologie du Centre hospitalo-universitaire, Mustapha Bacha (Alger).

L'âge des patients varie entre 27 ans et 80 ans, avec un âge moyen de 55 ans et une prédominance masculine avec un sexe ratio de 3.28.

L'incidence d'un cancer broncho-pulmonaire chez la femme peut survenir à tout âge, tandis que chez l'homme le pic de fréquence est situé entre 50-70 ans.

30 patients ont bénéficiés d'une recherche de la mutation EGFR par le biais de la PCR en temps réel. Cette dernière a montré que 13 patients sont porteurs de cette mutation soit 43% sont EGFR(+) et 57% des patients sont EGFR(-).

Sur ces 13 cas (46% sont de sexe féminin et 54% sont de sexe masculin)

19 mutations sont retrouvées : - 5 mutations sur l'exon 18 et 5 autres sur l'exon 20 ;
- 4 mutations sur l'exon 19 et 5 sur l'exon 21.

Le ciblage thérapeutique est plus complexe à cause de la variabilité génotypique associé au cancer broncho-pulmonaire.

Mots clés : EGFR, cancer broncho-pulmonaire, mutation, exon, ciblage thérapeutique, variabilité génotypique.

RESUME

Abstract

Abstract

This work consists on a histological appearance and the molecular side of lung cancers, and detecting the EGFR mutation to classify patients to benefit from targeted therapy.

This study was carried out over a period going from 2015 to 2016 on a series of 30 patients with lung cancer in the laboratory of anatomo-pathology of the University Hospital Mustapha Bacha (Algiers). Patient's age varies between 27 and 80 years old, with an average age of 55 years old and a male predominance with a sex ratio of 3.28.

The incidence of lung cancer in women can appear at any age, whereas in men the frequency peak is between 50-70 years.

These 30 patients benefits from a spot of the EGFR mutation via the real time PCR which showed that 13 patients out of 30 patients carriers this mutation, so 43% of patients were EGFR (+) while 57% of patients were EGFR (-).

Of those 13 cases 46% are female and 54% are male who presented 19 mutations, 5 mutations on exon 18 and 5 others on the exon 20, 4 mutations on exon 19 and 5 on exon 21.

Therapeutic targeting is more difficult due to the genotypic variability associated with lung cancer.

Keywords: EGFR, Lung cancer, mutation, therapeutic targeting, the genotypic variability.

ملخص

يشمل هذا العمل دراسة الجوانب التشريحية المرضية؛ والجزئية لسرطان الرئة؛ وكشف طفرة متلقي عامل نمو الأدمة (RFGE)؛ لتصنيف المرضى الحاملين لهذه الطفرة للاستفادة من العلاج المستهدف.

أجريت هذه الدراسة على فترة زمنية من 2015 حتى 2016 وعلى مجموعة متكونة من 30 مريض مصابون بسرطان الرئة؛ على مستوى مختبر علم الأمراض بالمستشفى الجامعي بالجزائر العاصمة "مصطفى باشا".

عمر المصابين بهذا السرطان يتراوح ما بين 27 سنة إلى 80 سنة والذي يبلغ متوسط أعمارهم 55 سنة؛ مع العلم أن غالبية المرضى ذكور ونسبة الجنس 3.28.

إمكانية الإصابة بسرطان الرئة عند الإناث يمكن أن يظهر في أي سن في حين عند الذكور حالات الذروة يكون ما بين 50 إلى 70 سنة.

جميع الحالات استفادوا من كشف جيني لطفرة عامل نمو الأدمة من خلال تقنية البي سي ار في الوقت الحقيقي التي أظهرت أن 13 من المصابين الثلاثون حاملون لهذه الطفرة يعني 43% RFGE(+) و 57% RFGE(-).

الحالات 13 متكونون من 46% (إناث) و 54% (ذكور) واللذين اظهروا 19 طفرة؛ 5 طفرات على القطع الدالة رقم 18 و 20 و 21 و 4 طفرات على القطعة الدالة رقم 19.

العلاج المستهدف يكون أكثر تعقيدا في حالة السرطان الرئوي وذلك بسبب التنوع الوراثي المرتبط بهذا النوع من السرطان.

كلمات البحث: متلقي عامل نمو الأدمة؛ سرطان الرئة؛ طفرة؛ قطع دالة؛ العلاج المستهدف؛ التنوع الوراثي.

INTRODUCTION

Le cancer du poumon, appelé aussi cancer bronchique, est une maladie des cellules des bronches ou, rarement, des cellules qui tapissent les alvéoles pulmonaires.

Il se développe à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme et se multiplie de façon anarchique pour devenir une cellule cancéreuse. **(L'Institut National du Cancer ,2010)**

Chez l'homme, l'incidence du cancer broncho-pulmonaire est stable tandis qu'elle ne cesse d'augmenter chez la femme. **(Ngo1 et Duong-Quy, 2015)**

En Algérie, Quarante personnes meurent du cancer du poumon chaque jour, soit 15 000 décès par an. **(Ahcéne, 2015)**

On distingue deux grands types de cancers bronchiques :

Les cancers bronchiques non à petites cellules et les cancers bronchiques à petites cellules.

Ils représentent respectivement environ 80 % et 20 % des cancers bronchiques. **(L'Institut National du Cancer, 2010)**

Le risque d'avoir un cancer est augmenté dans le cas où des mutations sont acquises ou transmises comme la mutation du récepteurs de l'EGFR **(Roy S.H et al., 2012)**

Cette mutation provoque une activation constitutive de la tyrosine kinase et une activation incontrôlée des cascades de signalisation en aval du récepteur. **(Catherine S chill et al., 2015)**

C'est pour cela que le but de cette étude est de détecter la mutation EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires pour pouvoir cibler les thérapies

L'objectif de notre travail consiste en :

- L'étude de l'aspect anatomopathologique et moléculaire du cancer broncho-pulmonaire.
- Détection de la mutation EGFR.
- Classement les patients porteurs de la mutation EGFR qui doivent bénéficier d'une thérapie ciblée.

Recherche bibliographique

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

I. 1. Rappel anatomique

Notre système respiratoire est composé des voies nasales, de la trachée et de deux poumons.

Son rôle est double : fournir notre organisme en oxygène (O₂) et évacuer le dioxyde de carbone (Co₂).

Les poumons ont la consistance d'une grosse éponge élastique. Ils sont accrochés aux côtes et soutenus par un muscle, le diaphragme. **(Figure 1)**

Le poumon droit contient trois lobes tandis que le poumon gauche n'en contient que deux afin de laisser de la place pour le cœur. Ils sont séparés l'un de l'autre, au centre, par le médiastin et protégés par la cage thoracique en avant, en dehors et en arrière, sauf au niveau de leur sommet, car ils dépassent ventralement le bord supérieur de la première côte, et montent jusqu'au-dessus de la clavicule, à la base du cou, dans le creux supra claviculaire.

Ils sont composés de bronchioles et des alvéoles pulmonaires. **(Annexe I) (Marcotte et Ouimet, 2005)**



Figure 1 : Les poumons dans le système respiratoire **(Marcotte et Ouimet, 2005)**

I. 2. Epidémiologie

➤ Dans le monde

Les cancers figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité dans le monde ; en 2012, on comptait approximativement 14 millions de nouveaux cas et 8,2 millions de décès liés à la maladie.

(Figure 2) (World Cancer Report, 2014)

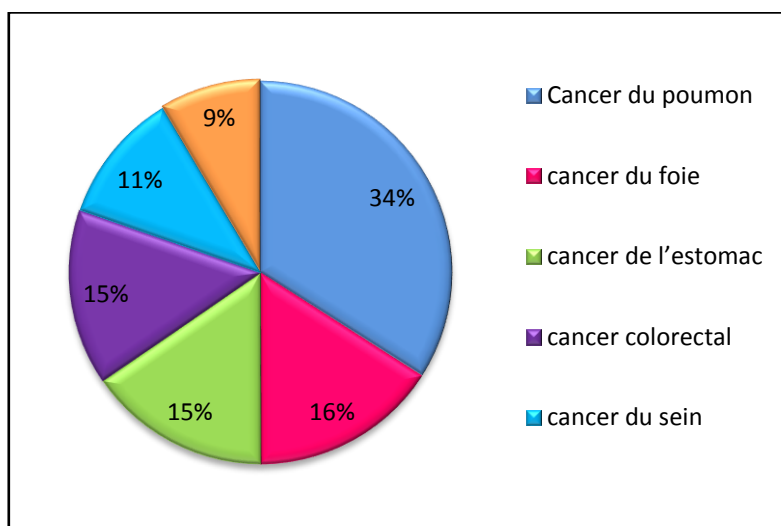


Figure 2: la répartition des principaux types de cancer dans le monde selon l'atteinte (Martel et al, 2008)

➤ Dans le Maghreb

En 2002, l'incidence des cancers du poumon était de 18.7/100000 habitants pour l'Algérie, 29.7/100000 habitants pour la Tunisie et 22.1/100000 habitants au Maroc. (Globocan, 2002)

Tableau I : incidence du cancer bronchique en Afrique du nord

Pays	Homme	Femme
Algérie	17.7	1.6
Maroc	20.1	2.0
Tunisie	27.8	1.9

➤ En Algérie

Le cancer broncho-pulmonaire est la première cause de mortalité.

Le tabac reste le facteur le plus important dans l'apparition du cancer broncho-pulmonaire, en effet Quarante personnes meurent du cancer du poumon chaque jour en Algérie, soit 15 000 décès par an.

En se basant sur une étude rétrospective et descriptive des dossiers des patients âgés de plus de 65 ans hospitalisés dans le service pneumo-physiologie du CHU de Tizi Ouzou durant les années 2012-2013, elle fait ressortir que 56,25% d'entre eux sont fumeurs, 2,25% victimes de tabac passif, et 6,25% non-fumeurs. (**Ahcène, 2015**)

I. 3. Les causes

I. 3. 1. Le tabagisme

Selon la ligue nationale de France contre le cancer, le tabac est le facteur responsable de la très grande majorité des cancers du poumon.

Chez l'Homme, 85% des cancers du poumon sont dues au tabac.

La fumée de tabac contient plus de 60 cancérigènes connus, comprenant les radio-isotopes de la chaîne de désintégration du radon, des nitrosamines, du polonium et du benzopyrène, entre autres. (**Hechet, 2003**)

En outre, il semble que la nicotine diminue la réponse immunologique aux développements malins dans les tissus exposés. (**Sopori, 2002**)

I. 3. 2. Le tabagisme passif

L'exposition passive à la fumée de cigarette augmente le risque de cancer du poumon non à petites cellules, mais de manière nettement moins marquée que par le tabagisme actif. (**Recommandations de l'ESMO, 2014**)

- Gazes toxiques

I. 3. 3. Le radon

Est un gaz radioactif produit par la désintégration naturelle de l'uranium. Ce gaz est omniprésent à des niveaux très faibles dans l'air extérieur et peut s'accumuler à l'intérieur des bâtiments par des fissures dans les planchers, les murs ou les fondations. Cependant, l'exposition au radon domestique dépend beaucoup de la manière dont les maisons sont construites et ventilées. D'autre part, le radon joue un

rôle particulièrement important dans le risque de cancer du poumon chez les mineurs de fond qui sont habituellement exposés à des taux élevés de ce gaz. (**Recommandations de l'ESMO, 2014**)

I. 3. 4. L'amiante

Ce minéral est cancérigène pour les personnes exposées par leur profession. Il a été utilisé dans une grande gamme de produits d'isolation thermique, de protection anti-incendie, d'isolation acoustique, de toiture, de sol et intégré dans d'autres matériaux de construction. L'association du tabagisme actif et de l'exposition à l'amiante multiplie le risque de cancer du poumon non à petites cellules. De nos jours, compte tenu de la forte relation existant entre l'exposition à l'amiante et le mésothéliome, un autre cancer qui se loge dans la plèvre, de nombreux pays (dont ceux de l'Union européenne) ont interdit, totalement ou partiellement, l'usage de ce minéral. (**Recommandations de l'ESMO, 2014**)

I. 3. 5. Facteurs génétiques

Les études épidémiologiques montrant une association entre les antécédents familiaux et un risque accru de cancer du poumon.

Le risque d'avoir un cancer est augmenté dans le cas où des mutations sont transmises comme par exemple les mutations de la lignée germinale du gène rétinoblastome ou autres. (**Roy et al., 2012**)

I. 4. La classification du cancer du poumon

I. 4. 1. Classification TNM

La classification TNM est une classification internationale des différents cancers, permettant d'évaluer leur dangerosité et leur évolution.

Elle a été créée sous l'impulsion de Pierre Denoix, un chirurgien d'origine française.

Trois critères entrent en compte dans cette classification des cancers, chaque critère étant symbolisé par une lettre (**Pierrick, 2014**) :

- ✓ La lettre T correspond à la dimension de la tumeur primaire. (**Annexe II**)
- ✓ La lettre N symbolise une attaque éventuelle des ganglions lymphatiques voisins (**Annexe III**)
- ✓ La lettre M caractérise les éventuelles métastases, des tumeurs secondaires découlant de la tumeur primitive. (**Annexe IV**)

I. 4. 2. La classification en stade

Lorsqu'un cancer est diagnostiqué, il est important d'en définir le stade afin de déterminer l'étendue de la propagation du cancer et s'il est à un stade précoce, localement avancé ou métastatique. (**Annexe V**) (**Lababede, 2011**)

I. 5. Les types du cancer du poumon

La majorité des cancers pulmonaires appartiennent à l'un des deux types suivants (**Ngo1 et Duong, 2015**):

- ✓ les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBNPC) à 80%.
- ✓ Les carcinomes broncho-pulmonaires à petites cellules (CBPC) à 20%.

Auparavant, le traitement était assez homogène au sein des carcinomes non à petites cellules. L'avènement des thérapies dites « ciblées » rend maintenant indispensable le sous-typage des carcinomes ainsi que l'analyse du profil mutationnel des adénocarcinomes, afin de choisir la thérapeutique la plus efficace et avec le meilleur rapport bénéfice/risque. (**CoPath, 2013**)

Tableau II: Principaux types histologiques des carcinomes broncho-pulmonaires

Carcinomes non à petites cellules	Carcinome à petites cellules (≈ 20 %)
Carcinome épidermoïde (≈ 30–40 %)	Carcinome à petites cellules (≈ 20 %)
Adénocarcinome (≈ 40 %), en augmentation	
Carcinome à grandes cellules (≈ 15 %)	

I. 5. Les carcinomes broncho-pulmonaires non à petites cellules

Il s'agit d'un groupe de cancers du poumon dont les cellules n'apparaissent pas « petites » au microscope, contrairement au cancer du poumon à petites cellules.

Les trois principaux types de cancers du poumon non à petites cellules sont les carcinomes épidermoïdes, les adénocarcinomes et les carcinomes du poumon à grandes cellules.

Le diagnostic de ces cancers repose sur les mêmes principes, mais le traitement peut différer selon le type de maladie. (**Les recommandations de l'ESMO, 2014**).

I.5.1. Carcinome épidermoïde

Le carcinome épidermoïde est une tumeur maligne épithéliale montrant des signes histologiques de différenciation malpighienne : kératinisation et/ou ponts intercellulaires. (**Groussar et al., 2001**)

➤ **Histologie**

Tumeur maligne épithéliale avec une différenciation malpighienne, cette différenciation peut être reconnue morphologiquement par la présence de ponts d'union ou de kératine (**figure 3**).

Les carcinomes épidermoïdes ont une association forte avec la consommation de tabac et leur localisation est souvent proximale, péri- ou endo-bronchique. (**CoPath, 2013**)

➤ **Le pronostic**

Pour les carcinomes épidermoïdes, le seul traitement curatif à proposer est la chirurgie quand elle est possible, la survie à 5 ans après chirurgie est de 50% pour les stades I et de 30% pour les stades II. (**groussar et al., 2001**)

I.5.2. Adénocarcinome

Tumeur épithéliale avec différenciation glandulaire. Cette différenciation peut être reconnue morphologiquement par la présence de glandes et/ou d'une muco-sécrétion (**figure 4**).

C'est le type de cancer le plus fréquent chez les non-fumeurs (femmes, origine asiatique), avec une localisation le plus souvent périphérique.

➤ **Histologie**

Selon leur architecture, les adénocarcinomes sont classés en forme acineuse, papillaire, solide et broncho-alvéolaire. (**groussar et al., 2001**)

➤ **Le pronostic**

Les facteurs histopronostiques des adénocarcinomes pulmonaires sont, comme pour toute tumeur, la taille, la présence ou non d'invasion ganglionnaire et pleurale et de métastases. (**groussar et al., 2001**)

➤ **Forme particulière**

Adénocarcinome in situ (ex-carcinome bronchiolo-alvéolaire). Il est de meilleur pronostic, il s'agit d'une prolifération de cellules carcinomateuses le long des alvéoles sans invasion stromale, vasculaire ou pleurale, ni métastases ganglionnaires ou à distance. (**CoPath, 2013**)

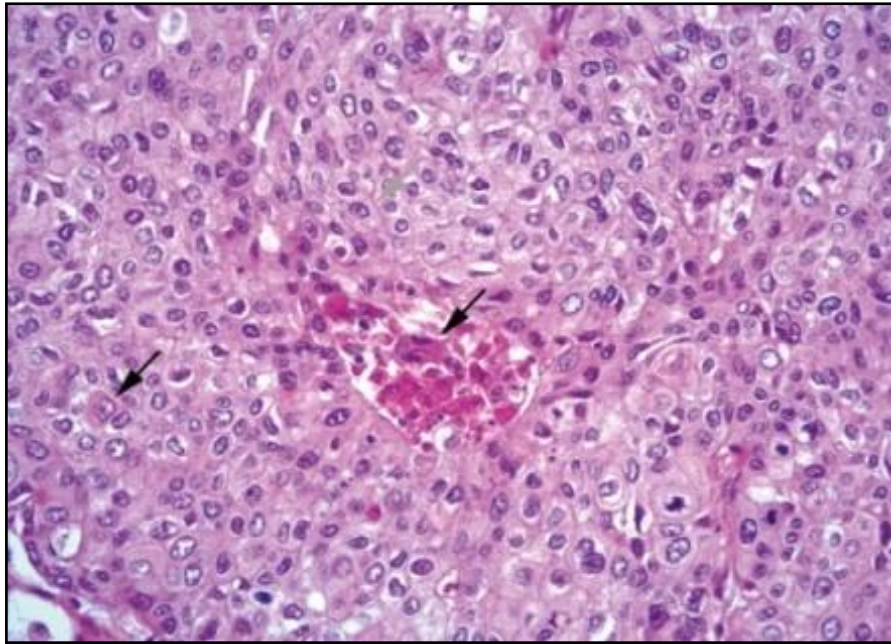


Figure 3: Carcinome épidermoïde bien différencié (CoPath, 2013)

Tableau III : Les différentes formes d'adénocarcinomes. (groussar et *al.*, 2001)

Les adénocarcinomes			
Adénocarcinomes acineux.	Adénocarcinome papillaire	Carcinome bronchioalvéolaire	Adénocarcinome avec production de mucus
<p>-bien, moyennement et peu différencié.</p> <p>-Acini et tubes.</p> <p>-Glandes de forme irrégulière produisant du mucus.</p>	<p>-C'est une prédominance de structures papillaires a ramifications secondaires ou tertiaires ; avec ou son production de mucus.</p>	<p>-bien différencié.</p> <p>-Progression des cellules tumorales le long des cloisons alvéolaires</p>	<p>-peu différencié.</p> <p>-Absence d'acini, de tube ou de papilles.</p> <p>-présence de mucines.</p>

I. 5. 3. Carcinome à grandes cellules

Les carcinomes a grande cellules sont des tumeurs malignes épithéliales faites de cellules au cytoplasme abondant, au noyau volumineux, et dépourvues de toute composante épidermoïde ou glandulaire.

➤ **Histologie**

L'aspect est varié, rappelant parfois des carcinomes épidermoïdes, glandulaire ou neuroendocrines, mais sans en posséder les critères morphologiques formels ; les cellules sont généralement de grande taille, possèdent des noyaux volumineux, vésiculeux, pourvus d'un nucléole proéminent ; les limites cytoplasmiques sont souvent nettes, ces cellules sont groupées en travées ou lobules. (**O.groussar et al., 2001**)

L'apparition de ce type de carcinome est en relation avec le tabagisme avec une localisation périphérique ; c'est des tumeurs très invasives, notamment pour les structures adjacentes. (**CoPath, 2013**)

I. 6. Les carcinomes broncho-pulmonaires à petite cellules

Les cancers bronchiques à petites cellules représentent actuellement 15 à 20 % des tumeurs bronchiques primitives. (**INCa et l'agence d'expertise sanitaire et scientifique en cancérologie, 2015**)

Les carcinomes à petites cellules doivent leurs noms au fait que les cellules qui s'y multiplient sont de petite taille.

Ce sont des tumeurs causées principalement par le tabagisme et à développement important avec une croissance intense et une extension rapide aux autres organes. Les métastases sont fréquentes au moment du diagnostic et le traitement se fait essentiellement par radiothérapie ou chimiothérapie, beaucoup plus rarement par chirurgie. (**Pierrick H, 2014**)

➤ **Histologie**

Ce sont des carcinomes (tumeur maligne épithéliale) neuroendocrines peu différenciées. Les cellules sont petites avec un haut rapport nucléo-cytoplasmique (noyaux volumineux) et des mitoses très nombreuses (**figure 5**).

➤ **Localisation :**

Masse hilare, médiastinale. (**CoPath, 2013**)

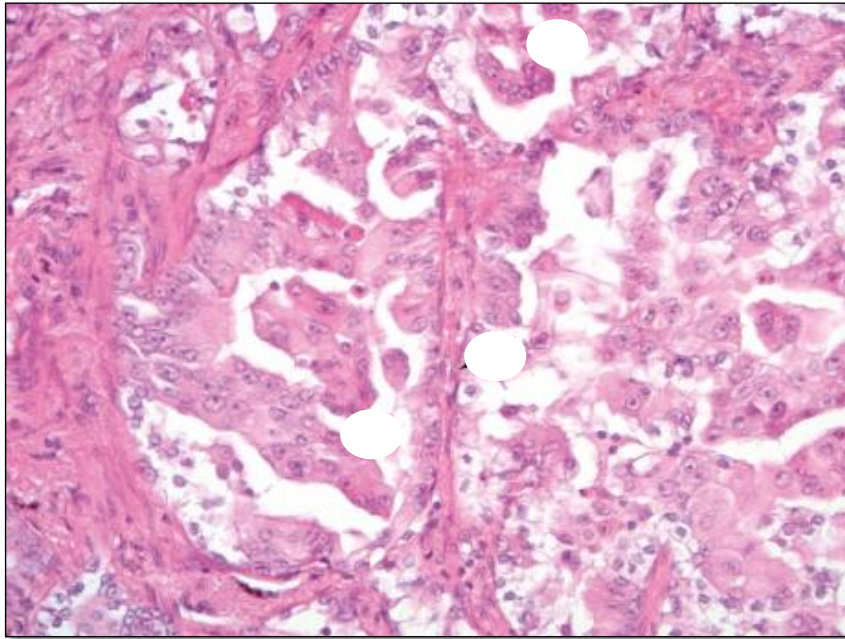


Figure 4: Adénocarcinome bien différencié (CoPath, 2013)

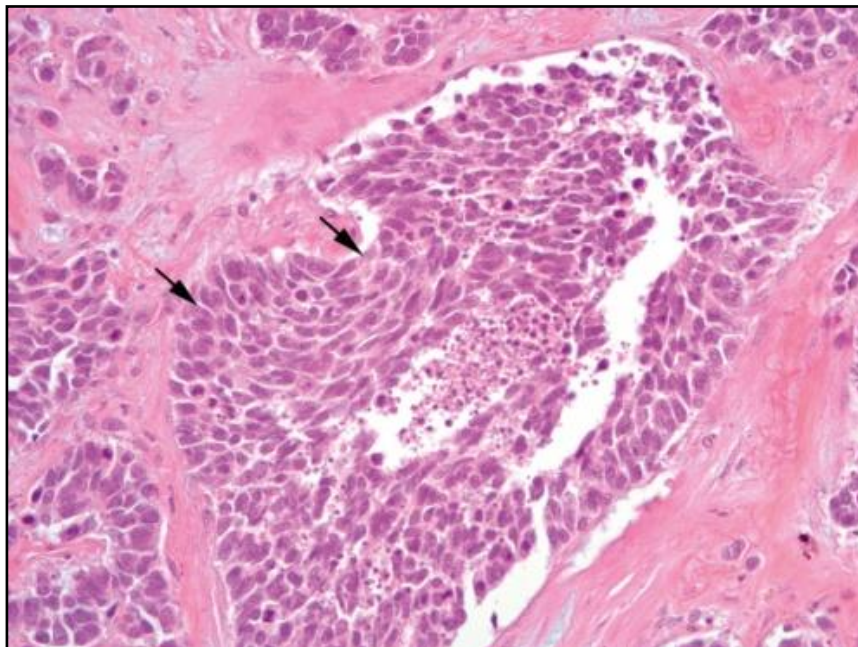


Figure 5: Carcinome à petites cellules (CoPath, 2013)

1.7. Carcinogénèse tissulaire

La carcinogénèse broncho-pulmonaire est un processus multi-étape et multicentrique chez les fumeurs, elle peut affecter au hasard toute région de l'arbre aérien.

La progression des lésions pré-néoplasiques dépend du nombre, de la chronologie et de la vitesse d'accumulation des anomalies génétiques et moléculaires.

Par la détection précoce, dès les stades pré-invasifs, on peut avoir l'opportunité d'améliorer le pronostic sombre de ce cancer. (**Revue des Maladies Respiratoires, 2008**)

1.8. La transformation maligne (Annexe VI)

➤ Accélération de la prolifération :

Elle est due à la dérégulation du cycle cellulaire et à l'échappement des points de contrôles (check point en G1- G2).

➤ L'inhibition de l'apoptose (la mort cellulaire programmée).

➤ Acquisition de propriétés de migration :

Par perte de molécules d'adhésions et la digestion de la matrice extracellulaire.

Cette transformation est représentée dans **la figure 6**.

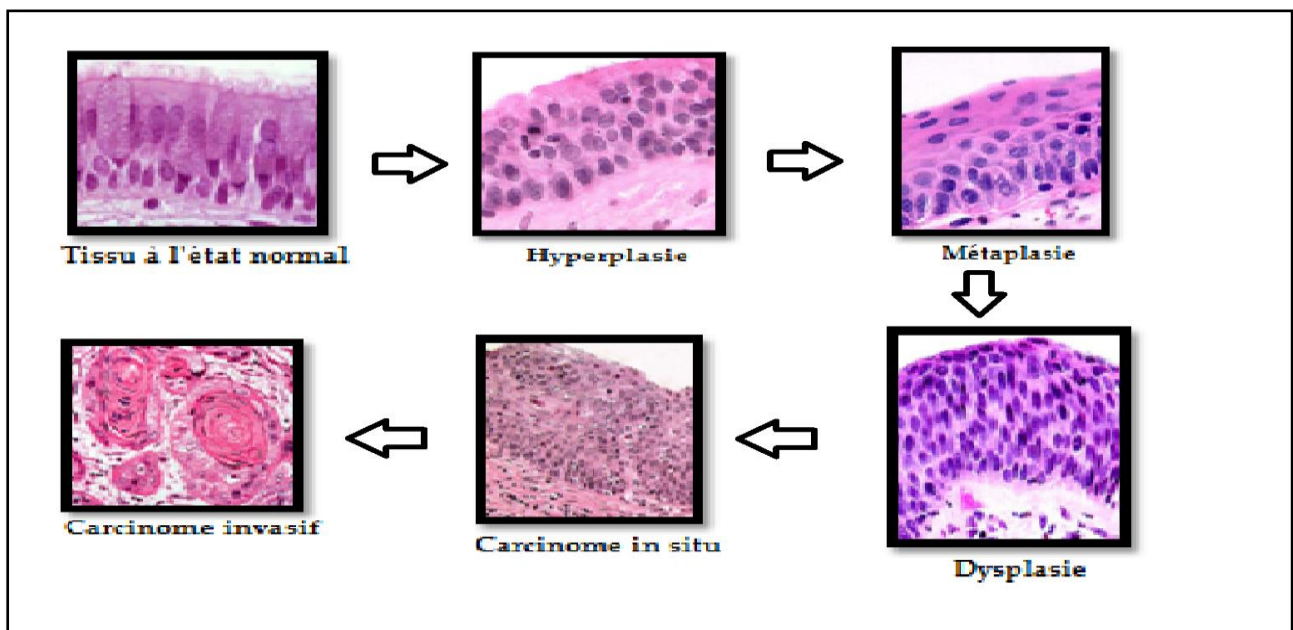


Figure 6: Coupes histologiques montrant la transformation maligne d'un tissu sain. (CoPath, 2013)

I.9 . Cancérogénèse moléculaire

En générale Les RTK (Récepteur à activité tyrosine kinase) possèdent une activité enzymatique tyrosine kinase ce qui leur confèrent une propriété de phosphoryler des résidus tyrosine, pour aboutir à la modulation d'une activité enzymatique mais aussi la création de sites d'ancrage pour des domaines protéiques particuliers engendrant le regroupement de plusieurs partenaires protéiques. (RANDRIAMIHAMINA, 2011)

I. 10. Le récepteur de l'EGF

Le récepteur de l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase, codé par un gène situé sur le chromosome 7p12. Protéine de 170kDa, elle appartient à la famille des récepteurs de l'EGF.

L'EGFR possède 4 domaines fonctionnels (**Figure 7**): un domaine extracellulaire de liaison du ligand ; un domaine transmembranaire ; un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase et un domaine de régulation C-terminal. (Mitsudomi et Yatabe, 2010)

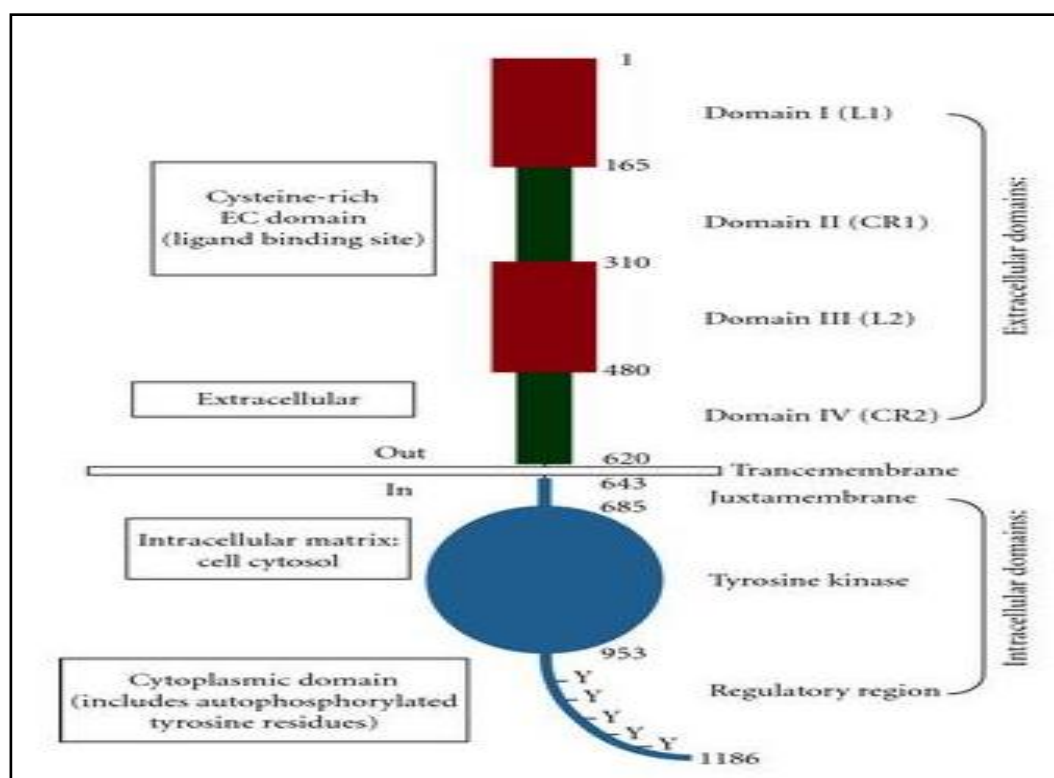


Figure 7: Structure du récepteur de l'EGF (Sharma et Bell, 2007)

I. 10. 1. L'activation de l'EGFR

L'EGFR se trouve généralement sous forme de monomère inactivé en absence de ligand, mais après fixation de ce dernier sur le récepteur, une association de deux monomères se fait soit par des monomères identiques (homodimérisation), soit par des monomères différents (hétérodimérisation).

(Pierre Hubert, 2006)

L'autophosphorylation du domaine tyrosine kinase active de l'EGFR par le ligand ce qui induit différentes voies de signalisation dont la voie des PI3-K et celle des MAP kinases qui contrôlent la prolifération cellulaire, la migration, l'échappement à l'apoptose, l'angiogenèse, processus impliqués dans la carcinogénèse (Figure 8). (Sharma et Bell, 2007)

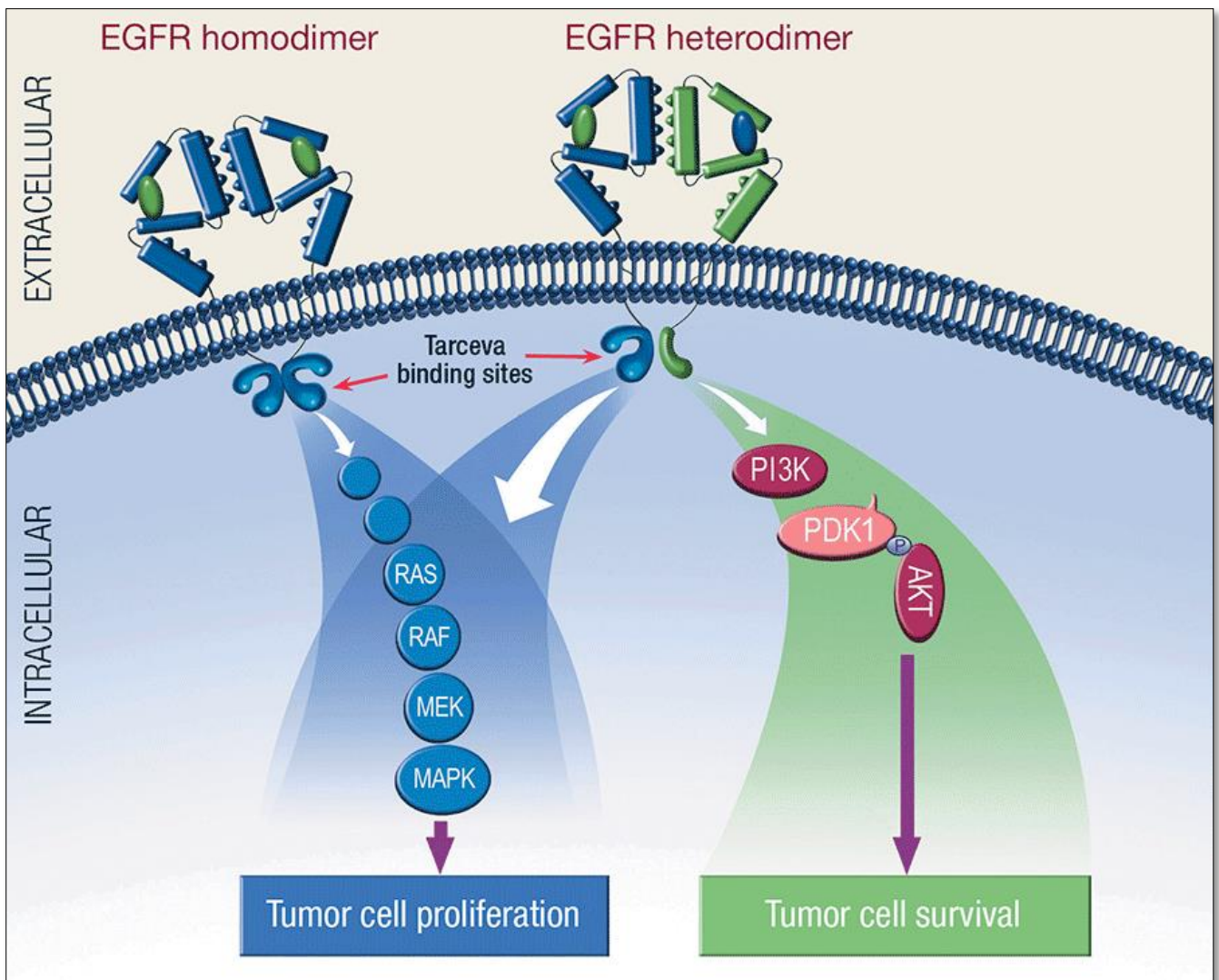


Figure 8: L'EGFR et ses voies de signalisation (Sharma et Bell, 2007)

I. 10. 1. 1. La voie des phosphatidyl-inositol 3-kinases

L'interaction d'un récepteur à activité tyrosine kinase avec un facteur de croissance conduit à une activation de la voie PI3K, cette voie aboutit à de multiples effets sur la transcription des gènes impliqués dans la survie cellulaire, la différenciation et la prolifération. (**Figure 9**)

La PI3K est un hétérodimère à activité kinase constitué de deux protéines : une sous-unité régulatrice p85, et une sous-unité catalytique p110.

Elle peut aussi être activée par l'intermédiaire de la protéine Ras, elle-même activée par mutation ou par un de ces récepteurs.

La PI3K peut être inhibée par PTEN (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10), dont on retrouve une diminution d'expression dans différents types de tumeurs chez l'homme.

La PI3K participe à la formation d'un composé lipidique membranaire, le (PI3, 4,5 ; P3), ce composé recrute la sérine/thréonine kinase AKT à proximité de la membrane plasmique, où elle est phosphorylée donc activée par la PDK1.

AKT est un proto-oncogène, qui a de nombreuses cibles d'aval dont mTOR qui est régulée par au moins 2 mécanismes différents : par phosphorylation directe, ou de manière indirecte par phosphorylation et inactivation de TSC2. (**Chantal et al., 2009**)

I.10. 1. 2. La voie des MAP-Kinases

Dans de nombreux cancer, la voie des MAPK est activée par le biais d'un récepteurs à tyrosine kinase, ou par une mutation somatiques, notamment au niveau des proto-oncogènes codant pour la protéine RAS ou la protéine RAF.

L'activation de la voie des MAPK, également appelée « **ERK** » (Extracellular signal-Regulated Kinase), débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1 ; Cette première protéine kinase est responsable de l'activation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase) par phosphorylation.

À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (c-FOS) et autres (c-MYC, c-JUN ou JUNB) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes (**figure 10**), en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1. (**Lièvre et Puig, 2010**)

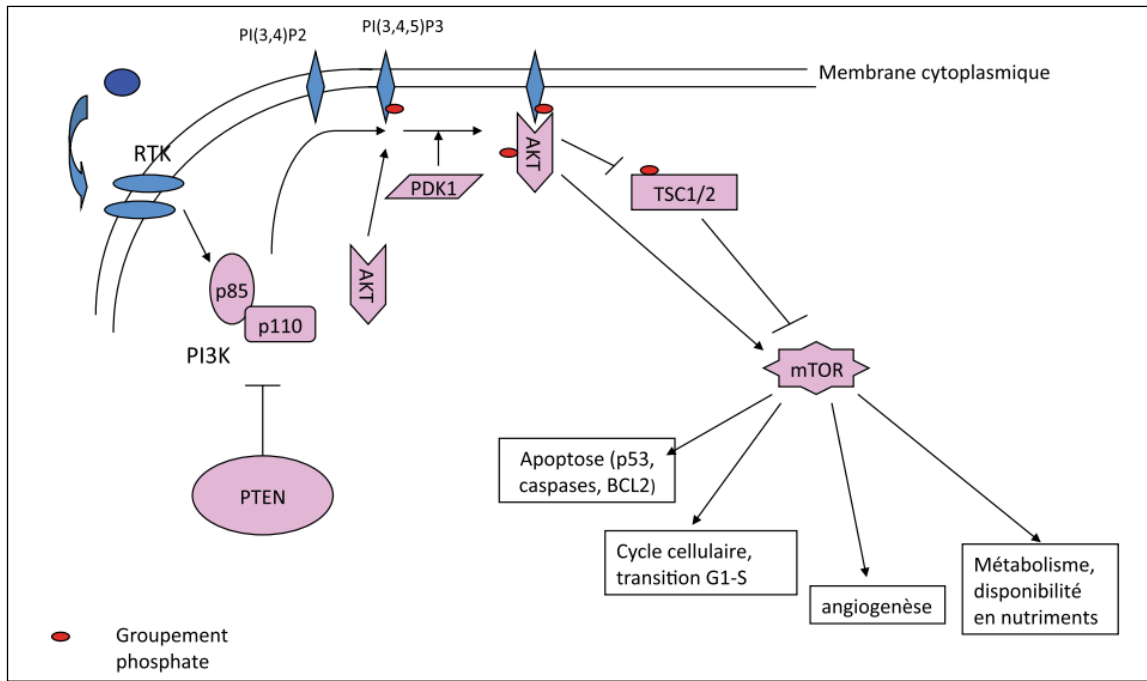


Figure 9: voie de signalisation de PI3K, AKT, mTOR (Dreyer et al., 2009)

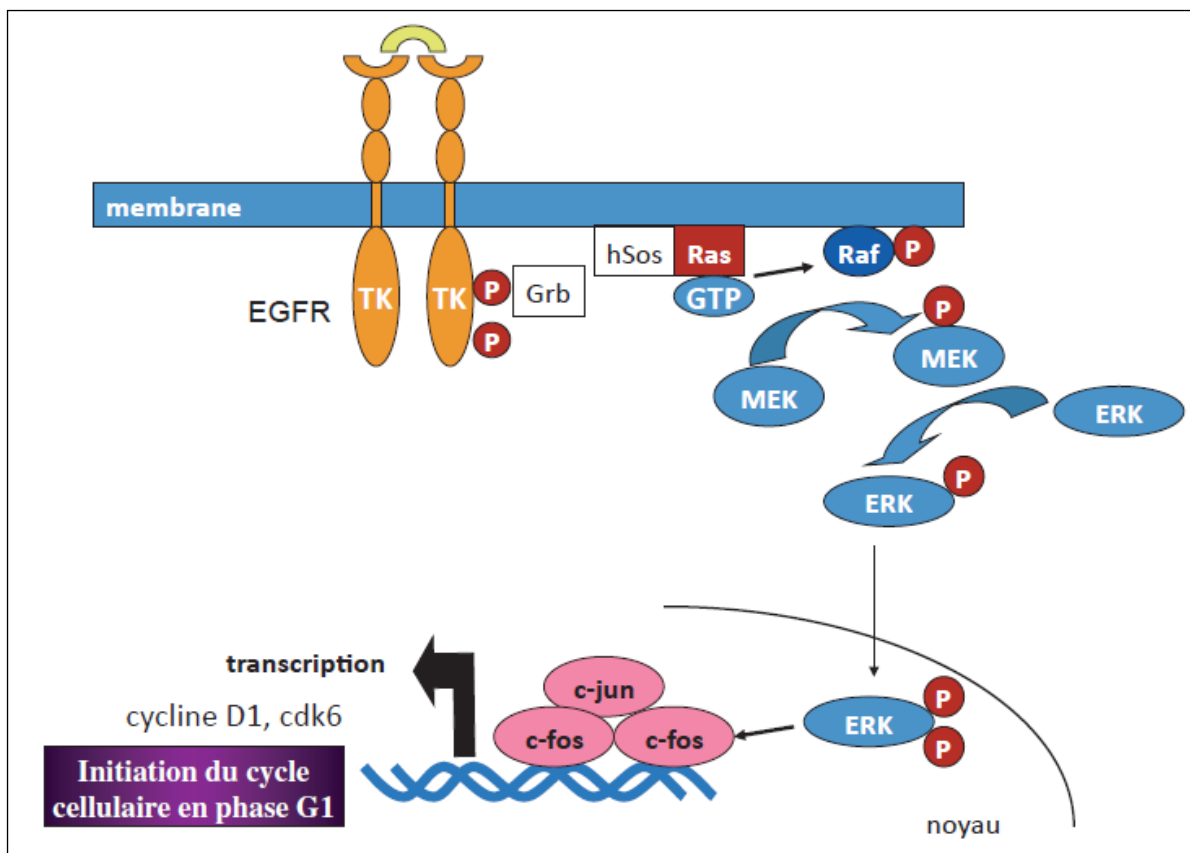


Figure 10: schéma simplifié de la voie RAS/MAPK (Lièvre et Puig, 2010)

I. 10. 1. 3. Interconnexion avec la voie PI3K/AKT et la voie des MAP-Kinases :

La voie des MAPK et la voie des PI3K peuvent être activées par le biais de la protéine RAS, donc il existe un lien entre ces deux voies ce qui laisse croire que ces connexions sont probablement plus complexes encore et font aussi intervenir d'autres voies de signalisation intracellulaire comme la voie de PLC γ , la voie STAT/JACK et la voie Src/FAK. (Lièvre et Puig, 2010)

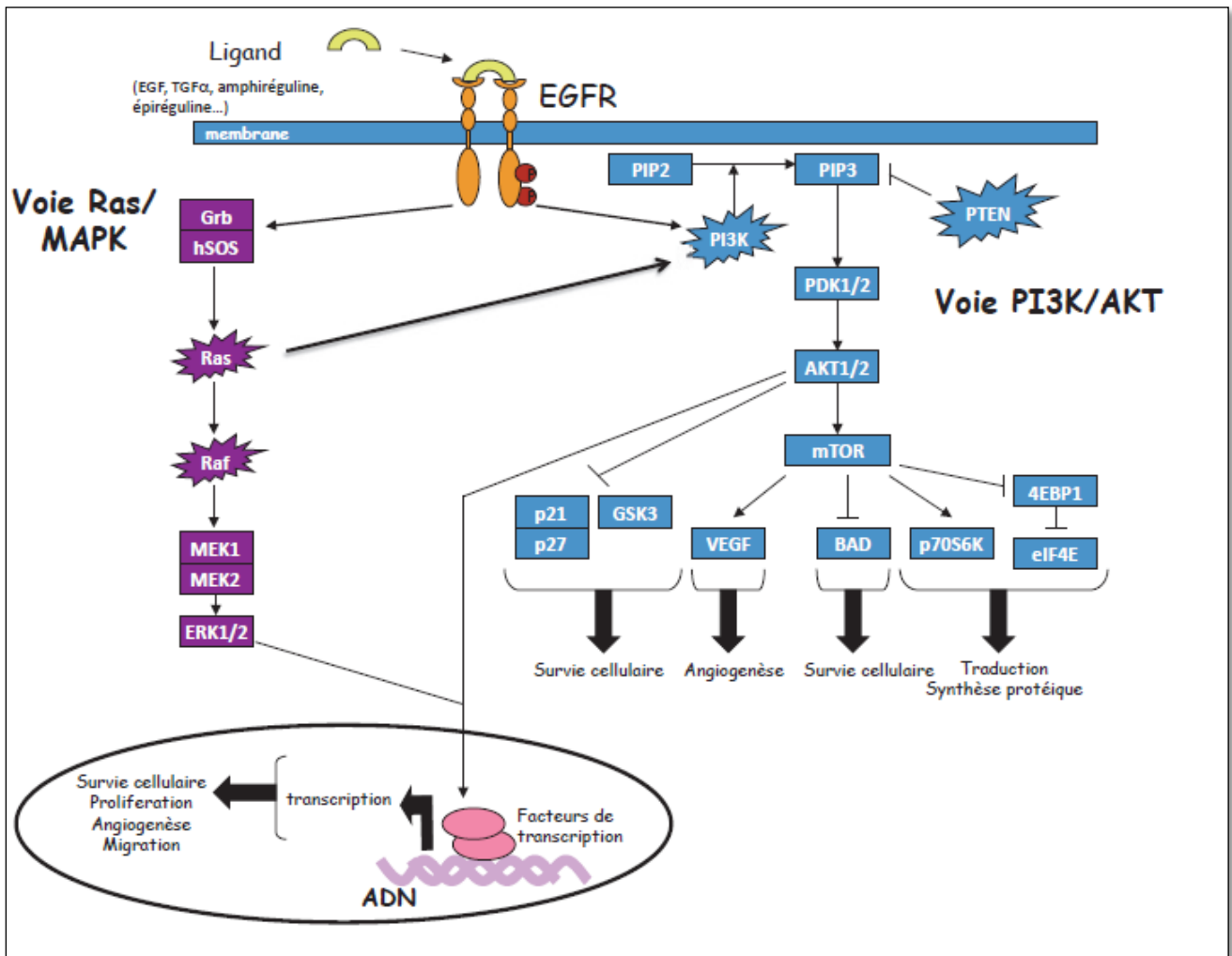


Figure 11: Schéma général simplifié des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT (Lièvre et Puig, 2010)

I. 10. 2. L'altération de l'EGFR

- D'un proto-oncogène en oncogène

D'après Rosell R et Moran T, les mutations oncogéniques activatrices de l'EGFR sont détectées avec une fréquence de 16,6% sur une cohorte de 2105 patients caucasiens (350 patients mutés EGFR).

Ces mutations sont retrouvées sur les exons 18 à 21 qui codent pour le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, au niveau du site de fixation de l'ATP qui est aussi le site de fixation des inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR (ITK-EGFR) (**figure 12**) ce qui confère une sensibilité aux ITK-EGFR. (**Sharma et Bell, 2007**)

Ces mutations de l'EGFR sont à l'origine de changements conformationnels et fonctionnels de l'EGFR entraînant une altération de la régulation on/off du récepteur en faveur d'une hyper-activation. (**Ngo et Duong-Quy, 2015**)

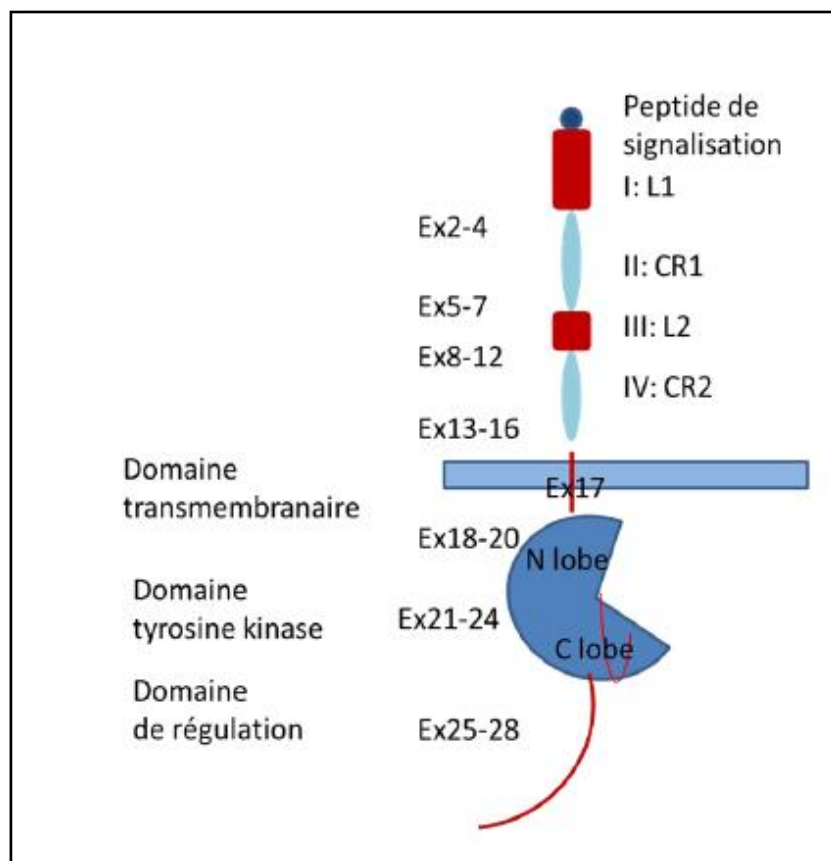


Figure 12: Structure du récepteur de l'EGF et la situation des exons (**Sharma et Bell, 2007**)

I. 11. Les gènes suppresseurs de tumeurs

Dans la majorité des tumeurs pulmonaires les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés, certains qui sont communs pour les CBNPC et les CBPC et d'autres non.

I. 11. 1. L'inactivation du gène P53

La P53 est un facteur de transcription et un médiateur essentiel de la réponse des cellules aux expositions à des agents cancérogènes, elle est aussi capable d'entraîner l'arrêt du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN ou l'apoptose en fonction du type cellulaire, du degré de différenciation, de la nature et de l'intensité du stress.

En effet la P53 joue un rôle primordial dans la régulation de la stabilité du génome et aussi dans la stabilité tissulaire de l'épithélium broncho-pulmonaire.

La mutation de ce dernier a été détectée dans 50% des cas de CBNPC et dans 70% des cas de CBPC. (Calvez *et al.*, 2005)

I. 11. 2. Dérégulation de la P63

Malgré la forte ressemblance entre la P53 et la P63 au niveau structural et biochimique, la P63 n'est pas un gène suppresseur de tumeur typique, il est néanmoins impliqué comme un cofacteur, dans la carcinogénèse bronchique.

C'est un facteur décisif dans la différenciation épidermoïde et son expression est indispensable à la formation de l'épithélium pluristratifié.

Cette protéine est surexprimée dans tous les carcinomes épidermoïdes, et elle constitue un bon marqueur histologique du compartiment épidermoïde des tumeurs présentant une histologie mixte.

(Yokota *et al.*, 2005)

I. 11. 3. La translocation de l'Alk

La protéine ALK est un récepteur tyrosine kinase de la superfamille des récepteurs de l'insuline et dont le ligand est encore inconnu, elle est codée par un gène situé sur le chromosome 2p23.

Des altérations du gène ALK ont été mises en évidence dans différents cancers :

- Lymphome anaplasique à grandes cellules.
- Tumeur myofibroblastique et inflammatoire.
- Le neuroblastome.

RECHERCHE BIBLIOGRAPHIQUE

En 2007, on a démontré le rôle du réarrangement EML4 (Echinoderm microtubules associated protein like 4)-ALK (Anaplastic lymphoma kinase) dans le cancer broncho-pulmonaire, observé avec une fréquence de 6,7% dans les CBNPC.

La protéine de fusion EML4-ALK résulte d'une inversion du bras court du chromosome 2 aboutissant à la formation du gène de fusion EML4-ALK, mais d'autres translocations d'ALK sont possibles avec d'autres partenaires de fusion (TFG, KIF5B, KLC1).

Les remaniements d'ALK aboutissent à une activation constitutive de la kinase ALK et des voies de signalisation en aval contrôlant la prolifération et la survie. (**Soda et al., 2007**)

I. 11. 4. l'amplification de TTF1

C'est un facteur de transcription thyroïdien aussi appelé NKX2-1, dans le cas des adénocarcinomes pulmonaires on effectue une amplification de la région 14q13.3.

Ce gène code pour un facteur de transcription essentiel pour la formation de cellules pulmonaires, In vitro, une croissance cellulaire accrue a été remarquée lorsqu'on a transfectés des cellules épithéliales normale d'un poumon humain avec au moins deux des trois gènes TTF1, NKX2-8, et PAX-9 dans la région 14a13.3, ce qui suggéré que ces trois gènes peuvent travailler en synergie dans la pathogénèse du cancer du poumon (**Roy et al., 2012**)

I. 12. Les thérapies ciblées

Pour soutenir le développement d'une médecine personnalisée et faciliter l'accès des thérapies ciblées aux patients qui peuvent en bénéficier, l'Institut national du cancer (**INCa**) a mis en place des plateformes de génétique moléculaire en France, lancé plusieurs programmes prospectifs portant sur des bio marqueurs émergents pouvant être la cible de nouvelles thérapies actuellement en cours de développement.

La mise en place du programme pour un accès sécurisé à des thérapies ciblées innovantes (**AcSé**), lancé en 2013, vise à proposer à des patients en échec thérapeutique de nouvelles thérapies ciblant des altérations génétiques présentes dans leur tumeur, avec ou sans autorisation de mise sur le marché (AMM). (**Ngo et Duong-Quy, 2015**)

I. 12. 1. Les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR

A ce jour, les deux ITK-EGFR ayant l'AMM européenne sont le gefitinib et l'erlotinib. (**Annexe VII**) L'essai de phase III IPASS a montré que le taux de réponse au gefitinib est de 71,2% chez les patients EGFR(+) contre seulement 1,1% pour les patients EGFR(-). (**Mok et Wu, 2009**)

Pour les patients EGFR+, la survie sans progression est significativement plus longue pour les patients traités par gefitinib que pour ceux traités par chimiothérapie.

Des résultats comparables ont été observés chez des patients traités par erlotinib. (**Rosell et Carcereny, 2012**)

I. 12. 2. Mécanismes de résistance aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR

Une résistance aux ITK-EGFR est conférée grâce à certaines mutations.

Elles sont le plus souvent acquises au cours du traitement par ITK-EGFR, la mutation secondaire de résistance aux ITK située au niveau de l'exon 20 de l'EGFR, entraînant un remplacement d'une thréonine par une méthionine au niveau du codon 790 et conduisant à un changement de conformation du récepteur, empêchant la fixation des ITK-EGFR de 1ère génération. (**Oxnard et Arcila, 2011**)

Ce clone tumoral résistant apparaît sous ITK-EGFR chez environ 50% des patients porteurs d'un CBNPC EGFR+.

Plusieurs ITK-EGFR de seconde génération comme l'afatinib permettraient in vitro de passer outre cette résistance. (**Sharma et Bell, 2007**)

Matériel et méthodes

II. Cadre de l'étude

Cette étude est réalisée dans le cadre de la préparation d'un projet de fin d'études portant sur le statut EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires.

Elle a été menée au service d'anatomo-pathologie, du CHU Mustapha Bacha, sur une période de **6 mois**, allant du **15 Décembre 2015 au 15 Mai 2016**.

Cette étude a pour but de détecter la mutation EGFR dans les adénocarcinomes pulmonaires afin de bien cibler les thérapies.

II. 1. Population étudiée

Cette étude a fait l'objet d'analyse d'une série de patients Algériens atteints d'un cancer broncho-pulmonaire venus de différentes régions du pays, et qui a pour but de procéder à une réévaluation à partir de blocs de paraffine des prélèvements biopsiques ,exérèse...etc.

304 patients atteints de différents types de cancers broncho-pulmonaires consécutifs ont été colligés dans les archives du laboratoire d'anatomo-pathologie du CHU Mustapha Bacha (**Annexe VIII**), sur une période allant de 2011 à 2016.

30 cas d'adénocarcinome ont donc été sélectionnés en fonction des formes anatomo-clinique et de la quantité du tissu nécessaire pour les techniques ultérieures (**Annexe IX**).

Ces 30 cas ont bénéficié d'une étude histologique et d'une recherche de la mutation EGFR (après demande du médecin traitant et après Réunion de Concertation Pluridisciplinaire), sur leurs prélèvements par la technique de PCR en temps réel.

Les données cliniques (l'âge, le sexe) des patients ont été recueillies à partir des fiches de renseignements clinique.

II. 2. Matériel non biologique

Les prélèvements sont inclus en paraffine après fixation dans le formol (FFPE). (**Annexe VIII**)

II. 3. Méthodes

Dans ce travail de recherche l'étude pratique a été faite comme suite :

- Une phase pré-analytique du prélèvement à l'étalement.
- Phase analytique :
 - Etude histologique (HE)
 - Etude moléculaire (PCR en temps réel).
- Phase post-analytique :

Traitement des résultats et classements des malades EGFR+ qui vont bénéficier d'une thérapie ciblée.

II. 3. 1. La phase pré-analytique

Etapas indispensables qui conditionnent la fiabilité de toutes les techniques ultérieures

- ✓ Prélèvement
- ✓ Fixation cruciale (dilution, quantité, durée ...)
- ✓ Etude macroscopique
- ✓ Déshydratation
- ✓ Inclusion/ imprégnation

II. 3. 1. 1. Prélèvement

- ✓ Biopsie
- ✓ Pièces opératoires
- ✓ Exérèse

II. 3. 1. 2. La fixation

Stabilisation des tissus le fixateur provoque la formation d'un réseau intermoléculaire stabilisé par des liaisons covalentes

Maintien des caractéristiques physico-chimiques et d'organisation par blocage des groupements chimiques particuliers qui pourraient faire l'objet d'une coloration histochimique

Le formol (formaldéhyde=méthanal en solution aqueuse): ponts méthyléniques inter et intra-protéines, blocage de la cytolysé tue les éventuelles bactéries qui pourraient dégrader le tissu. Bon

pouvoir de pénétration. Manipulation précautionneuse (risques pour l'utilisateur: irritation des muqueuses, carcinogène...).

Durée de fixation :

- ✓ 1mm d'épaisseur de tissu / heure
- ✓ Minimum 6h pour biopsie (6 à 12 h)
- ✓ 24 à 48h pour les pièces opératoires
- ✓ Eviter les sur-fixations au-delà de 72h

II. 3. 1. 3. Macroscopie (Annexe XI)

- ✓ Les échantillons font l'objet d'une description macroscopique minutieuse, réalisation de coupes bien orientées.
- ✓ Les tissus doivent être découpés proprement sans les écraser pour maintenir l'architecture tissulaire.

II. 3. 1. 4. La déshydratation (Annexe XII)

- ✓ Étape préalable à l'inclusion.
- ✓ permet de chasser l'eau des tissus et de préparer ainsi le remplacement par des produits hydrophobes.
- ✓ se fait par passages successifs dans des bains d'alcool à concentration croissante (10 heures)
- ✓ la clarification consiste en l'immersion dans un bain de toluène, solvant de l'alcool absolu et de la paraffine (3 heures).

II. 3. 1. 5. Imprégnation / inclusion ou enrobage (Annexe XIII)

Cette étape permet d'obtenir des pièces rigides autorisant une coupe fine 3 à 5 μm pour la microscopie optique.

La paraffine va remplacer l'eau des tissus imprégner donc le tissu ex: paraffine la paraffine liquide à 56 °C imprègne les tissus.

L'étape finale après l'inclusion consiste en l'enrobage du tissu par la paraffine grâce à la console thermo-réfrigérante et nous permet de réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de paraffine.

II. 3. 1. 6. Coupe

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome (**Annexe XIV**), les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont étalées sur des lames.

II. 3. 1. 7. Etalement du tissu sur les lames (Annexe XV)

Les coupes réalisées sont étalées et fixées sur des lames de verre.

II. 3. 2. Phase analytique

II. 3. 2. 1. Coloration histochimique à l'HE

1. Déparaffinage et réhydratation : Il faut éliminer la paraffine (hydrophobe) pour rendre les tissus perméables aux colorants (solutions aqueuses ou alcooliques)
2. Technique: des bains successifs de xylène puis d'alcools de degré décroissant jusqu'à l'eau courante.
3. Après dissolution de la paraffine, puis réhydratation, le tissu est coloré. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hématoxyline, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrocyline).
4. Le montage : Recouvrement de la préparation par une lamelle protectrice en utilisant une «colle» le baume ou résine de montage pour une conservation longue on utilise le baume du Canada ou l'Eukitt.

II. 3. 2. 1. 1. Protocole de la coloration HE

- ✓ Passage dans l'hématoxyline pendant minimum 3 min et maximum 15 min tout dépend la concentration.
- ✓ Rinçage dans l'eau. (30 secondes)
- ✓ Passage dans le premier différenciateur (l'acide hydro-chlorhydrique).
- ✓ Rinçage a l'eau courante.
- ✓ Passage dans le deuxième différenciateur (l'ammoniac).
- ✓ Rinçage a l'eau courante.
- ✓ Passage dans l'éosine pendant 30 sec minimum et 3 min maximum tout dépend la concentration.
- ✓ Passage à l'eau.
- ✓ Séchage et montage.

II. 3. 2. 2. Le test de PCR en temps réel (EGFR Mutation Test)

II. 3. 2. 2. 1. Utilisation

le kit d'analyse des mutations d'EGFR est prévu pour la détection des mutations somatique dans les exons 18,19,20 et 21 d'EGFR dans l'ADN génomique isolé de tissus humains ou de lignées cellulaires.(voir Annexe XV)

II. 3. 2. 2. 2. Principe du test

Le test de mutation EGFR se base sur deux grands procédés :

MATERIEL ET METHODES

1. préparation manuelle des échantillons pour obtenir de l'ADN génomique à partir de tissu FFPE (fixés à la formaline, enrobés de paraffine)
2. amplification par PCR de l'ADN cible à l'aide d'une paire d'amorces complémentaires et de deux sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores différents.

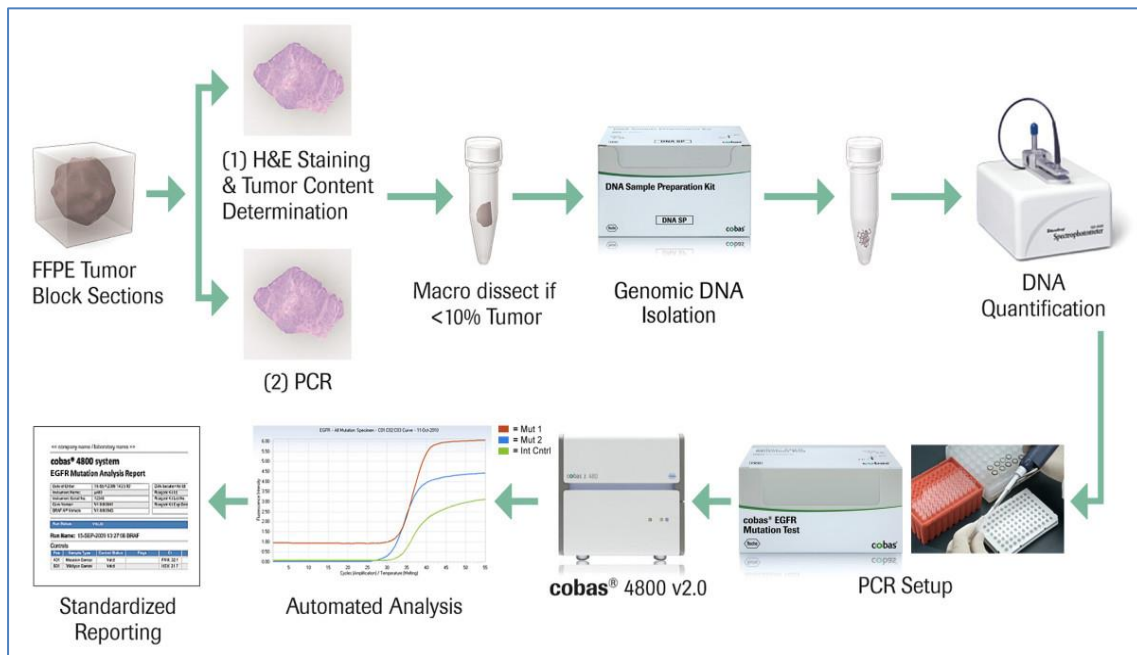


Figure 13 : Principe de la PCR en temps réel (NADJI S ,2014)

II. 3. 2. 2. 3.équipements requis

Les équipements requis pour réaliser ce test sont :

- ✓ Un instrument de PCR en temps réel.
- ✓ Des gants sans poudre.
- ✓ Des pipettes réglables.
- ✓ Des pointes à filtres stériles pour pipette.
- ✓ Un vortex.
- ✓ Une centrifugeuse de paillasse pour micro-tubes à centrifuger de 0.2ml et 2.0ml.
- ✓ Des plaques PCR 96 puits.
- ✓ Des films optiques adhésifs pour les plaques PCR.
- ✓ Des films optiques adhésifs.
- ✓ Des micro-tubes à centrifuger de 0.2ml et 2.0ml.

II. 3. 2. 2. 4. Instructions d'utilisation

a. Extraction de l'ADN

C'est une extraction de l'ADN génomique du FFPE (fixés au formol et enrobé en paraffine) des échantillons de tissus.

Ce processus d'extraction est constitué d'étape de lyse, de liaison, de lavage et dilution.

a. 1. Matériel nécessaire

- ✓ SAMAG-12/24 Système automatique Nucleic Acids Extraction.
- ✓ Des gants.
- ✓ Micropipettes.
- ✓ Cabinet biologique.
- ✓ Thermo-mixer.
- ✓ Xylène ou autre agent d'élimination de paraffine.

a. 2. Protocole

- ✓ Transférer des morceaux de tissu enrobé en paraffine dans un tube de 1.5ml.
- ✓ Traiter les échantillons FFPE avec du xylène ou d'autres agents d'élimination de paraffine.
- ✓ Ajouter 400 µl de BL2, veiller à ce que les échantillons sont complètement immergés dans le tampon BL2.
- ✓ Ajouter 20ml de protéine K au mélange d'échantillon, et vortex le mélange pendant 5 à 10 secs.
- ✓ Incuber l'échantillon à 55°C pendant 2 heures, on mélangeant vigoureusement dans un bain d'eau agité ou thermo-mixer.
- ✓ Centrifuger brièvement le tube pour récupérer les gouttelettes à l'intérieur du couvercle.
- ✓ Homogénéiser l'échantillon, par aspiration et à plusieurs reprises puis transférer l'échantillon vers les colonnes a filtré placées dans les tubes de la collecte.
- ✓ Centrifuger a 6000xg pendant 1minute.
- ✓ Transférer 400µl d'échantillon filtré au tube d'échantillon.

b. Préparation des réactifs

MATERIEL ET METHODES

- ✓ Décongeler l'ensemble des mélanges d'amorces/sondes (primer/prob Mix), mélange de contrôles positifs et la solution 2X Reaction Master Mix.
- ✓ Centrifuger les tubes environ 10 secondes à 10000 rpm à température ambiante.

Les réactions PCR sont indiquées pour un total de 30 μ l/échantillon ; les mélanges réactionnels pour des échantillons multiples (également pour des échantillons contrôles) doivent être pré-mélangés dans une solution mère avec un surplus de 5 à 10% afin de couvrir les erreurs de pipetage éventuels.

Tableau V : volumes indiqués pour une réaction de 30 μ l.

Réactifs	Conc. finale	Vol. Par échantillon
2X Reaction Master Mix	1X	126 μ l
Positive Control Mix, Eau, ou ADN a 10ng/μl	10ng	8.4 μ l
Eau sans nucléase		58.8 μ l

Pour préparer les réactifs on procède comme suit :

1. Préparer une solution mère pour chaque échantillon avec 5% d'excédent.
2. Vortexer puis centrifuger 10 secondes à 8500 rpm à température ambiante.
3. Distribuer 23 μ l de la solution mère dans chaque puits d'une seule colonne (A-H).
4. Ajouter 7 μ l de chaque mélange amorce/sonde dans les puits correspondant.
5. Mélanger par plusieurs cycles d'aspiration et refoulement à l'aide de la pipette.
6. Couvrir la plaque avec le film optique adhésif.
7. Centrifuger brièvement la plaque afin de faire tomber les gouttelettes éventuellement présentes sur les parois des puits.

II. 3. 2. 2. 5. Analyse des données

✓ Interprétation des résultats

1. Contrôler les courbes d'amplification des contrôles endogènes (END CTRL) pour chaque échantillon en sélectionnant les 8 puits réactionnels, puis placer le seuil au niveau de la phase exponentielle de croissance.

Le C_T doit être similaire pour les 8 réactions d'un même échantillon ; cependant cette valeur dépend de la quantité d'ADN amplifiable présente dans la réaction et peut différer entre les échantillons FFPE individuels du fait de la fragmentation d'ADN ; la gamme normale des valeurs C_T END CTRL se situe entre 22 et 32 pour les échantillons FFPE.

- a. Si tous les puits ont un signal END CTRL, procéder à l'analyse.
- b. Si tous les puits pour un échantillon donné n'ont pas de signal END CTRL, la réaction a échoué et il n'est pas nécessaire de poursuivre l'analyse de cet échantillon.
- c. Il est possible qu'un seul puits d'un échantillon donné ne donne pas de signal END CTRL, Cela arrive occasionnellement pour les échantillons portant des taux élevés de variant mutés et cela s'explique, par la compétition entre les réactifs d'amplification (dans ce cas-là on poursuit l'analyse).

2. sélectionner les puits des contrôles positifs et contrôler chaque signal du détecteur FAM. Le seuil doit être placé manuellement et ajusté au niveau de la phase exponentielle de croissance pour chaque courbe.

MATERIEL ET METHODES

3. Sélectionner tous les 8 puits réactionnels de chaque échantillon inconnu et contrôler chaque signal du détecteur FAM. En absence du signal, l'échantillon ne contient pas la mutation correspondante au détecteur sélectionné. Etant donné que les échantillons FFPE peuvent contenir différents taux de cellules tumorales, les valeurs de CT pour les réactions peuvent grandement varier. Les échantillons mutés portant de fortes teneurs en ADN tumoral vont avoir des valeurs de CT plus faibles, alors que les échantillons mutés portant de plus faibles quantités d'ADN tumoral vont avoir des valeurs de CT plus faibles, alors que les échantillons mutés portant de plus faibles quantités d'ADN tumoral vont avoir des valeurs CT plus fortes.

Les valeurs de C_T normales positives sont comprises entre 20 et 37.

- ✓ Si un échantillon a une valeur de CT inférieure à 20, dilué l'échantillon et répété la réaction.
- ✓ Si les valeurs de CT est supérieures à 38, répéter la réaction avec plus d'ADN.

Résultats

RESULTATS

L'analyse des résultats obtenus au cours de notre travail permet de donner un aperçu sur l'aspect histologique et le facteur génétique entrant dans l'apparition d'un cancer broncho-pulmonaire (adénocarcinome) chez des patients âgés de 27 à 78 ans.

III.1. L'étude histologique

L'étude histologique a pour but de visualiser in situ, les cellules, leurs organites ou la matrice extracellulaire (MEC) qui permet donc de décrire la morphologie cellulaire et tissulaire en termes d'architecture. (Martin C *et al.*, 2008)

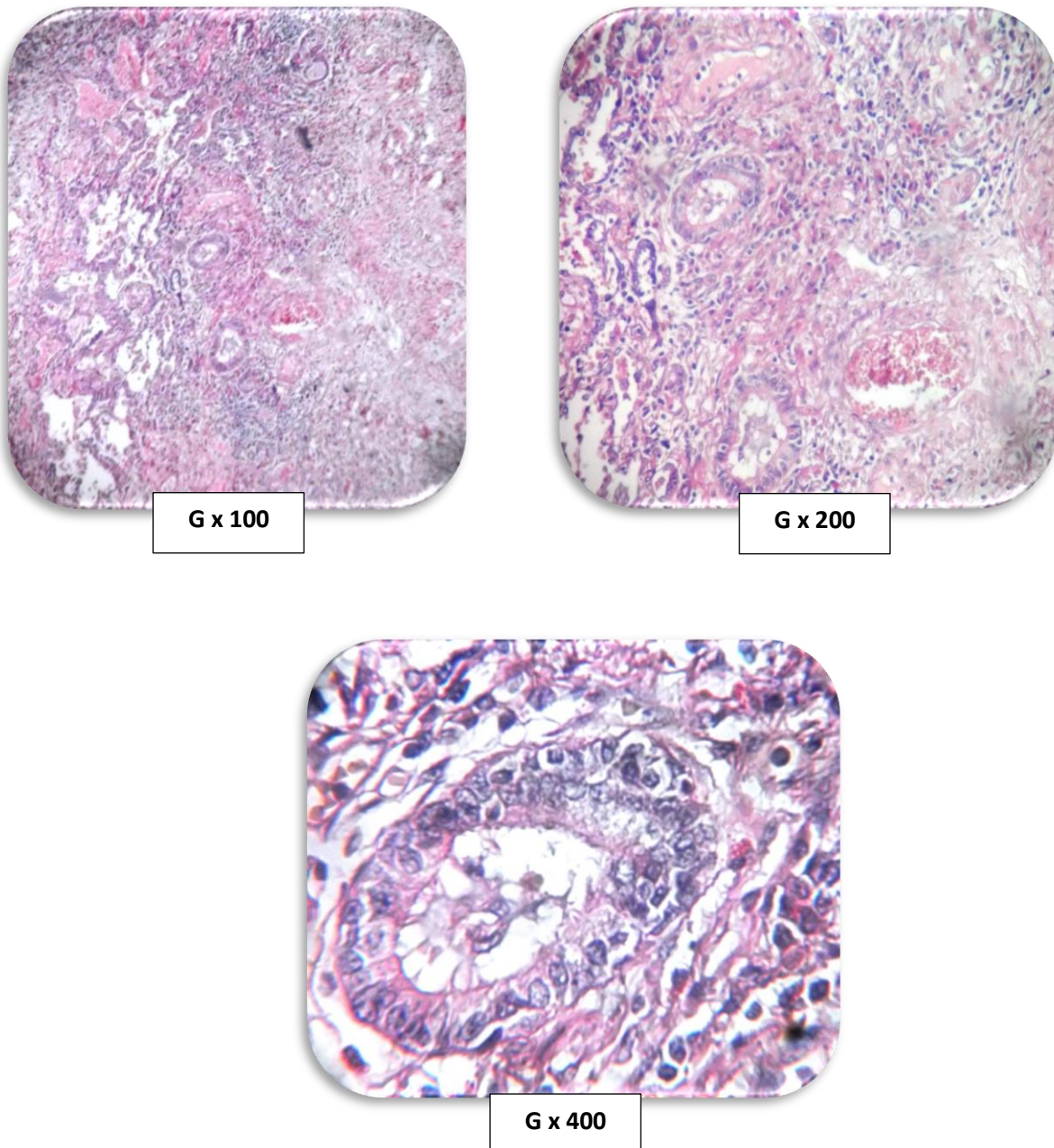


Figure 14: Coupes histologiques d'un adénocarcinome après coloration HE au microscope optique à différents grossissements

III.2. Etude de la population générale

III. 2.1. Répartition des patients selon le sexe

La série étudiée comporte 30 patients dont 23% sont de sexe féminin (7 femmes) et 77% sont de sexe masculin (23 hommes) avec un sexe ratio de 3.28 M/F.

La classification des patients en fonction du sexe est donnée dans **la figure 15**.

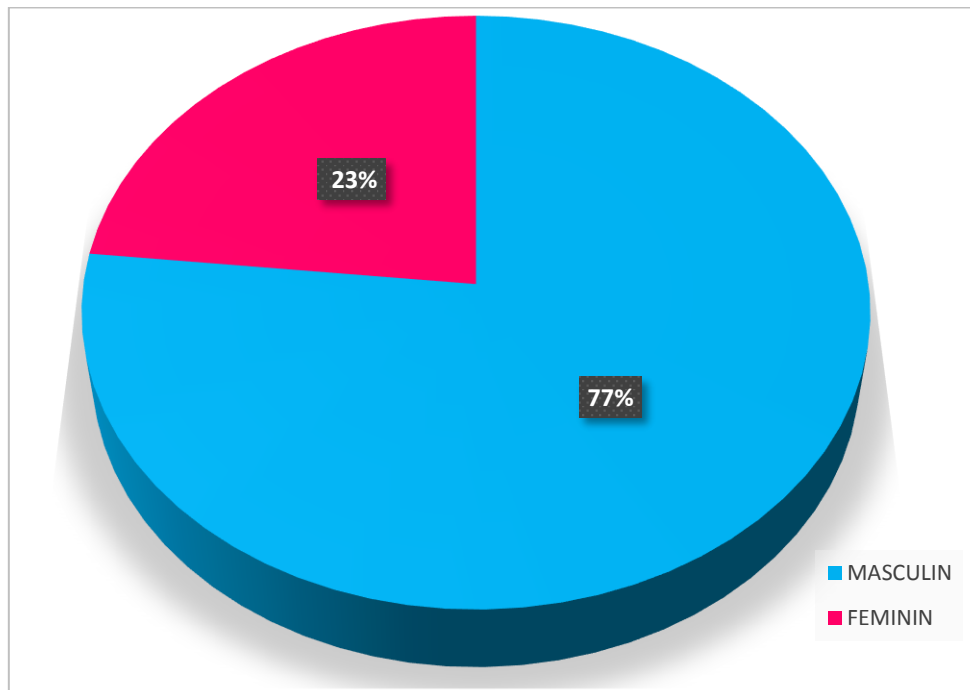


Figure 15 : Distribution des patients par sexe

III. 2.2. Répartition des patients selon l'âge

L'âge des patients de notre série varie entre 27 et 80 ans, avec un âge moyen de 55,63 ans.

L'âge a été mentionné chez les 30 patients et est rapporté dans **la figure 16**.

RESULTATS

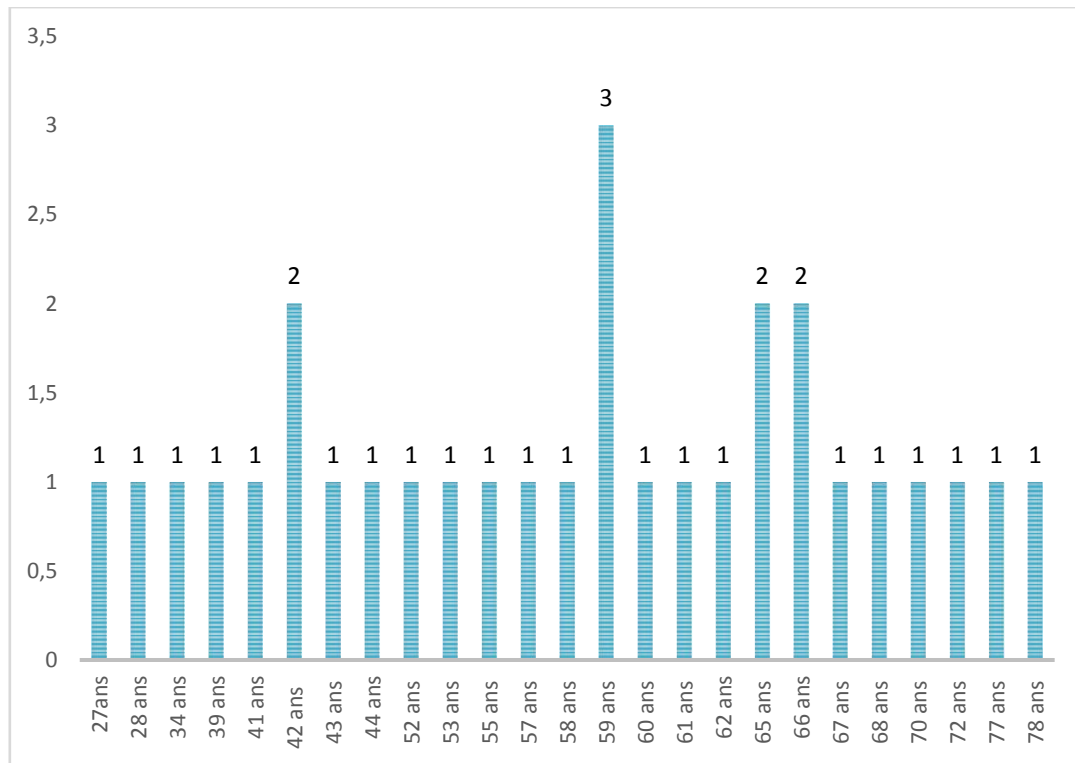


Figure 16 : Répartition des patients selon l'âge

III. 2.3. Répartition des patients selon la tranche d'âge

Dans notre série la tranche d'âge qui contient l'effectif le plus élevé est de 50 à 70 ans. La classification des patients est montrée dans le tableau VI et la figure 17.

Tableau VI : Répartition des patients selon la tranche d'âge.

Age	Effectif	Pourcentage (%)
] 27-40]	4	13
] 40-50]	5	16,5
] 50-60]	8	26,5
] 60-70]	10	33
] 70-80]	3	10
total	30	100

RESULTATS

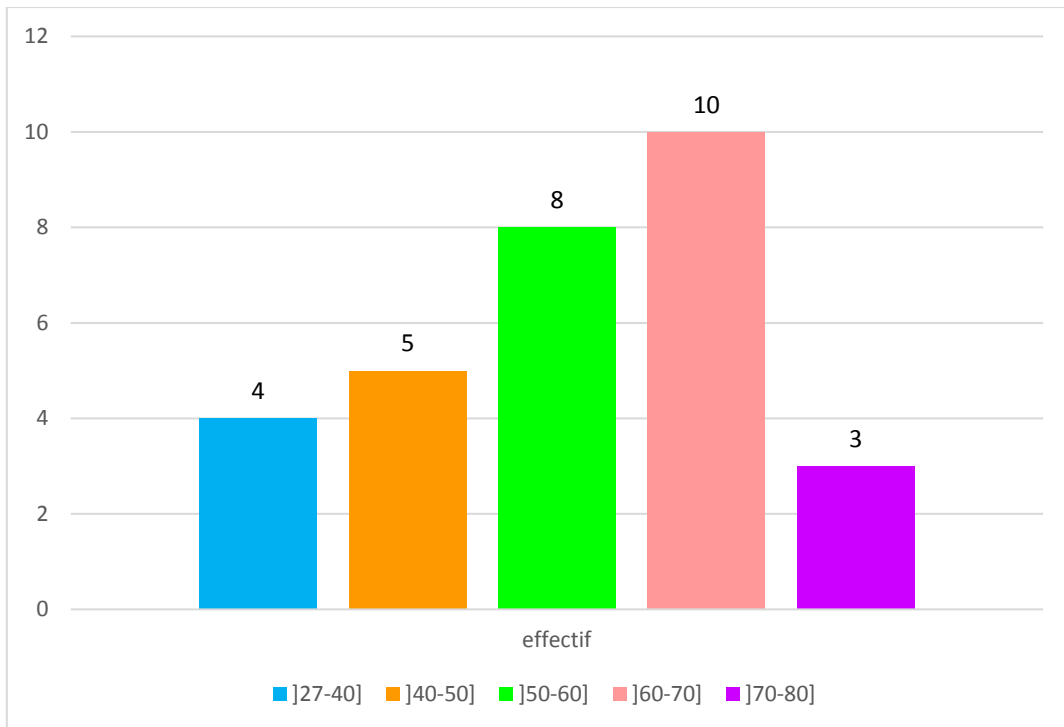


Figure 17: la répartition des patients selon la tranche d'âge.

III. 2.4. Répartition des patients selon la présence de la mutation

57% des patients atteints d'un cancer broncho-pulmonaire (adénocarcinome) ne présentent pas une mutation EGFR tandis que 43% des patients la présentent. (figure18)

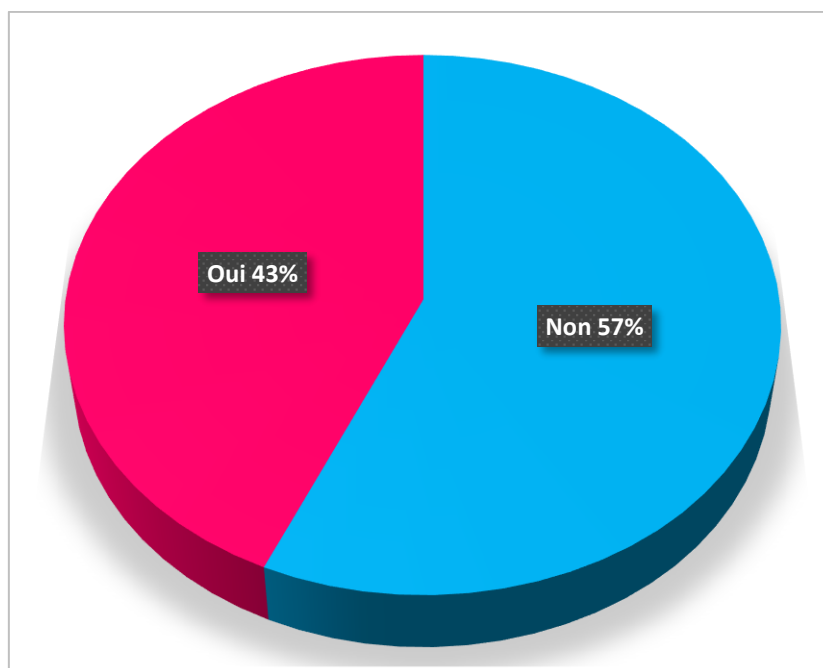


Figure 18: Nombre de patients présentant la mutation EGFR

RESULTATS

III. 2.4. Répartition des patients EGFR+ selon le sexe

54% de ces patients sont de sexe masculin et 46% de sexe féminin.

La classification des patients portant de la mutation EGFR en fonction du sexe est donnée dans la figure suivante.

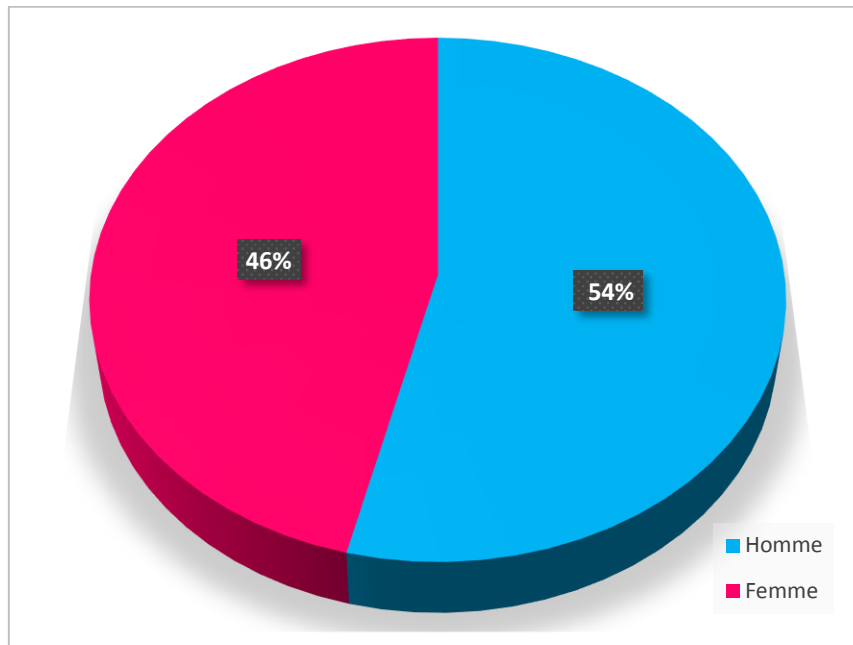


Figure 19: la mutation EGFR en fonction du sexe

III. 2.5. Répartition des patients EGFR+ par tranche d'âge

La présence de la mutation EGFR est nettement présente dans les tranches d'âge de [27-40] et de [50-60] avec 4 cas dans la première tranche et 3 cas dans la deuxième tranche.

La répartition des patients portant la mutation EGFR par tranche d'âge dans la figure suivante.

RESULTATS

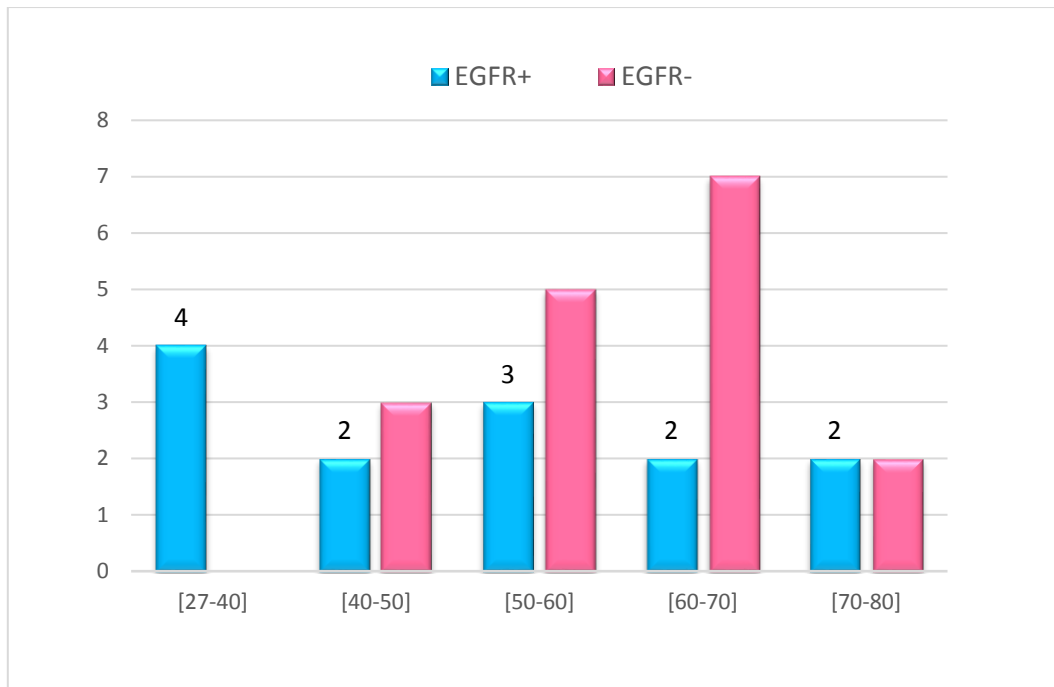


Figure 20: Présence ou non de la mutation EGFR.

III. 2.6. Le type de mutation

L'analyse des résultats obtenus au cours de notre travail permet de donner un aperçu sur le facteur génétique (EGFR) entrant dans l'apparition d'un cancer broncho-pulmonaire (adénocarcinome), en sachant que 13 cas ont présenté 19 mutations.

La classification des types de mutations est donnée dans **le tableau VI** et **la figure 21**.

Tableau VII : la classification des types de mutations.

mutation	effectif	Pourcentage %
exon18	5	26.5
exon19	4	20.5
exon20	5	26.5
exon21	5	26.5
Total	19	

RESULTATS

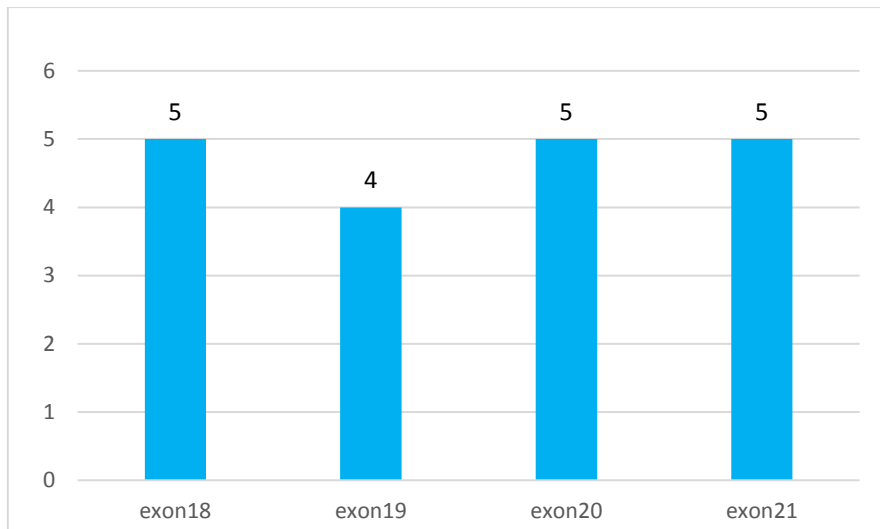


Figure 21: la classification des patients en fonction du type de mutation.

III. 2.7. Répartition des nombre de mutations de chaque patient

Sur les 13 patients 2 cas ont présenté plusieurs mutations en même temps alors que dans les autres cas une seule mutation a été détectée.

5 mutations ont été détectées chez le patients numéro 6 et 3 mutations ont été détectées aussi chez le patients numéro 11. (**Figure 22**)

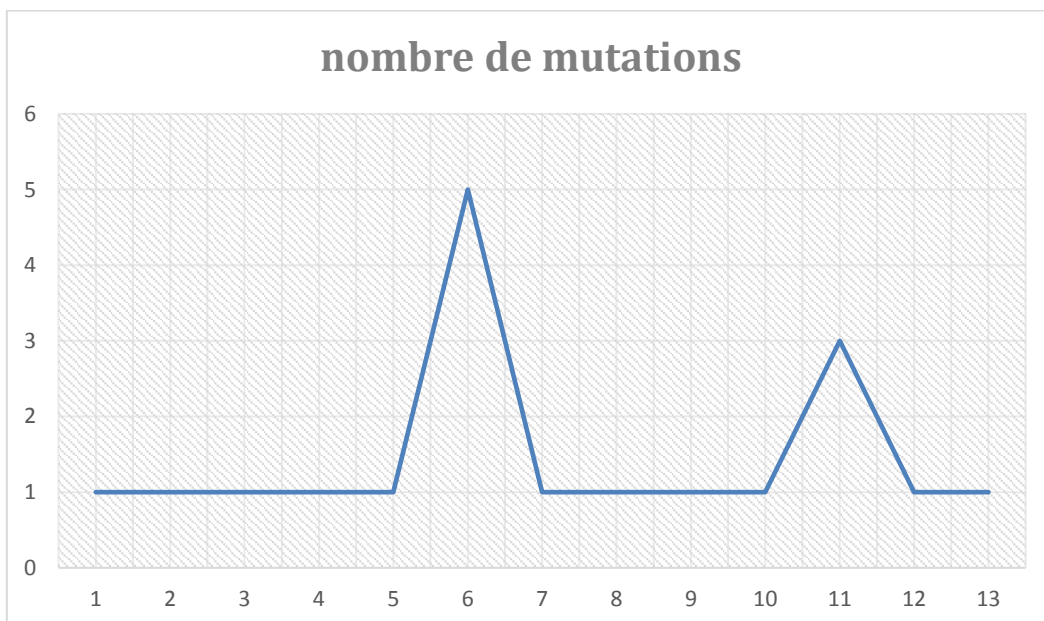


Figure 22: nombre de mutation de chaque patient.

RESULTATS

III. 2.8. Répartition des différentes mutations selon les exons et le type de la microlésion

L'EGFR possède 4 domaines fonctionnels : un domaine extracellulaire de liaison du ligand ; un domaine transmembranaire ; un domaine intracellulaire à activité tyrosine kinase et un domaine de régulation C-terminal. (Ngo1 et Duong-Quy, 2015)

Le domaine à activité tyrosine kinase comporte les 4 exons 18, 19, 20, et 21.

La répartition des différentes mutations selon les exons est présentée dans le tableau et la figure suivantes.

Tableau VIII : Différentes mutations selon les exons

Exon	Délétion	Insertion	Inversion
Exon 18	0	0	5
Exon 19	4	0	1
Exon 20	0	4	1
Exon 21	0	0	4

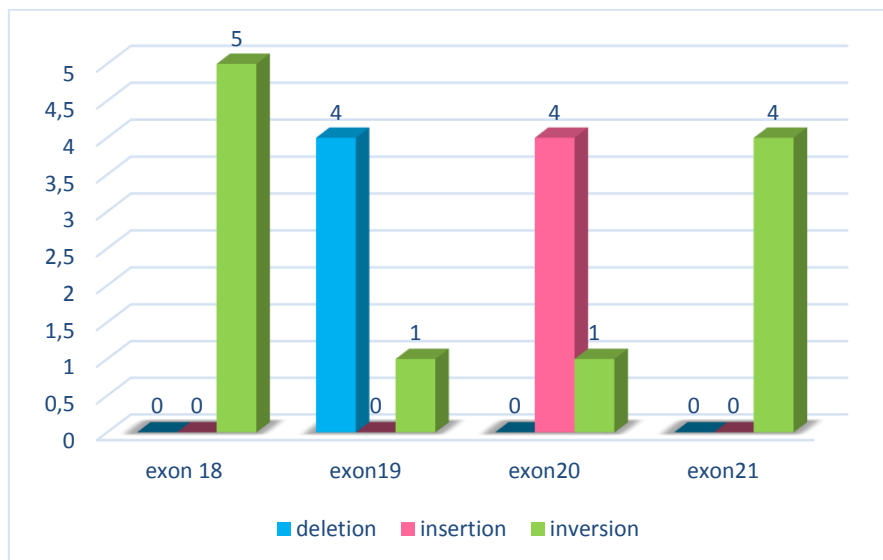


Figure 23: Différents types de mutations sur les exons

Discussion

DISCUSSION

Cette étude consiste en une réévaluation de 30 cas d'adénocarcinomes pulmonaires colligés dans le service d'anatomie pathologique du CHU Mustapha sur une période allant de 2015 à 2016.

Le cancer bronchique est devenu dans le monde la première cause de mortalité par cancer, à la fois dans les pays développés et dans les pays en voie de développement.

Son incidence mondiale en 2008 était estimée de 1.61 millions de cas et 1.38 million de décès, soit 18.2% du totale de décès par cancer. **(Ferlay et al., 2008)**

En France, le cancer bronchique est responsable de 26 624 en 2005 pour 30 651 nouveaux cas **(Belot et al., 2008)** avec un pourcentage de 78% de cas de sexe masculin ce qui confirme que le cancer pulmonaire est la première cause de décès chez l'homme, cependant en 1975 le cancer bronchique chez la femme était au sixième rang concernant la mortalité, au quatrième rang en 1985, troisième en 1995, et deuxième en 2005. **(Grosclaude et al., 2008)**

Le diagnostic du cancer du poumon reste très important pour déterminer l'extension tumorale et déterminer l'état pulmonaire afin de bien orienter le traitement.

En 1981 une version révisée de typage histologique des tumeurs du poumon qui classe selon l'OMS ces tumeurs par le type histologique ; Cette classification repose sur une analyse morphologique et propose une nomenclature standardisée qui est la base du diagnostic et du traitement ; la première version a été publiée en 1967.

Cependant la classification anatomopathologique des cancers broncho-pulmonaires doit être périodiquement mise à jour en raison de l'évolution des connaissances, liée particulièrement à l'apport moléculaire et immuno-histochimique dans certains cas.

La plupart des tumeurs broncho-pulmonaires sont des carcinomes constitués de cellules tumorales qui dérivent des cellules épithéliales bronchiques, ces dernières tapissent les parois des bronchioles protégeant l'organisme de l'environnement extérieur grâce à leurs cils vibratiles et à la sécrétion de mucus.

Les cellules épithéliales sont en contact direct avec des agents pathogènes de l'extérieur en raison de leur situation, comme les agents cancérogènes du tabac. **(Gaud, 2009)**

Notre étude moléculaire montre une nette prédominance masculine avec un sexe ratio de 3.28 avec (76.66% masculin et 23.44% féminin).

Cette prédominance masculine a également été retrouvée par une équipe Tlemcenienne (91 %) par **E.Djeddi et al., 2013** et Marocaine (90%) par **M.oukabli et al., 2011**.

La répartition des patients selon l'âge montre que l'incidence d'un cancer broncho-pulmonaire chez la femme peut survenir à tout âge, tandis que chez l'homme le pic de fréquence est situé entre 50-70

DISCUSSION

ans. Ces résultats concordent avec ceux de l'étude de Djeddi qui dit que l'incidence d'un cancer bronchique est située entre 60-70 ans.

En France L'âge moyen est estimé à 65 ans chez l'homme et à 64 ans chez la femme avec une survie à 5 ans de l'ordre de 15 %. Environ 70 à 80 % des cancers sont diagnostiqués à des stades avancés.

(Inca, 2013)

Les mutations oncogéniques activatrices de l'EGFR dans notre série sont détectées avec une fréquence de 43% sur une série de 30 patients (13 cas positives), d'après Rosell R et Moran T 350 patients sur une cohorte de 2105 patients caucasiens présentent la même mutation avec 16.6%. Parmi ces patients présentant la mutation EGFR 46% des patients sont de sexe féminin et 54% sont de sexe masculin, ces résultats confirme le fait que l'incidence du cancer broncho-pulmonaire est stable chez l'homme tandis qu'elle ne cesse d'augmenter chez la femme **(Ngo et Duong-Quy, 2015)** ; en Avril 2004 deux groupes de chercheurs de Boston et un groupe de chercheurs de New York ont démontré que la mutation EGFR est présente chez les femmes d'origine Asiatique plus que chez les hommes. **(Tetsuya et Yasushi, 2010)**

Plusieurs mutations qui codent pour le domaine tyrosine kinase du récepteur de l'EGF ont été révélé mais seulement 4 mutations de ce dernier sont les plus répandues et les plus connues :

- ✓ les mutations des exons 18, 19, 20 et 21. **(Gregory et al, 2006)**

En effet, les mutations de l'EGFR sont retrouvées sur les exons 18 à 21 qui codent pour le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, au niveau du site de fixation de l'ATP **(Sharma et Bell, 2007)**

Dans notre série et par le biais de la PCR en temps réel 13 patients ont présentés 19 mutations, 5 mutations sur l'exon 18 et 5 autres sur l'exon 20, 4 mutations sur l'exon 19 et 5 sur l'exon 21.

La mutation de l'exon 19 est détectée 4 fois avec un pourcentage de 21.07% alors que la mutation de l'exon 21 est détectée 5 fois avec un pourcentage de 26.31%.

Une étude new yorkaise a démontré la présence de ces deux mutations sur 70 patients atteints d'un cancer pulmonaire sur un échantillon de 291 patients. Sur ces 70 patients 39% soit 27/70 présentent une mutation sur l'exon 21 et 61% soit 43/70 présentent une mutation sur l'exon 19. **(Gregory et al., 2006)**

La mutation de l'exon 20 est détectée 5 fois avec un pourcentage de 26.31% dans notre série.

Une étude américaine effectuée entre 2004 et 2012 sur 1086 patients. Ces derniers ont bénéficié d'une recherche de la mutation EGFR, mais seulement 2.5% de cette série ont présenté une mutation sur l'exon 20. La survie de ces patients était de 16 mois. **(Oxnard et al., 2013)**

Une autre étude américaine sur un échantillon de 367 patients atteints de cancer pulmonaire a montrer que 9% des patients avaient une mutation sur l'exon 20 ; 46% sur l'exon 19 ; et 38% sur l'exon 21. **(Arcila et al., 2013).**

DISCUSSION

Pour l'exon 18, la mutation a été détectée 5 fois soit un pourcentage de 26.31%, dans une étude qui a été réalisé pour connaître les types de mutation de l'EGFR sur une série de 42 patients, 15 ont présenté la mutation sur l'exon 18 soit 35%. (**Lindeman et al., 2013**)

Conclusion

CONCLUSION

Le cancer broncho-pulmonaire reste difficile à diagnostiquer puisque il n'existe aucun moyen de dépistage, c'est à dire qu'il n'y a pas d'examens réguliers permettant de mettre en évidence un cancer du poumon.

De plus les symptômes paraissent souvent anodins et le patient ne s'alarme donc pas mais une fois diagnostiqué, donc dans la plupart des cas à un stade avancé, des métastases sont déjà présentes.

Malgré de nombreuses méthodes de traitements, aucune ne peut guérir définitivement le cancer si le stade de celui-ci est trop avancé. Les traitements permettent seulement d'allonger la durée de vie du patient.

L'objectif de cette étude a été atteint d'une part pour l'étude histologique (du prélèvement jusqu'au étalement avec la coloration HE) et d'autre part pour la recherche et la caractérisation de la mutation EGFR et la maîtrise de la technique de PCR en temps réel. Ces travaux ont nécessité la mise au point de nombreux protocoles.

Après une étude de l'aspect anatomopathologique et moléculaire du cancer broncho-pulmonaire en Algérie, on déduit que l'incidence de cancer broncho-pulmonaire est en nette augmentation avec une prédominance masculine appartenant à la tranche d'âge de 50ans à 70ans.

La mutation EGFR a été détectée chez 07 patients de sexe masculin et 06 patients de sexe féminin, cette mutation peut survenir à tout âge en sachant que la série étudiée est de 27 à 78ans.

Toutefois dans cette étude nous avons été confrontés à quelques difficultés d'interprétation de résultats de certains cas du fait de manque de matériel génétique.

Les thérapies ciblées restent la solution la plus sûre pour les patients atteints de ce genre de cancer, mais le problème qui se pose est que les patients traités par les ITK (inhibiteur de la tyrosine kinase) développent toujours une résistance surtout les patients qui présentent des mutations au niveau des exons 19 et 21.

L'ère est actuellement à la biologie moléculaire et à la thérapie ciblée. Ces dernières restent la solution la plus sûre pour les patients atteints de ce type de cancer.

- ❖ Ce travail n'est qu'une ébauche, et qu'il mériterait d'être élargie et développé dans une étude multi centrique, et sur une cohorte plus élargie afin d'avoir une cohérence plus significative avec les études réalisées auparavant.

Références bibliographiques

REFERENCE BIBLIOGRQPHIAUE

- ✓ Ahcéne T, 2015-cancer broncho-pulmonaire: première cause de mortalité en Algérie :
Journal el Waten le 29-11-2015.
- ✓ Astrid Lièvre. ; Pierre Laurent-Puig. ; 2010 -La voie de signalisation RAS/MAPK ;
Vol.2 N° 01 :38-42.
- ✓ Belot A, Grosclaude P, Bossard N, Woronoff A, Delafosse P, Remontet L ; 2008-
Incidence et mortalité par cancer en France sur la période 1980-2005. Rev Epidemiol
sante publique:56 :159-75.
- ✓ C. Ngo¹. ; S. Duong-Quy.; 2015 - Anomalies moléculaires et ciblage thérapeutique
des cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules ; JOURNAL FRANCO-
VIETNAMIEN DE PNEUMOLOGIE, 17(6):4-9.
- ✓ Cancer du poumon non à petites cellules : un guide pour les patients. ; 2014 - Basé sur
les recommandations de l'ESMO.
- ✓ Catherine S chilla, Lukas B ubendorfb,c, A lexandros P apachristofiloub,d,; 2015 -
Cancer du poumon non à petites cellules
- ✓ Chantal Dreyer. ; Eric Raymon. ; Sandrine Faivre. ; 2009 - la voie de signalisation
PI3K/AKT/mTOR. ; Vol.1 N° 03 :187-189
- ✓ Collège Français des Pathologistes, 2013-Itel306-tumeurs du poumon primitif et
secondaire.
- ✓ Dela Cruz CS, Tanoue LT, Matthay RA, 2011- Lung cancer: epidemiology, etiology,
and prevention. Clin Chest Med; 32: 605–44.
- ✓ Djeddi E. ; 2013 – cancer broncho-pulmonaire ; mémoire de médecine ; faculté de
médecine Tlemcen ; 79p.

REFERENCE BIBLIOGRQPHIAUE

- ✓ Européan society for medical oncologie ; 2014-Cancer du poumon non à petites cellules: un guide pour les patients basée sur les recommandations de l'ESMO.V.1
- ✓ Ferlay J, Shine HR, Bray F, et al. Estimates of world wild burden of cancer in 2008: Globocan 2008.int J cancer 2010:17.
- ✓ Gaud G;2009-Impact de l'expression d'un inhibiteur de protease a serine, le TFPI-2, sur le microenvironnement tumoral pulmonaire, thèse de doctorat :p.28.
- ✓ Geoffrey R. Oxnard, Peter Lo, Mizuki Nishino, Suzanne Dahlberg, Neal. Lindeman,Mohit Butaney, David M. Jackman, Bruce E. Johnson, and Pasi A. Jänne;2013-Natural history and molecular characteristics of lung cancers harboring *EGFR* exon 20 insertions: 8(2): 179–184.
- ✓ Gregory J. Riely,Katerina A. Politi,Vincent A.Miller,and William Pao;2006, Update on Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Non-Small Cell Lung Cancer.
- ✓ Groussard O et Daste G ; 2001-anatomie pathologique des cancers broncho-pulmonaire. Classification, anatomie pathologique, cytologie.Encycle Méd Chir, Pneumologie, Paris, p.17.
- ✓ Hechet S, Robacco carcinogens; 2003 - their biomarkers and tobacco-induced cancer.Dans nature Reviews, vol.3, No 10, p.733-744.
- ✓ Institut national du cancer, 2013, guide du parcours des soins cancer broncho-pulmonaire.
- ✓ Institut national du cancer. ; 2015- Cancer bronchique non à petites cellules : 1-36.
- ✓ Jean-Michel A, Martin C, Morère J, Escudier E, Katsanis G, Poirier J-2008 ,Histologie : les tissus.

REFERENCE BIBLIOGRQPHIAUE

- ✓ Jenn-Yu Wu, Chong-Jen Yu, Yeun-Chung Chang, Chih-Hsin Yang, Jin-Yuan Shih, and Pan-Chyr Yang; 2011- Effectiveness of Tyrosine Kinase Inhibitors on "Uncommon" Epidermal Growth Factor Receptor Mutations of Unknown Clinical Significance in Non–Small Cell Lung Cancer: 10.1158/1078-0432.
- ✓ Johanne Marcotte et Renée Ouimet ; 2005-les bronches et les poumons, p40.
- ✓ Johanne Marcotte et Renée Ouimet, 2005, les bronches et les poumons.
- ✓ Lababede O, Meziane M, Rice T ; 2011-Seventh edition of the cancer staging manual and stage grouping of lung cancer :quick reference chart and diagrams.Chest.1369(1) :p183-9.
- ✓ Maria E. Arcila, Khedoudja Nafa, Jamie E. Chaft, Natasha Rekhtman, Christopher Lau, Boris A. Reva ,Maureen F. Zakowski, Mark G. Kris, and Marc Ladanyi;2013-EGFRExon 20 Insertion Mutations in Lung Adenocarcinomas:Prevalence, Molecular Heterogeneity, and Clinicopathologic Characteristics: 10.1158/1535-7163.
- ✓ Martel C, Ferlay J,Franceschi S,Vignat J, Bray F, Forman D, Plummer M, 2008- Global burden of cancers attributable to infections in 2008:a revien and synthetic analysis.The lancest Oncology 2012; 13:607-615.
- ✓ Mitsudomi T, Yatabe Y; 2010-Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*, 277: 301–308.
- ✓ Mok TS, Wu YL. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med*. 2009 Sep 3;361(10):947-57.
- ✓ Nadji S; 2014-Aspects morphologiques, imunohistochimiques et moléculaires du mélanome.
- ✓ Neal I. Lindeman, Philip T. Cagle, Mary Beth Beasley, Dhananjay Arun Chitale, Sanja Dacic, Giuseppe Giaccone, Robert Brian Jenkins, David J. Kwiatkowski, MD,

REFERENCE BIBLIOGRQPHIAUE

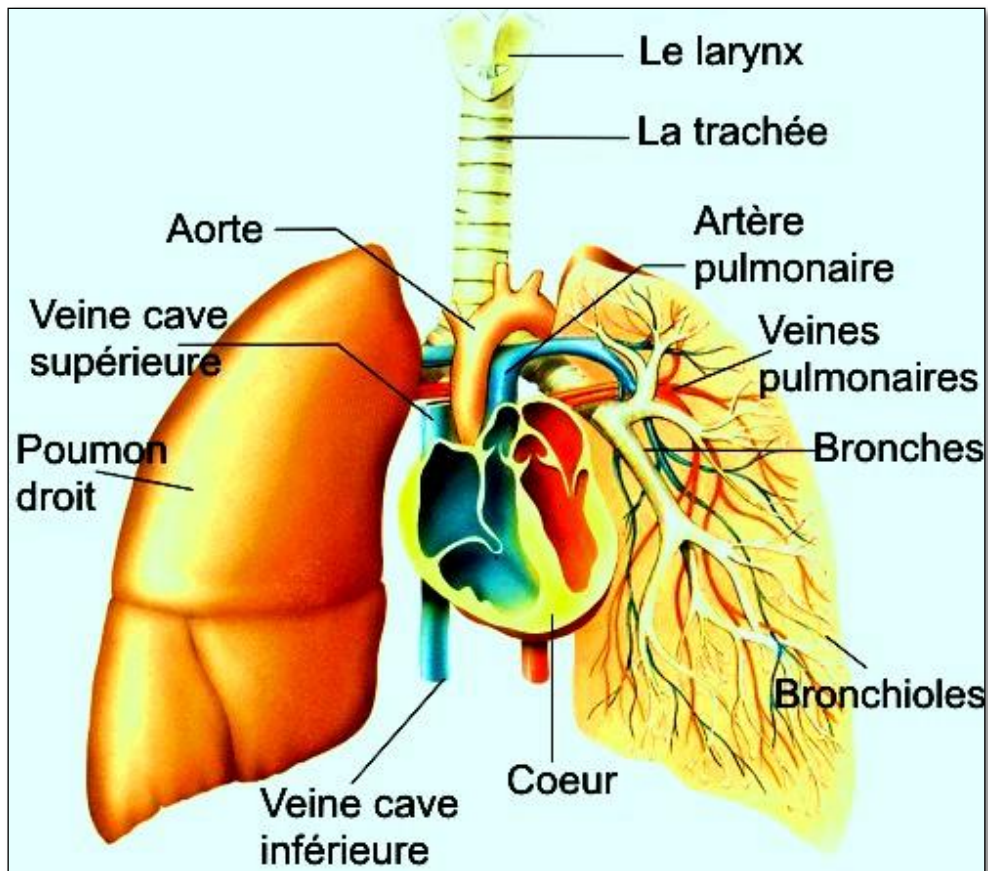
- Juan-Sebastian Saldivar, Jeremy Squire, Erik Thunnissen, MD, and Marc Ladanyi;2013- Molecular Testing Guideline for Selection of Lung Cancer Patients for EGFR and ALK Tyrosine Kinase Inhibitor, 8(7): 823–859.
- ✓ Oxnard GR, Arcila ME; 2011-Acquired resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors in EGFR-mutant lung cancer: distinct natural history of patients with tumors harboring the T790M mutation. *Clin Cancer Res*;17(6):1616-22.
 - ✓ Pierre Hubert. ; 2006 - la famille de l'EGF et leurs récepteurs ; bull cancer ; hors-série ; 17-24.
 - ✓ Pierrick HORDE. ; 2014 -Carcinome à petites cellules – santé médecine.net.
 - ✓ Pierrick HORDE. ; 2014 -Classification TNM – santé médecine.net.
 - ✓ Rosell R, Moran T; 2009- Screening for epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *N Engl J Med*; 361(10):958-67.
 - ✓ Roy S. Herbst, John V. Heymach., and Scott M. Lippman; 2012-Molecular origins of cancer,Lung cancer, review The new England journal of medicine ,p.74,p.63,p.53.
 - ✓ Sharma SV, Bell DW; 2007- EGFR mutations in lung cancer. *Nat Rev Cancer*. 7(3):169-81.
 - ✓ Soda M, Choi YL , Enomoto M,Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, Fujiwara S, Watanabe H, Bando M, Ohno S, Ishikawa Y, Aburatani H, Niki T, Sohara Y, Sugiyama Y, ManoH;2007-identification of the transforming eml4-ALK fusion gene in non-small cell lung cancer Revue Nature,p.561-566.
 - ✓ Sopori M, 2002-Effects of cigarette smoke on the immune system. *Nature Reviews Immunology*, vol.2, N°05, p.372-377.
 - ✓ World Cancer Report 2014, IARC.

REFERENCE BIBLIOGRQPHIAUE

- ✓ Yokota J, Kohno T; 2005-Molecular footprints of human lung cancer progression.
Journal of England medicine, p123-130.

Annexes

Annexe I: structure du poumon



Classification TNM 2009 / 7^{ème} édition

Annexe II: La dimension de la tumeur primaire

TUMEUR PRIMITIVE (T)	
TX	Tumeur qui ne peut être évaluée ou tumeur démontrée par la présence de cellules malignes dans les expectorations ou un lavage broncho alvéolaire sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie
T0	Pas d'évidence de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ
T1	Tumeur ≤ 3 cm dans sa plus grande dimension, entourée par le poumon ou la plèvre viscérale, sans évidence bronchoscopique d'invasion de la bronche souche
T1a	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension
T1b	Tumeur entre de 2cm et 3 cm dans sa plus grande dimension
T2	Tumeur > 3 cm et ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension ou présentant une des caractéristiques suivantes : - atteinte de la bronche souche à 2 cm ou plus de la carène - invasion de la plèvre viscérale - présence d'une atélectasie ou d'une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre le poumon complet
T2a	Tumeur > 3 cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
T2b	Tumeur > 5 cm et ≤ 7 cm dans sa plus grande dimension
T3	Tumeur > 7 cm ; ou envahissant directement une des structures suivantes : la paroi thoracique (y compris tumeur de Pancoast), le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale ou le péricarde pariétal ; ou une tumeur dans la bronche souche à moins de 2 cm de la carène sans l'envahir ; ou associée à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive du poumon entier ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans le même lobe
T4	Tumeur de toute taille envahissant directement une des structures suivantes : médiastin, coeur, gros vaisseaux, trachée, nerf laryngé récurrent, oesophage, corps vertébral, carène ; ou présence d'un nodule tumoral distinct dans un autre lobe du poumon atteint

Annexe III: la lettre N qui symbolise une attaque éventuelle des ganglions lymphatiques voisins

ADÉNOPATHIES RÉGIONALES (N)	
NX	Les ganglions régionaux ne peuvent être évalués
N0	Pas de métastase ganglionnaire lymphatique régionale
N1	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques intra pulmonaires, péri bronchiques et/ou hilaires homolatéraux, y compris par envahissement direct
N2	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques médiastinaux homolatéraux et/ou sous carinaires
N3	Métastase(s) dans les ganglions lymphatiques médiastinaux controlatéraux, hilaires controlatéraux, scalènes ou sus-claviculaires homo- ou controlatéraux.

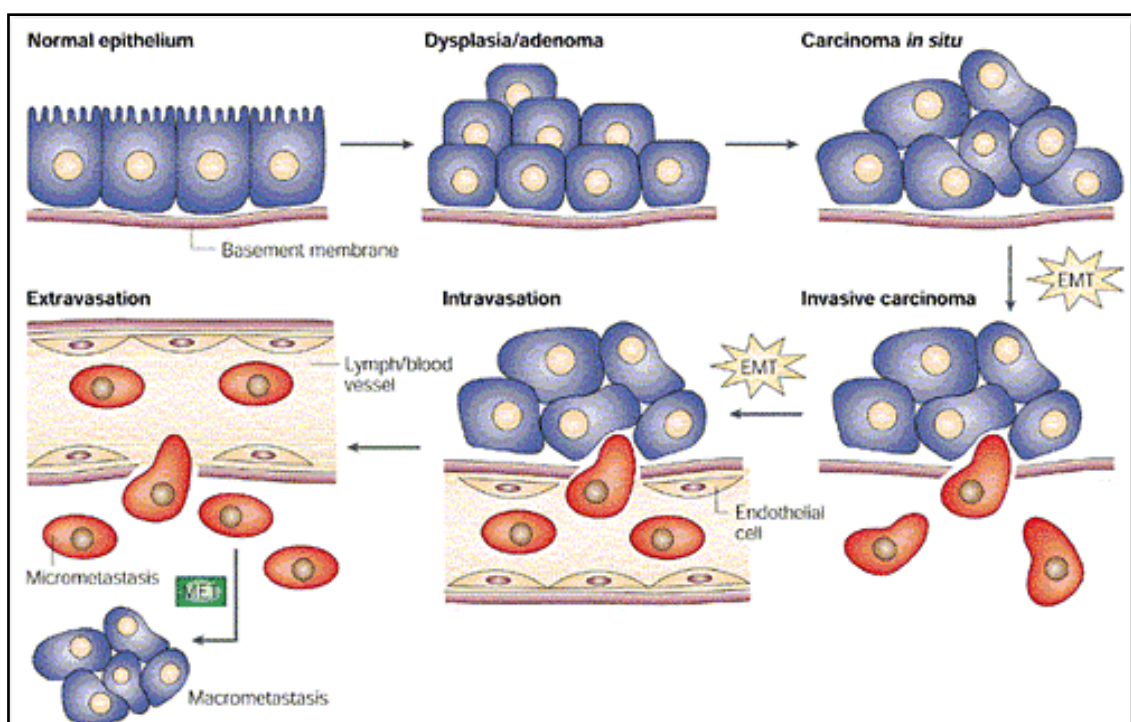
Annexe IV: la lettre M qui symbolise Métastases a distance

MÉTASTASES À DISTANCE (M)		
MX	La présence de métastase(s) à distance ne peut être évaluée	
M0	Absence de métastase à distance	
M1	Présence de métastase(s) à distance	
	M1a	Nodule(s) tumoral (aux) distinct(s) dans un lobe controlatéral ; tumeur avec nodules pleuraux ou épanchement pleural (ou péricardique) malin
	M1b	Métastase(s) à distance

Annexe V : la classification en stade du cancer du poumon

Carcinome in situ	TX	N0	M0
Stade 0	Tis	N0	M0
Stade IA	T1a,T1b	N0	M0
Stade IB	T2a	N0	M0
Stade IIA	T2b	N0	M0
	T1a ,T1b	N1	M0
	T2a	N1	M0
Stade IIB	T2b	N1	M1
	T3	N0	M0
Stade IIIA	T1a,T2b,T2a,T2b	N2	M0
	T3	N1,N2	M0
	T4	NO,N1	M0
Stade IIIB	T4	N2	M0
	Quelque soit T	N3	M0
Stade IV	Quelque soit T	Quelque soit N	M1

Annexe VI : la transformation maligne d'une cellule



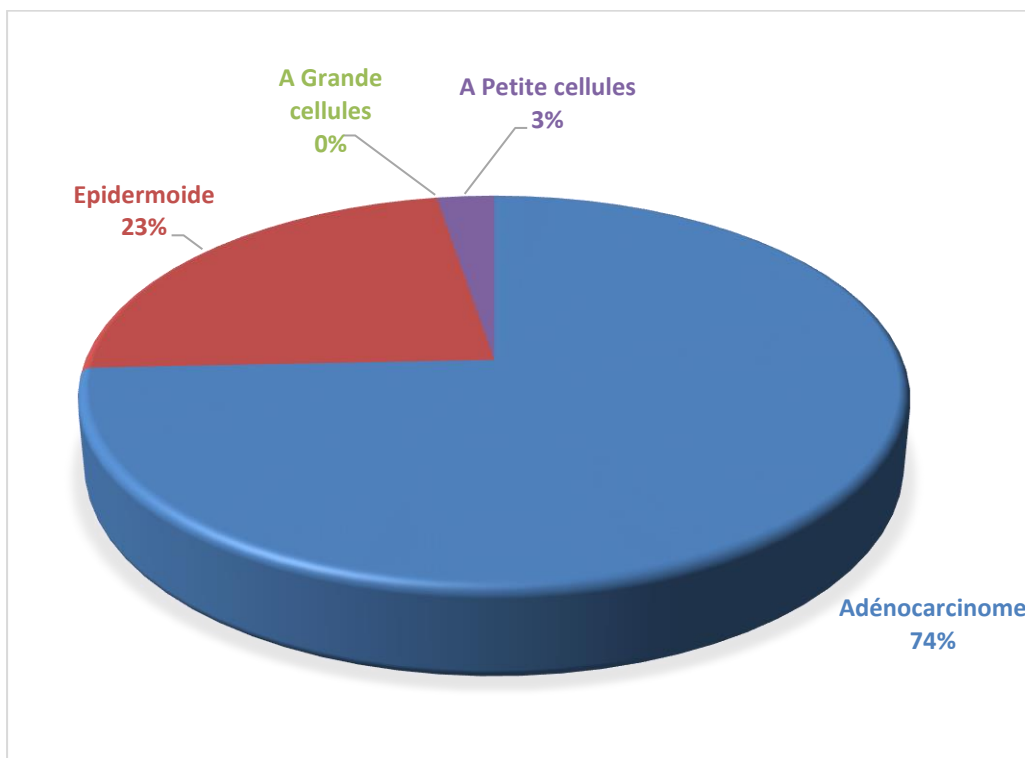
Annexe VII: les thérapies ciblées disposant d'une AMM

Pathologie	Biomarqueur(s)	Molécule(s) prescrite (s)
Leucémie myéloïde chronique (LMC) Leucémie aigu lymphoblastique (LAL)	Translocation de BCR-ABL	Imatinib Dasatinib Nilotinib Bosutinib Ponatinib
GIST	Mutation de KIT Mutation de PDGFRA	Imatinib
Cancer du sein	Amplification de HER2	Trastuzumab Lapatinib
Cancer gastrique	Amplification de HER2	Trastuzumab
Cancer colorectal métastatique	Mutations de KRAS	Panitumumab Cetuximab
Cancer du poumon	Mutations d'EGFR Translocation d'ALK	Gefitinib Erlotinib Afatinib Crizotinib
Mélanome	Mutations V600 de BRAF	Vemurafenib Debrafenib

Annexe VIII : Matériel non biologique

Appareillage	Matériel et verreries	Réactif
<ul style="list-style-type: none">– Bain-marie– Microtome– Agitateur (AGIMATIC-S)– Etuve– Appareille d'inclusion	<ul style="list-style-type: none">– Lame d'étalement– Lames silanisées– Panier de lames– Micropipettes	<ul style="list-style-type: none">– Formol a 10%– Ethanol a 80%, 90%, 100 %– Eau distillée et Eau de robinet– Paraffine– Hématoxyline– Eosine– Ammoniac– Xylène

Annexe IX : la répartition de patients selon le type du cancer pulmonaire



Annexe X : listes des patients sélectionnés

Numéros	Age	Sexe	Mutation EGFR
01	78 ans	Mâle	Muté
02	28 ans	Femelle	Muté
03	27 ans	Femelle	Muté
04	41 ans	Mâle	Muté
05	66 ans	Mâle	Muté
06	55 ans	Mâle	Muté
07	52 ans	Mâle	Muté
08	44 ans	Mâle	Non muté
09	34 ans	Mâle	Muté
10	70 ans	Femelle	Muté
11	61 ans	Mâle	Non muté
12	53 ans	Mâle	Non muté
13	62 ans	Mâle	Non muté
14	65 ans	Mâle	Non muté
15	65 ans	Mâle	Non muté
16	59 ans	Mâle	Non muté
17	42 ans	Mâle	Non muté
18	67 ans	Mâle	Non muté
19	68 ans	Mâle	Non muté
20	72 ans	Mâle	Non muté
21	59 ans	Mâle	Non muté
22	42 ans	Mâle	Non muté
23	57 ans	Femelle	Non muté
24	66 ans	Mâle	Non muté
25	77 ans	Mâle	Non muté
26	59 ans	Mâle	Muté
27	60 ans	Femelle	Muté
28	43 ans	Femelle	Muté
29	39 ans	Femelle	Muté
30	58 ans	Mâle	Non muté

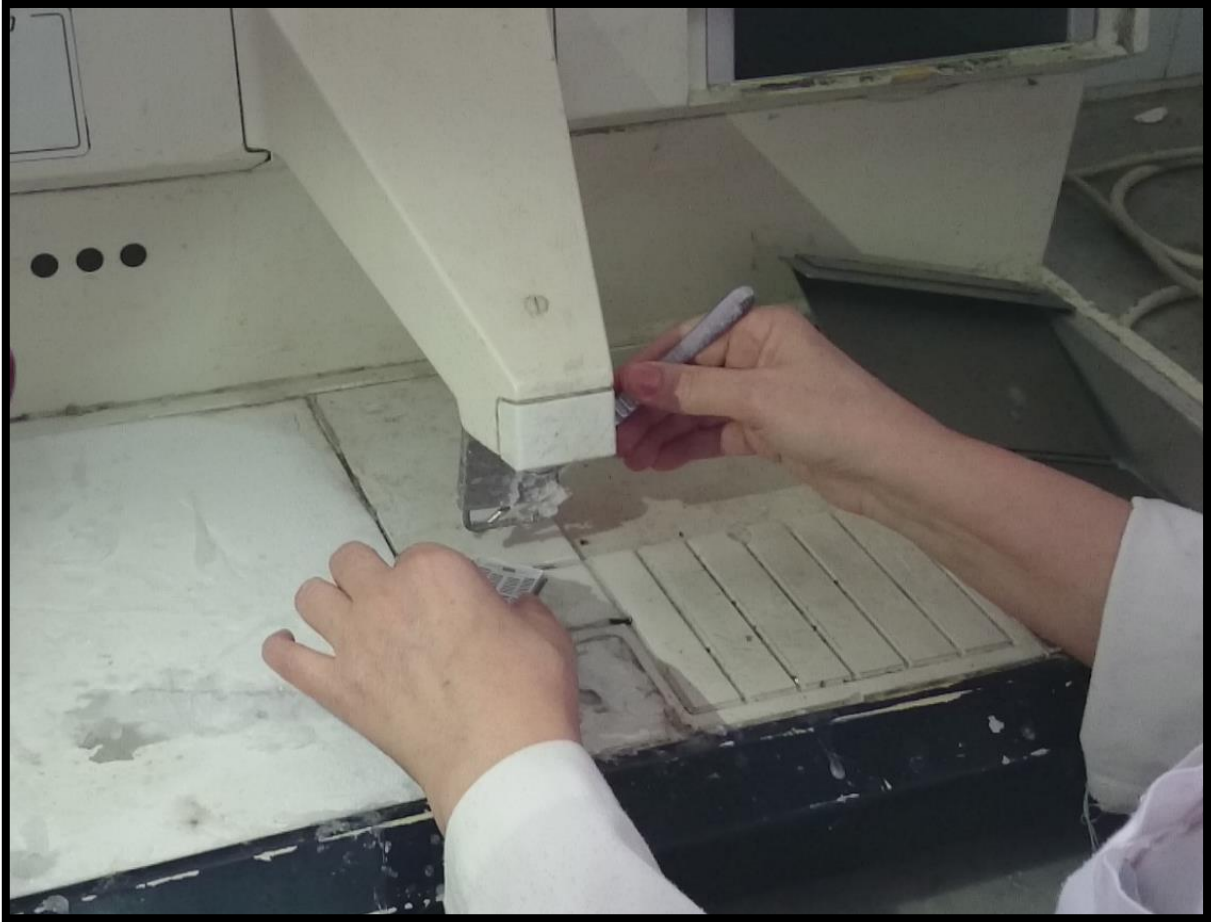
Annexe XI : la macroscopie.



Annexe XII: automate de déshydratation



Annexe XIII : l'imprégnation



Annexe XIV : le microtome.



Annexe XV: Etalement du tissu sur les lames



Annexe XVI: liste des mutations d'EGFR détectées par le kit

<u>Exon 18</u>	<u>Exon19</u>	<u>Exon 21</u>
G719A- 2156G>C	2235-2249 del 15	2239-2247 del 9
G719S- 2155G>A	2235-2252> AATdel18	2239-2253 del 15
G719C- 2155G>T	2236-2253 del 18	2239-2256 del 18
	2237-2251del 15	2239-2248 >C del 10
	2237-2254 del 18	2239-2258 > CA del20
<u>Exon 20</u>	2237-2255> T del 19	2240-2251del 12
T790M- 2369C>T	2236-2250 del 15	2240-2257 del 18
S7681-2303G>T	2238-2255 del 18	2240-2254 del 15
2307- 2308ins GCCAGCGTG	2238-2248> GT del 11	2239-2251 >C del 13
2319-2320 ins CAC	2238-2252> GCA del 15	
2310-2311 ins GGT		