

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

Université BLIDA I
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et de Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études
En vue de l'obtention du diplôme de Master
Option : Biosignalisation cellulaire et moléculaire : Génétique du cancer

Thème

Lésions néoplasiques intra-épithéliales précancéreuses de la prostate

Présenté par :
MAHI Mohamed Samir

Soutenu le 17/06/2015 devant le jury composé de :

M ^{me} SAADI L.	Maitre de conférences A	Université de Blida	Présidente
M ^{me} HANNACHI L.	Maitre de conférences A	Faculté de Médecine Université Alger	Examinatrice
M ^{me} MAMERIS.	Professeur	Faculté de Médecine Université Alger	Promotrice

Promotion 2014-2015

Remerciements

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

Je voudrais tout d'abord adresser toute ma gratitude à la directrice de ce mémoire, Professeur MAMERI S. pour sa patience, sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.

Je désire aussi remercier le professeur AMIR ZC. chef de service du laboratoire d'anatomo-pathologie de C.H.U Mustapha Pacha pour m'avoir permis d'effectuer ce stage au sein de son service.

J'adresse mes sincères remerciements à Madame SAADI L. pour avoir accepté de présider le jury.

Je tiens également à adresser mes vifs remerciements au professeur HANNACHI L. d'avoir accepté d'examiner ce mémoire.

Je voudrais exprimer ma reconnaissance envers les amis, collègues et personnel du service d'Anatomo-Pathologie du CHU Mustapha Pacha qui m'ont apporté leur support moral et intellectuel tout au long de ma démarche.

Dédicaces

*Je tiens d'abord à dédier ce modeste travail à mes
chers parents, qui m'ont donné tout ce dont
j'avais besoin afin de parvenir à ce stade,
et aux quels revient le mérite d'être ce que je suis aujourd'hui.*

*À ma sœur Maha, a ma belle soeur Nesrine
et à mon frère Yazid.*

*Et j'ai une pensée pour tous mes amis et toutes
les personnes que j'ai pu rencontrer pendant
mon parcours universitaire particulièrement
ceux de la promotion de biochimie de l'année 2012*

Samir

Liste des tableaux

Tableau I : Caractéristiques de l'anticorps anti-ERG.....	p.16
Tableau II : Répartition des patients selon l'aspect macroscopique.....	p.23
Tableau III : Répartition des patients selon le score de Gleason	p.24
Tableau IV : Résultats de l'expression de ERG	p.24
Tableau V : Résultats de l'expression de ERG selon l'aspect macroscopique.....	p.26
Tableau VI : Résultats de l'expression de ERG selon le score Gleason	p.26
Tableau VII : Caractéristiques des patients de la série	Annexe 1
Tableau VIII : Expression de ERG dans les tissus sains	Annexe 2
Tableau IX : Expression de ERG dans le tissu Tumoral	Annexe 3
Tableau X : Constituants des bains de l'automate a inclusion	Annexe 4
Tableau XI : Protocole de coloration usuelle de routine « Hématoxyline Eosine »....	Annexe 5
Tableau XII : Prélèvements selon le protocole de Stanford	Annexe 6

Liste des figures

Figure 1 : Situation anatomique de la prostate	p.2
Figure 2 : Description zonale décrite par McNeal.....	p.3
Figure 3 : Organisation cellulaire prostatique.....	p.5
Figure 4 : Mode d'action de l'androgène par voie classique.	p.8
Figure 5 : Processus moléculaire et génétique de la progression tumorale	p.9
Figure 6 : Lésions de PIN de bas grade vues au microscope	p.10
Figure 7 : Différents types architecturaux du HGPIIN	p.11
Figure 8 : Incidence des cancers chez les hommes en Algérie.....	p.12
Figure 9 : Mécanisme de fusion des gènes : TMPRSS2-ERG	p.14
Figure 10 : Oncogenèse médiée par les androgènes après fusion/translocation.	p.14
Figure 11 : Appareils assurant la déshydratation et l'inclusion en paraffine.....	Annexe 7
Figure 12 : Différents moules utilisés pour l'inclusion en paraffine.....	Annexe 8
Figure 13 : Disposition de pièce de tissu prostatique dans le moule à paraffine.....	Annexe 8
Figure 14 : Appareil microtome.....	Annexe 9
Figure 15 : Découpe en ruban d'un bloc de paraffine.....	Annexe 9

Liste des abréviations

AKT : protéine kinase B

Caspase-2 : aspartic-acid-specific cystein proteases- 2

ERG : ETS-related gene

ETS : E26 transformation-specific

p27 (Kip1): cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

PI3K: phosphoinositide 3-kinase

PKA: protéine kinase A

PKC : protein kinase C

PLC γ : phosphoinositide phospholipase C

Protéine Rb : protéine du rétinoblastome

PTEN: phosphatase and TENSin homolog,

TMPRSS2 : transmembrane protease, serine 2

Glossaire

- **Caspase-2** : groupe de protéases à cystéine qui jouent un rôle essentiel dans les phénomènes inflammatoires
- **Chromogranine A** : principale protéine de la famille des chromogranine localisées exclusivement dans les granules de sécrétion des cellules endocrines, neuroendocrines et des neurones.
- **Clusters de différenciation** : marqueurs des surfaces cellulaires exprimés par les populations cellulaires du système immunitaire et déterminent le type cellulaire et éventuellement leur fonction.
- **EGF** : hormone protéique aux multiples actions, principalement trophiques.
- **FGF** : protéines qui activent la migration et la multiplication des cellules cibles.
- **Glucocorticoïdes** : sont des corticostéroïdes qui ont une action sur le métabolisme protéique et glucidique.
- **HGF** : facteur de croissance, agent mitogène des hépatocytes (cellules du foie).
- **IGF** : hormone peptidique ayant une structure chimique semblable à celle de la pro insuline. Cette hormone est majoritairement sécrétée par le foie
- **Immunophiline** : superfamille de protéines hautement conservées qui aident au repliement et à l'assemblage d'autres protéines.
- **Minéralo-corticoïdes** : classe de stéroïdes caractérisés par leur similarité avec l'aldostérone et leur influence sur le métabolisme hydrosodique. Leurs actions passent par leur liaison à un récepteur nucléaire spécifique, le récepteur des minéraux corticoïdes.
- **Neuron-specific enolase (NSE)** : Protéine d'une des trois formes de l'énolase et utilisée comme marqueurs des destructions neuronales. Son gène est l'ENO2 situé sur le chromosome 12 humain.
- **Phosphatases acides prostatiques (PAP)** : enzymes (phosphatases) synthétisées dans le réticulum endoplasmique qui déphosphorylent les esters orthophosphoriques organiques

- **Protéine Rb** : protéine de séquestration qui exerce un contrôle négatif du cycle cellulaire.
- **PTEN** : gène impliqué dans le contrôle tumoral, il participe à la régulation du cycle de division cellulaire en empêchant les cellules de se diviser trop rapidement et de façon incontrôlée.
- **Sphincter** : un muscle circulaire situé autour d'un conduit naturel (tube digestif, vessie, etc.).
- **Synaptophysine** : Protéine à quatre hélices transmembranaires de la membrane des vésicules synaptiques stockant les neuromédiateurs
- **Veru montanum** : (ou colliculus séminal) est un petit monticule situé dans l'urètre masculin, sous la partie inférieure de la prostate et au-dessus du sphincter urétral strié.

Résumé

Le cancer de la prostate est le premier cancer de l'homme de plus de 50 ans dans le monde, il est au deuxième rang de la mortalité par cancer des hommes dans cette tranche d'âge. Son incidence est également en augmentation en Algérie, dans les 2/3 des cas il est diagnostiqué à un stade localement avancé et/ou métastatique. La détection de lésions précoces précancéreuses, à un stade utile non encore invasif, est d'un grand intérêt en anatomie pathologique en vue d'améliorer la prise en charge et la survie des patients. Ces lésions précancéreuses prostatiques dont le diagnostic est assez aisé à l'examen histologique de routine sont le sujet de nombreuses recherches à travers le monde afin d'élaborer des marqueurs immunohistochimiques pouvant permettre d'évaluer leur devenir et donc de pronostiquer celles qui sont le plus susceptibles d'évoluer vers un cancer invasif agressif.

Notre travail est une étude rétrospective et prospective sur une période de 4 ans, de 2012 à 2015, réalisée au niveau du service d'Anatomie Pathologique du C.H.U Mustapha Pacha d'Alger et dont l'objectif est d'évaluer l'expression et l'utilité du marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-ERG chez 30 patients qui présentent des lésions néoplasiques intraépithéliales prostatiques de haut grade (HGPIIN).

Notre étude a été menée sur une population d'une moyenne d'âge de 67 ans, les prélèvements analysés sont des biopsies prostatiques et des pièces de prostatectomies préalablement fixées et incluses dans des blocs de paraffines. L'étude immunohistochimique révèle que l'expression de la protéine ERG dans les foyers HGPIIN est positive dans 67% des cas contre 33% de cas négatifs, l'expression positive est intense dans 90% des cas. Concernant la corrélation entre le score de Gleason qui est un score histopronostique et l'expression de ERG, celle-ci est statistiquement non significative.

Notre résultat indique que l'expression de ERG peut avoir une utilité pronostique de l'agressivité du cancer de la prostate dès le stade HGPIIN. Cependant plusieurs autres études ont évalué la signification pronostique de l'existence de gènes de fusion (ERG-TMPRSS2) avec des résultats contradictoires et peu interprétables du fait de la taille limitée des effectifs. Cette étude doit être poursuivie et élargie sur un nombre plus important de malades afin de pouvoir la valider statistiquement.

Mots clés : cancer, lésions précancéreuses, HGPIIN, prostate, fusion TMPRSS2-ERG, ERG, immunohistochimie.

Abstract

The prostatic cancer is the first human cancer over 50 years in the world and the second in men cancer mortality in this age group. Its incidence is increasing in Algeria and in 2/3 of cases; it is diagnosed in locally advanced and / or metastatic stage. The detection of early precancerous lesions is of great interest in pathology to improve the care and survival of patients. These precancerous prostatic lesions whose diagnosis is relatively easy in routine histological examination are the subject of a lot of research to develop immunohistochemical markers that can help assess their future and then to predict those who are most likely to progress to aggressive invasive cancer.

Our work is a retrospective and prospective study over a period of 4 years, from 2012 to 2015, performed at the Pathological Anatomy Department of CHU Mustapha Pacha of Algiers, our objective is to evaluate the expression and utility of immunohistochemical staining of anti-ERG antibody in 30 patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplastic lesions (HGPIN).

Our study was led in a population with an average age of 67, analyzed samples are prostatic biopsies and prostatectomies previously fixed and embedded in paraffin blocks. Immunohistochemical study showed that the expression of the ERG protein in HGPIN foci is positive in 67% of cases against 33% of negative cases; the positive expression is intense in 90% of cases. Concerning, the correlation between the Gleason score (histoprognostic score) and expression of ERG this one is statistically insignificant.

Our result indicates that the expression of ERG may have prognostic utility of the aggressiveness of prostatic cancer at the HGPIN stage. However, several other studies have evaluated the prognostic significance of the existence of fusion gene (TMPRSS2-ERG) with contradictory and no interpretable results due to the limited size of the studies. This study should be continued and extended over a greater number of patients in order to validate it statistically.

Keywords: cancer, precancerous lesions, HGPIN, prostate, fusion TMPRSS2-ERG, ERG, immunohistochemistry.

ملخص

سرطان البروستات هو أول سرطان عند الرجال الأكثر من 50 عاما في العالم ويحتل المرتبة الثانية في معدل وفيات سرطان الرجال في هذه الفئة العمرية. الإصابة به في تزايد في الجزائر، حيث 2/3 من الحالات يتم تشخيصه في مرحلة متقدمة. الكشف عن سرطان البروستات في وقت مبكر يمثل منفعة كبيرة في علم معالجة الأمراض هذا سيساعد في تحسين الرعاية الصحية للمرضى. من الصعب تشخيص سرطان البروستات المبكر (PIN) في الفحص الروتيني. الكثير من الأبحاث في العالم تسعى لتطوير تقنية تحليل الكيمياء النسيجية المناعية التي يمكن أن تساعد بالتنبؤ بالمرضى الذين هم من المحتمل أن يتطور عندهم سرطان البروستات الى المرحلة الانتشارية.

عملنا هو دراسة رجعية ومستقبلية على مدى 4 سنوات، 2012-2015، أجريت في قسم الأمراض التشريحي بالمستشفى الجامعي مصطفى باشا في الجزائر العاصمة، والذي يهدف إلى تقييم التعبير وإيجاد فائدة من تقنية التحليل الكيميائي النسيجي المناعية المضادة ل-ERG عند 30 مرضى يعانون من سرطان البروستات المبكر من الدرجة العالية (HGPIIN).

قد أجريت الدراسة على مرضى الذي يبلغ متوسط أعمارهم 67 عاما، تم تحليل عينات خزعات البروستات وأجزاء البروستات المستأصلة جراحيا اللواتي سبق إدراجها في كتل البرافين. أظهرت دراسة تقنية التحليل الكيميائي النسيجي المناعية أن التعبير عن بروتين ERG في HGPIIN إيجابية في 67% من الحالات مقابل 33% من الحالات السلبية، التعبير الإيجابي كان مكثف في 90% من الحالات. وفيما يخص الارتباط بين درجة غليسون (Gleason) والتعبير عن ERG، هو بدون علاقة إحصائية.

نتائجنا تشير إلى أن التعبير عن ERG قد يكون أداة تشخيصية لعدوانية سرطان البروستات في مرحلة HGPIIN. ومع ذلك، فقد أظهرت عدة دراسات أخرى نتائج متناقضة، ربما هذا يعود لسبب محدودية حجم القوى العاملة. ينبغي أن تستمر هذه الدراسة وان تمدد على عدد أكبر من المرضى من أجل التحقق من صحتها إحصائيا.

كلمات البحث: البروستات، السرطان، سرطان البروستات المبكر، HGPIIN، TMRSS2-ERG، ERG، التحليل الكيميائي النسيجي المناعي.

Table des matières

Introduction.....	1
Chapitre I : Rappel bibliographique	
I.1. Rappels sur la prostate.....	2
I.1.1 - Anatomie de la prostate.....	2
I.1.2 - Embryologie de la prostate.....	4
I.1.3 - Histologie prostatique	4
I.1.3.1 - L'épithélium prostatique	4
I.1.3.2 - Stroma prostatique	5
I.1.4 - Fonctions de la prostate	6
I.1.5 - Physiologie moléculaire de la glande prostatique	6
I.1.6 - Mode d'action des androgènes.....	7
I.1.6.1 - Voie génomique classique	7
I.1.6.2 - Voie non génomique	8
I.2. Le cancer de la prostate.....	9
I.2.1 - Néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN) ..	9
I.2.1.1 - PIN de bas grade	10
I.2.1.2 - PIN de haut grade (HGPIIN)	10
I.2.2 - Epidémiologie	11
I.2.3 – Diagnostic	12
I.2.3.1 - Conduite à tenir devant un diagnostic de HGPIIN	12
I.2.4 - Altérations génétique et moléculaire	13
I.2.4.1- Gène de Fusion TMPRSS2- ERG	13
I.2.4.2- Mécanismes de fusion	13
I.2.4.2.1- Fusions par délétion.....	13
I.2.4.2.2- Fusions par translocation	13
I.2.4.3 - Rôle du transcrit de fusion TMPRSS2-ERG	14

Chapitre II : Matériel et méthodes

II.1 - Type d'étude	15
II.2 - Objectif de l'étude	15
II.3 - Matériel Biologique	15
II.3.1 - Population de l'étude	15
II.3.2 - Recueil des données	15
II.3.3 - Analyse des données	15
II.4 - Matériel non biologique	16
II.5 - Méthodes	16
II.5.1 - Réception des prélèvements	16
II.5.2 - Etude macroscopique	17
II.5.3 – Imprégnation et inclusion	17
II.5.4 - Coupes et colorations	18
II.5.4 - Montage :	19
II.6 – Immunohistochimie	19
II.6.1 - Procédure de la technique d'IHC	19
II.6.1.1 - Confection des lames	19
II.6.1.2 - Déparaffinage	19
II.6.1.3 - Démasquage	19
II.6.1.4 - Dépôt de l'anticorps sur la lame	20
II.6.1.5 - Révélation	20
II.6.2 - Evaluation de l'immunomarquage	21
II.7. Méthode d'analyse statistique des données	21

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 - Critères sociodémographiques	22
III.1.1 - Age	22
III.1.2 - Nature du prélèvement	22
III.2 - Résultats microscopiques	23
III.2.1 Aspect macroscopique	23
III.2.2 - Caractéristique selon le score de Gleason	23
III.2.2 - Résultat immunohistochimique de l'expression de ERG	24

III.2.3 - Expression de ERG en fonction de l'aspect macroscopique.....	26
III.2.4 - Expression de ERG en fonction du score de Gleason	26
III.3.Discussion	27

Conclusion

Références bibliographiques

Annexes

| Introduction |

Le cancer de la prostate de par sa fréquence constitue un véritable problème de santé publique. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il est estimé que 1,1 millions d'hommes dans le monde ont été diagnostiqués avec le cancer de la prostate en 2012. En Algérie, c'est le 5^{ème} cancer le plus fréquent chez l'homme avec une incidence de 1037 cas diagnostiqués en 2014 **(OMS 2014)**.

La mise en place ces dernières années, d'un dépistage du cancer de la prostate par le dosage du taux des PSA (Prostate Specific Antigen) sériques, a eu comme effet une augmentation du nombre de biopsies que les pathologistes doivent interpréter, et comme conséquence une augmentation des lésions d'interprétation difficile comme les foyers de néoplasies intra épithéliales (PIN).

Devant une image de foyer suspect, un cancer peut être avancé, soulevant à tort plus d'inquiétude qu'un diagnostic de cancer, à l'urologue et au patient, induisant parfois à tort une nouvelle série de biopsies **(Molinié, 2004)**.

La recherche de marqueurs pronostiques fiables et de stratégies thérapeutiques efficaces est dès lors d'une importance clinique extrême. L'hétérogénéité moléculaire du cancer de la prostate constitue cependant un gros défi pour le développement d'approches diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques adéquates **(Mertza et al., 2011)**. Cependant la mise en évidence récente de gènes de fusion TMPRSS2-ETS dans une majorité des cancers de la prostate représentent une véritable révolution dans la connaissance biologique de ces tumeurs. Le variant le plus habituel implique deux gènes situés sur le chromosome 21 :TMPRSS2 et ERG **(Beuzeboc et al., 2009)**.

Pour que les patients atteints d'un cancer de la prostate puissent cependant véritablement tirer profit de la découverte de cette fusion génique, il faut parvenir dans une seconde étape à l'application de cette nouvelle acquisition en pratique clinique. Le recours aux techniques immunohistochimiques faisant appel au marqueur ERG est une étape indispensable. Il paraît donc intéressant de déterminer plus particulièrement le statut fusionnel dans les cas où les biopsies de la prostate montrent des PIN de haut grade. La présence d'une fusion des gènes TMPRSS2-ERG ouvre de nouvelles possibilités pronostiques et thérapeutiques **(Taris, 2013)**.



Chapitre I

Rappel bibliographique

I.1.Rappels sur la prostate

I.1.1 - Anatomie de la prostate

L'organisation anatomique de la prostate a fait l'objet de nombreuses études au cours du siècle dernier. Après la description des lobes prostatiques par Lowsley et al. en 1915, le modèle anatomique actuellement accepté est celui proposé par McNeal et al. en 1968 (**Seisen et al., 2012**).

La prostate est une glande de l'appareil génital masculin. C'est un organe unique, médian, situé dans le petit bassin, immédiatement sous la vessie et au carrefour des voies urinaires et génitales (**Fig. 1**). Elle pèse de 15 à 25 grammes chez l'adulte jeune et a environ la taille et la forme d'une châtaigne. Elle connaît deux phases de croissance : une à l'adolescence et l'autre après 60 ans (**Erdmann, 2007 ; Taris, 2013**). Le tissu glandulaire représente à peu près les deux tiers de son volume, le tiers restant étant de constitution fibro-musculaire. (**Moore et al., 2001**).

La prostate est traversée par la partie prostatique de l'urètre et par les deux conduits éjaculateurs. Le collicule séminal fait saillie sur la paroi dorsale de l'urètre ; son sommet est creusé par l'embouchure de l'utricule prostatique entre les orifices des deux conduits éjaculateurs. L'urètre prostatique est légèrement incurvé vers l'avant : l'angulation, à hauteur du collicule séminal, permet de lui reconnaître un segment proximal et un segment distal (**Lullman-rauch, 2008**).

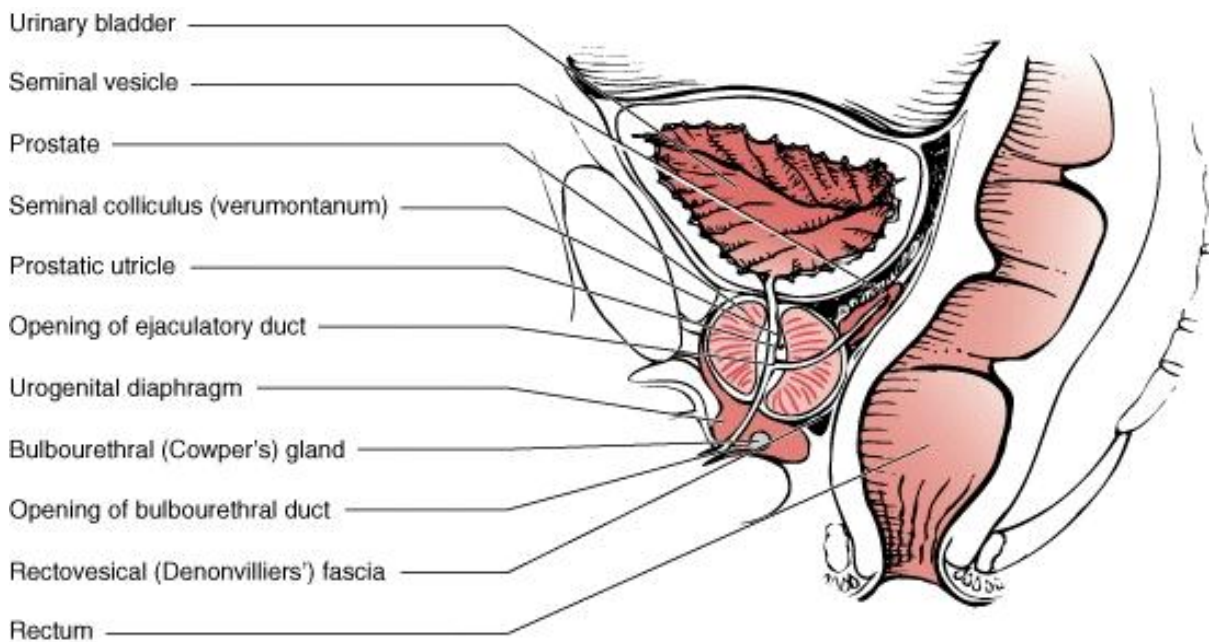


Figure 1 : Situation anatomique de la prostate (**Kufe et al., 2003**).

La description admise actuellement est la description zonale décrite par McNeal, elle comprend quatre zones qui sont (**Fig. 2**) :

- **une zone antérieure** : constituée de stroma fibromusculaire et dépourvue de glandes. Elle est en continuité avec le sphincter lisse de l'urètre. Elle ne subit aucun processus pathologique.
- **une zone périphérique** : entourant la quasi-totalité de l'urètre distal et se prolongeant vers le haut et l'arrière. Elle constitue la majeure partie du poids prostatique (70 %). Elle est le lieu privilégié de l'émergence de cancers.
- **une zone centrale** : constituant 25 % du poids de la glande prostatique. Elle a une forme triangulaire située autour des canaux éjaculateurs, Elle est traversée par les canaux éjaculateurs. L'histologie de cette zone ressemble à celle des vésicules séminales suggérant son origine wolffienne et donc mésoblastique. Elle est à l'origine de 10 % des cancers de la prostate.
- **une zone de transition** : forme les 5 % de tissu prostatique restants. Elle est constituée de deux petits lobes situés autour de l'urètre juste au-dessus du veru montanum. Cette zone donne naissance à 25 % des cancers de la prostate (**Bastien et al., 2011**).

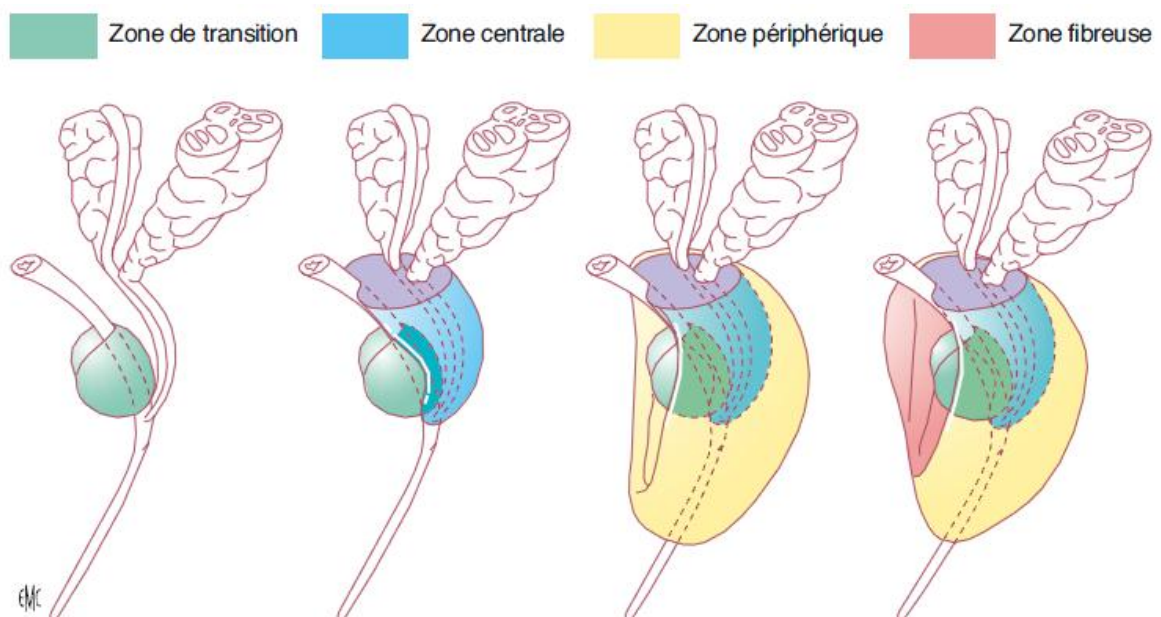


Figure 2 : Description zonale décrite par McNeal (**Bastien et al., 2011**).

I.1.2 - Embryologie de la prostate

Contrairement aux autres tissus du tractus génital mâle dont le développement embryonnaire se fait à partir des canaux de Wolff d'origine mésodermique, la prostate dérive du sinus urogénital d'origine endodermique. Le développement de la prostate est un phénomène qui se déroule selon les cinq étapes suivantes : la détermination, l'initiation et le bourgeonnement, la morphogenèse des branches, la différenciation et la maturation à la puberté ce processus se déroule chez le fœtus pendant les second et troisième trimestres de grossesse pour se terminer au moment de la naissance (**Prins et Putz, 2008**).

I.1.3 - Histologie prostatique

La prostate est constituée de glandes tubulo-acineuses ramifiées, enchâssées dans un tissu conjonctif fibromusculaire. Ces glandes déversent leur matériel de sécrétion dans l'urètre prostatique par l'intermédiaire de canaux (**Taris, 2013**).

I.1.3.1 - L'épithélium prostatique

L'épithélium prostatique (**Fig.3**) qui assure la fonction sécrétoire, est composé de plusieurs types cellulaires :

- **Les cellules épithéliales** : bordent la lumière des canaux de la glande prostatique. Ces cellules ont un index de prolifération faible et une différenciation élevée ; elles produisent les sécrétions qui sont déversées dans les acini prostatiques. À l'examen histologique, ces cellules sont riches en prostate specific antigen (PSA), en phosphatases acides prostatiques (PAP), en kératine, et expriment le récepteur à androgène (AR). Ces cellules fonctionnent en lien étroit avec le stroma prostatique et sont androgéno-dépendantes.
- **Les cellules neuroendocrines** : sont intra glandulaires, font partie de l'épithélium sécrétoire et sont visibles dans tous les secteurs de la glande prostatique. Elles sont même présentes dans l'urothélium de l'urètre prostatique. Elles peuvent être situées au sommet de l'épithélium, ou proches des cellules basales. Ces cellules, bien différenciées, n'expriment pas le PSA, sauf cas exceptionnel. Elles sont caractérisées par l'expression de la chromogranine A, la neuron-specific enolase (NSE), la sérotonine et la synaptophysine. Ces cellules participent à la croissance et à la différenciation de l'épithélium, via un contrôle autocrine et paracrine.
- **Les TAC** (transit-amplifying cells) : sont des cellules plutôt basales, intermédiaires entre les cellules souches basales de l'épithélium glandulaire et les cellules épithéliales matures de la couche supérieure, Leur phénotype est pro prolifératif et leur croissance est indirectement dépendante des androgènes.

- **Les cellules basales** : sont petites, peu nombreuses, pluripotentes et quiescentes, situées à proximité de la membrane basale de l'épithélium, ce sont des cellules prolifératives androgéno-indépendantes. Elles expriment le marqueur cluster de différenciation (CD) 44 et les cytokératines (CK) 5 et 14, mais n'expriment pas le PSA (Cornu et al., 2011 ; Erdmann, 2007).

I.1.3.2 - Stroma prostatique

Le stroma de la prostate est formé de cellules musculaires lisses, de fibroblastes, de cellules endothéliales et de cellules de l'inflammation. Les facteurs de croissance produits par le stroma sont très nombreux : certains interviennent dans la différenciation prostatique, d'autres dans la prolifération ou l'inhibition de la croissance cellulaire. Parmi ces facteurs de croissance, 5 familles sont connues pour agir sur la prolifération et la différenciation de l'épithélium : TGF (Transforming Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor), IGF (Insulin Growth Factor), EGF (Epithelial Growth Factor) et HGF (Hepatocyte Growth Factor). Le stroma produit notamment les facteurs FGF7 et 10 qui stimulent directement la prolifération des cellules épithéliales. La matrice extracellulaire, les facteurs de croissance provenant du stroma, ainsi que les androgènes sont essentiels au bon fonctionnement et à la différenciation de l'épithélium prostatique (Erdmann, 2007).

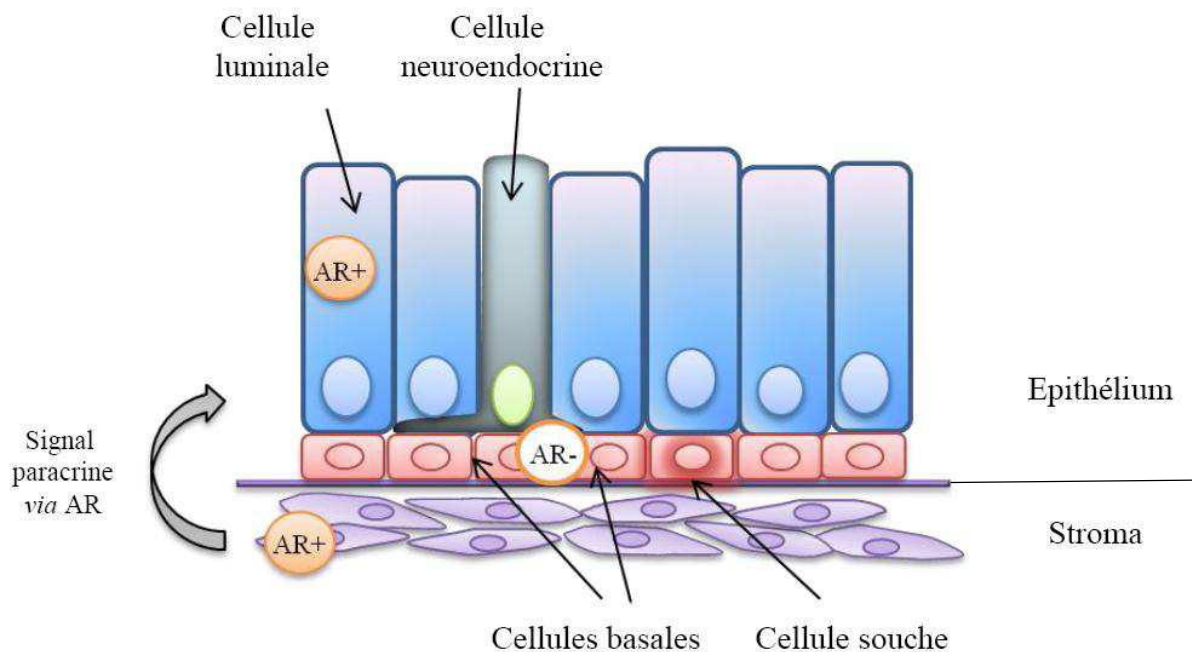


Figure 3 : Organisation cellulaire prostatique (Kroiss, 2013).

I.1.4 - Fonctions de la prostate

Ses principales fonctions sont la sécrétion (10 à 30%) et surtout le stockage du liquide séminal. Par ses caractéristiques contractiles, la prostate participe aussi à l'expulsion du sperme lors de l'éjaculation.

Le fonctionnement de la prostate est sous l'influence des androgènes et principalement la testostérone. Il en est de même pour la croissance, le développement et le maintien des fonctions de la prostate. La testostérone est principalement synthétisée dans le testicule par les cellules de Leydig, sous contrôle de l'hormone lutéïnisante (LH) hypophysaire. Dans la cellule prostatique, la testostérone est métabolisée en dihydrotestostérone (DHT) par une enzyme spécifique : la 5 alpha-réductase. La DHT est l'androgène intracellulaire le plus efficace.

Sous l'influence de ces androgènes, les cellules prostatiques sécrètent le PSA qui ajouté au sperme, permet de liquéfier le fluide gélatineux après l'éjaculation. Une petite partie de ce PSA se retrouve dans le sang. Les cellules adénocarcinomeuses de la prostate produisent plus de PSA que les cellules normales.

Enfin, la prostate joue également un rôle dans le contrôle du flux urinaire par l'intermédiaire des fibres musculaires intra prostatiques qui, par leur contraction, permettent de ralentir l'écoulement de l'urine **(Taris, 2013)**.

I.1.5 - Physiologie moléculaire de la glande prostatique

La testostérone et la DHT sont les principaux androgènes de l'organisme. Ils font partie de la famille des hormones stéroïdiennes dont le précurseur commun est le cholestérol **(Pignon, 2010)**.

Les androgènes sont des substances lipidiques qui traversent facilement toutes les membranes cellulaires ; cependant, afin qu'une cellule puisse réagir avec un androgène, elle doit contenir des protéines réceptrices capables de capter et de retenir ces stéroïdes **(Blanchard et Bernard, 1997)**.

Le Récepteur à androgène appartient à la sous famille III de la superfamille des récepteurs nucléaires avec les récepteurs aux glucocorticoïdes, aux oestrogènes, à la progestérone et aux minéralocorticoïdes. Cette famille est également connue comme la famille des récepteurs aux stéroïdes **(Pignon, 2010)**.

Le développement et l'homéostasie de la prostate normale sont dépendants d'une morphogenèse tissulaire active et permanente, sous l'influence des androgènes (et dans une moindre mesure des estrogènes), impliquant principalement la différenciation, l'activité et l'apoptose des cellules épithéliales **(Cornu, 2011)**.

I.1.6 - Mode d'action des androgènes

I.1.6.1 - Voie génomique classique

La testostérone circulant dans le sang est majoritairement liée à des protéines de transport telles que l'albumine ou la SHBG (Sex-Hormone Binding Globulin). La testostérone libre est capable de pénétrer dans les cellules prostatiques soit par diffusion passive à travers la membrane plasmique soit de manière assistée par un transporteur de protéines (**Dayon, 2008**).

On qualifie de génomique (**Fig. 4**) le mode d'action selon lequel le récepteur des androgènes agit en tant que facteur de transcription. En absence de liaison à son ligand, AR se trouve séquestré au niveau du cytoplasme. Le récepteur des androgènes se trouve en effet associé à un complexe protéique qui contient notamment les protéines de choc thermique HSP (Heat shock proteins) telles que HSP90, HSP70 et l'immunophiline (HSP56/FKBP52). Le rôle premier de ces protéines chaperonnes est de masquer le NLS (Signal de localisation nucléaire), de maintenir AR sous forme stable et sous une conformation favorable à la fixation du ligand (**Viennois, 2011**).

L'interaction de la DHT avec le RA induit un changement conformationnel du RA, la dissociation des protéines HSP, la dimérisation des RA et leur transport dans le noyau. Les dimères se fixent sur l'ADN sur les ARE (androgen response element) et induisent le recrutement de :

1. Cofacteurs type co-activateurs : tels SRC-1 (Steroid Receptor Coactivator-1), TIF2 (Transcription Intermediary Factor 2) ou des co-répresseurs tel : AES (Aminoterminal Enhancer of Split).
2. Facteurs de transcription.
3. ARN polymérase II (**Martin et al., 2008**).

Ce complexe protéique active la transcription de gènes spécifiques androgéno-régulés. Le RA régule la transcription de nombreux gènes impliqués dans différents mécanismes cellulaires. Tout d'abord, il régule la transcription des gènes impliqués dans la synthèse, la maturation, le transport et la dégradation des protéines sécrétées dans le liquide séminal. Ensuite, le RA régule l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme de la glycolyse et du cholestérol. De plus, il module aussi l'expression de gènes impliqués dans la signalisation intracellulaire dont le :

- Cycle cellulaire par induction des cyclines D1 et D3, et inhibition d'inhibiteurs du cycle comme la protéine Rb.
- Apoptose: caspase-2, FLIP (FADD-like IL-1 β -converting enzyme inhibitory protein).
- Facteurs de croissance (IGF et EGF (Epidermal Growth Factor)), et leur voie de signalisation, les MAP Kinases (Mitogen-activated protein kinases).
- Facteurs de transcription (**Réveiller, 2008**).

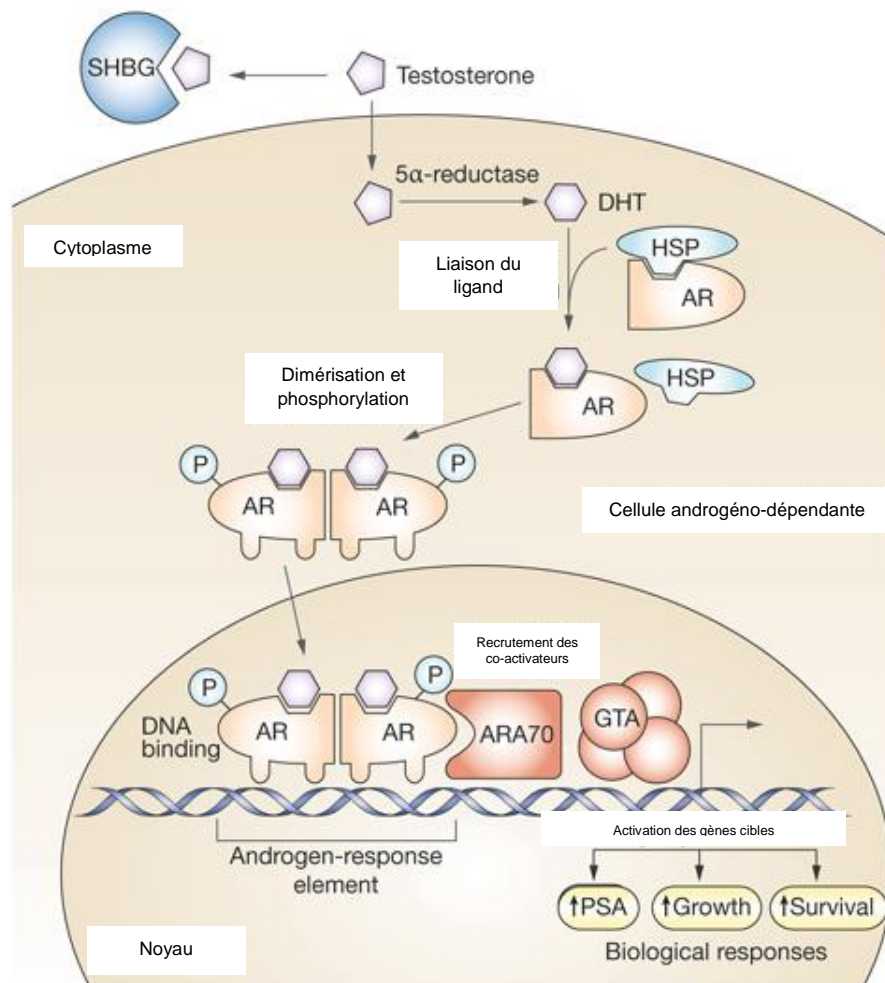


Figure 4 : Mode d'action de l'androgène par voie classique (Harris, 2009).

I.1.6.2 - Voie non génomique

Outre les effets transcriptionnels médiés par le RA, les androgènes sont capables d'activer rapidement, dans l'ordre de la minute, différentes voies de signalisation comme les voies MAPK, PI3K/AKT, PLCγ/PKC/PKA aboutissant à l'activation de protéines cytoplasmiques, de canaux ioniques et/ou de facteurs de transcription (Pignon, 2010).

La voie non génomique se différencie de la voie génomique par deux caractéristiques : sa rapidité d'action et l'absence d'interaction RA-ADN. En effet, l'activation de la voie non génomique est mesurable en quelques minutes alors que l'initiation de la transcription de gènes par la voie classique prend 30 à 45 min et la synthèse des protéines correspondantes, plusieurs heures. La rapidité d'action de la voie non génomique fait souvent intervenir des modifications de type phosphorylation/déphosphorylation. Les inhibiteurs de la transcription et de la synthèse protéique sont sans effet sur la voie non génomique qui est indépendante de l'interaction du RA avec l'ADN (Réveiller, 2008).

I.2 - Le cancer de la prostate

L'histoire naturelle du cancer de la prostate (CaP) semble débuter par la transformation progressive des cellules normales épithéliales en cellules tumorales suite à l'action de facteurs tumorigènes (prédisposition génétique, facteurs environnementaux,...) (Réveiller, 2008).

Dans la très grande majorité des cas (90 à 95 %), les cancers de la prostate sont des adénocarcinomes (cancers développés à partir de l'épithélium glandulaire de la prostate au niveau de la zone périphérique). De manière beaucoup moins fréquente, on peut retrouver d'autres formes particulières de CaP tel que l'adénocarcinome à différenciation neuroendocrine ou les sarcomes de la prostate (Erdmann, 2007).

I.2.1 - Néoplasie intraépithéliale prostatique (PIN)

Ces lésions ont été décrites en 1986 par McNEAL et BOSTWICK sous le terme de dysplasie intracanaulaire et subdivisées en 3 grades : grade 1, 2, 3. Le terme de PIN proposé par BOSTWICK et BRAWER (1987) a progressivement remplacé le terme de dysplasie intracanaulaire. La subdivision en 3 grades est remplacée par 2 grades : PIN de bas grade correspondant à la dysplasie intra canalaire de grade 1, et PIN de haut grade regroupant les dysplasies intracanaulaires de grade 2 et 3. Les lésions PIN sont caractérisées par une prolifération des cellules épithéliales bordant les canaux et les acini prostatiques (Fig.5). Ces cellules épithéliales présentent des anomalies cytonucléaires, mais les canaux glandulaires ont conservé une architecture normale. Les lésions de PIN bien que multifocales et bilatérales, prédominent dans la zone périphérique (Villers et Molinie, 2000). Ces lésions présentent des altérations phénotypiques et génétiques proche du carcinome invasif, la différence majeure avec les cancers est que l'assise cellulaire basale est conservée (Réveiller, 2008).

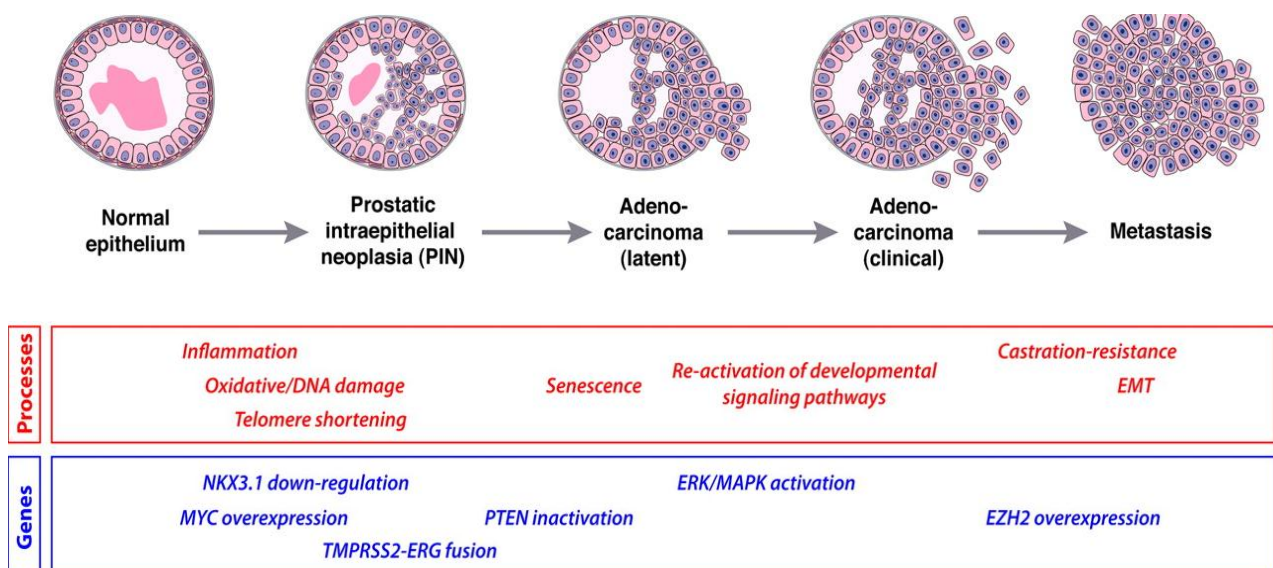


Figure 5 : Processus moléculaire et génétique de la progression tumorale (Shen, 2010).

I.2.1.1 - PIN de bas grade

La PIN de bas grade est de diagnostic incertain en raison d'atypies cytologiques très discrètes (**Berger, 2004**) le revêtement glandulaire canalaire et acinaire montre des signes de prolifération avec épaissement du revêtement (**fig. 6A**). Les noyaux sont irréguliers en taille (nombreux noyaux petits réguliers et nombre variable de grands noyaux hyperchromatiques) mais renferment des nucléoles petits, ils sont entassés avec un certain degré d'hyperchromasie avec persistance de la couche de cellules basales (**fig. 6B**) (**Eble et al., 2004**).

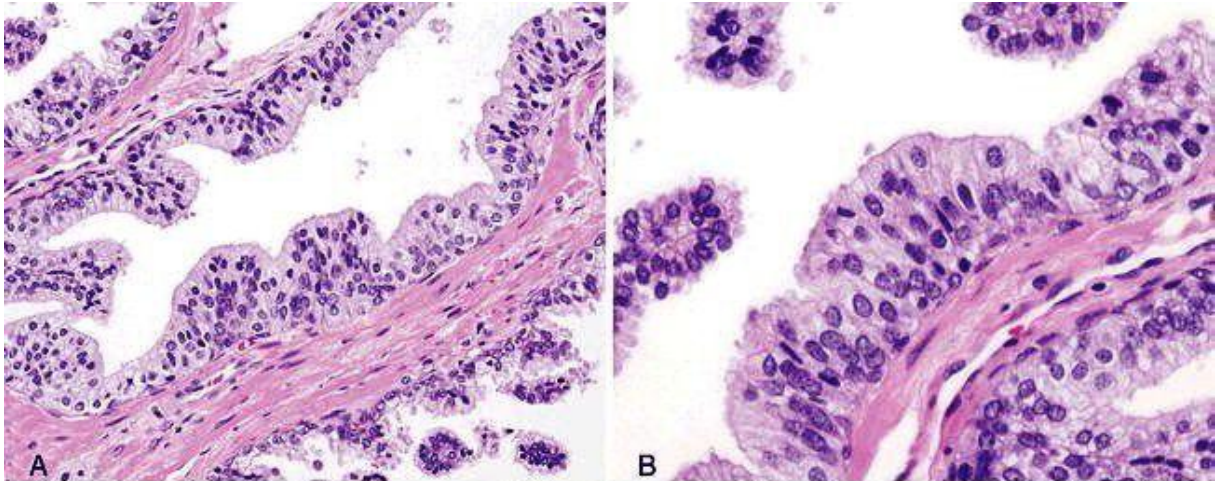


Figure 6 : Lésions de PIN de bas grade vues au microscope (A : grossissement x200, B : grossissement x400) (**Roychowdhury, 2012**).

I.2.1.2 - PIN de haut grade (HGPIN)

La PIN de haut grade est la seule lésion prostatique considérée de façon quasi certaine comme le stade pré invasif de l'adénocarcinome. Cependant le délai d'apparition du cancer pouvant être très éloigné, elle ne doit pas être assimilée à un carcinome in situ afin de ne pas traiter prématurément les patients (**Berger, 2004**).

La stratification est plus marquée que dans les faibles grades. La majorité des noyaux sont augmentés de volume et on peut observer des nucléoles proéminents. L'hyperchromasie est également plus marquée (**Fig. 7**).

Les atypies nucléaires sont franches et les nucléoles bien nets. On peut noter des images en pont et des aspects cribriformes. On distingue 4 types architecturaux : micropapillaire, cribriforme, touffes, plat (**Bostwick, 1996 ; Bostwick, 1995**).

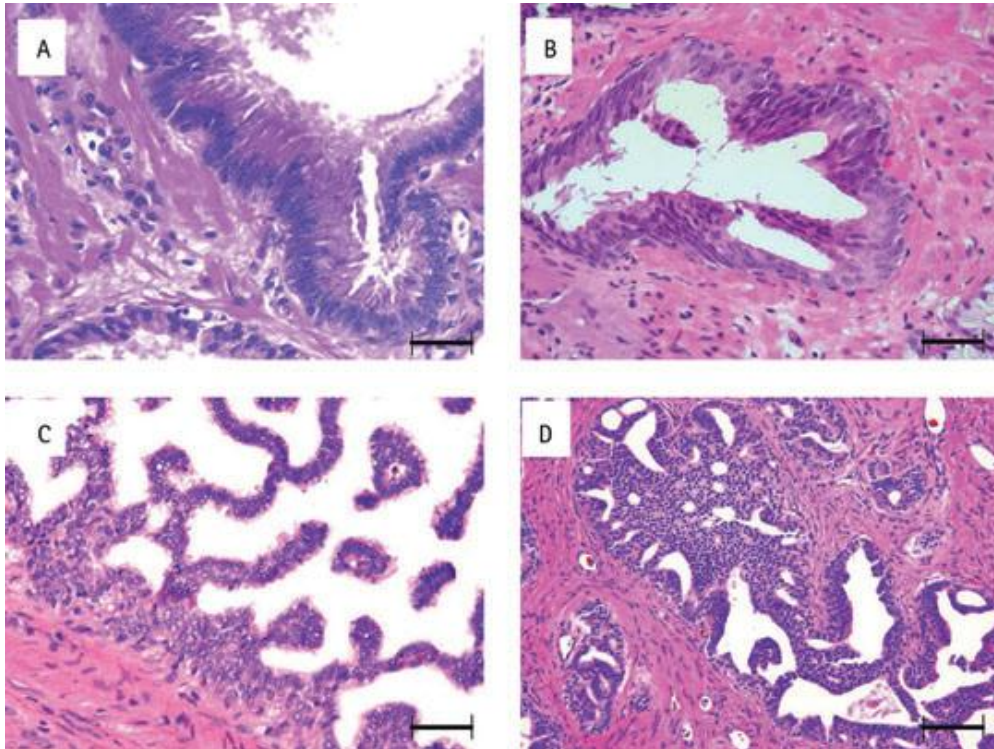


Figure 7 : Différents types architecturaux du HGPIN, (A) : plat, (B) : touffes, (C) : micro papillaire, (D) : cribriforme. Echelle : A et B = 50 μ m ; C et D = 25 μ m (**Montironi et al., 2011**).

I.2.2 - Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le CaP est le second cancer le plus fréquent chez les hommes après le cancer du poumon. Près de 70 % des cas (759 000) se produisent dans les régions développées. Les taux sont plus élevés en Australie, Nouvelle-Zélande, l'Amérique du Nord, Europe de l'Ouest et du Nord, Selon l'OMS, en Algérie le cancer de la prostate est le 5^{ème} cancer (**Fig. 8**) le plus fréquent chez l'homme avec une incidence de 1037 cas diagnostiqués en 2014 (**OMS, 2014**).

Le travail épidémiologique de Sakr et al (1999) a montré que la prévalence de la HGPIN augmente deux à trois décennies avant que l'incidence du CaP ne commence à monter. La recherche de Sakr prouve également que les Afro-américains ont une plus forte présence de HGPIN. Il semble précéder le cancer de plus de 10 ans, avec une augmentation relative à l'âge parallèle de la fréquence de la HGPIN et du cancer. La HGPIN a été trouvée dans 9 % des hommes dans la deuxième décennie de la vie, 22 % des hommes dans la troisième décennie, et 40 % des hommes dans la quatrième décennie. Avant que les hommes atteignent l'âge de 80 ans, la prévalence de la HGPIN est de 70%. Très peu d'éléments sont connus au sujet de l'épidémiologie de la HGPIN (**Ahouandjinou, 2008**).

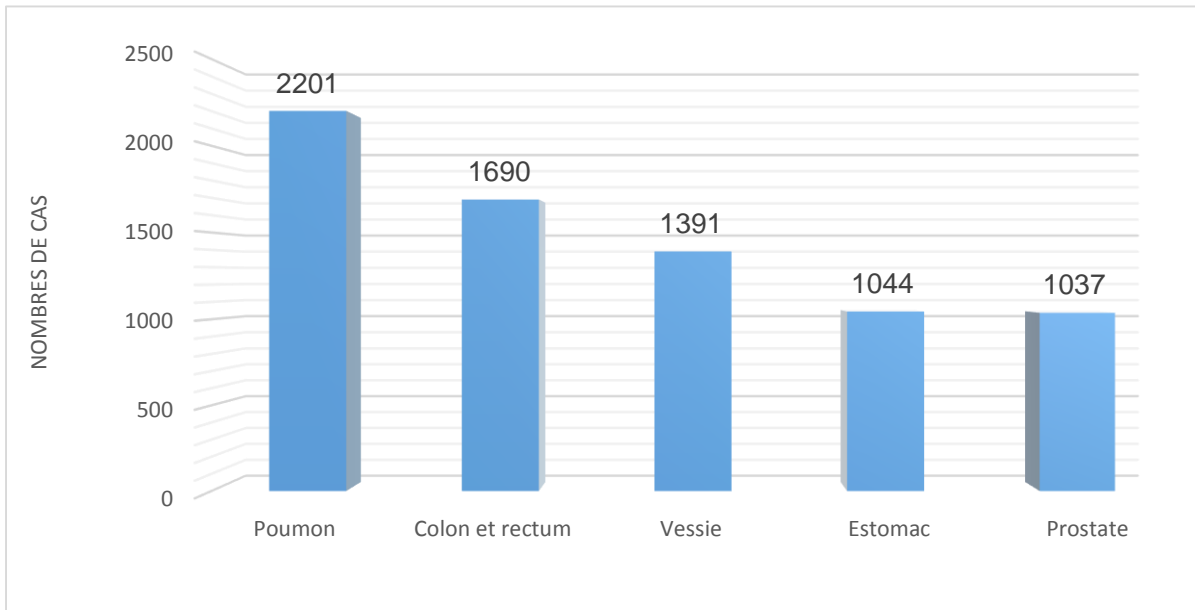


Figure 8 : Incidence des cancers chez les hommes en Algérie (OMS, 2014).

I.2.3 – Diagnostic

HGPIN est un processus néoplasique non invasif, qui ne forme pas de masse tumorale et ne provoque pas de symptômes cliniques (Zynger et Yang, 2009). Les lésions PIN sont observées essentiellement sur les pièces de prostatectomie radicale ou sur les biopsies, ou plus rarement sur les copeaux de résection. Les lésions de PIN isolées en cas d'anomalies du toucher rectal, ou de l'échostructure à l'échographie, sont rares car ces lésions ne modifient pas le stroma et ne s'accompagnent pas d'une augmentation de la densité des glandes. En cas de toucher rectal anormal, la fréquence de cancer invasif sur une nouvelle série de biopsies est de 100%. Il n'a pas été montré d'augmentation du taux du PSA en présence de lésions isolées de PIN, et les taux suspects de PSA situés entre 4 et 10 ng/ml, associés à des lésions de PIN de haut grade sont plutôt liés à la présence occulte d'un cancer associé (Villers et al., 2000).

I.2.3.1 - Conduite à tenir devant un diagnostic de HGPIN :

L'identification du diagnostic de PIN de haut grade ne doit pas entraîner de décision thérapeutique. Il n'est pas nécessaire de refaire un dosage du PSA. Une nouvelle série de biopsie est recommandée dans les trois mois. La stratégie optimale du choix du site des nouvelles biopsies n'est pas définie. En cas de première série de biopsies en sextant, une nouvelle série de biopsies est recommandée, associant des biopsies dirigées sur le site où il existait des lésions de PIN (3 biopsies au niveau du site de PIN, 2 biopsies adjacentes au site) à des biopsies systématisées du même côté. En cas de première série de biopsies non

systematisées, une nouvelle série de biopsies systematisées est recommandée (**Villers et Molinie, 2000**).

I.2.4 - Altérations génétique et moléculaire

Plus de 50 anomalies génétiques et moléculaires ont été associées à HGPIN. Au moins 10 de ces changements sont présentés dans l'HGPIN et le cancer de la prostate, la diminution de l'expression des gènes NKX3.1 (Homeobox protein Nkx-3.1), p27 (Kip1), les délétions de PTEN avec les gènes de fusion TMPRSS2-ERG sont les altérations génomiques les plus fréquemment retrouvées. Ces nombreuses études ont conduit à conclure que la PIN de haut grade est le précurseur le plus probable de l'adénocarcinome de la prostate, selon pratiquement toutes les données disponibles (**Klink et al., 2012 ; Montironi et al., 2007**).

I.2.4.1- Gène de Fusion TMPRSS2- ERG

Le gène TMPRSS2 se situe sur le chromosome 21 et code pour la sérine protéase transmembranaire-2 fortement exprimée par les cellules prostatiques normales et cancéreuses. Possédant dans ses promoteurs des séquences androgéno-dépendantes, son expression est régulée par les androgènes. Les gènes de la famille ETS (ERG, ETV1, ETV4) codent pour des facteurs de transcription intervenant dans les voies de signalisation qui régulent la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et la cancérogenèse (**Molinié et al., 2008**).

I.2.4.2- Mécanismes de fusion

Deux mécanismes de fusion (**Fig. 9**) des gènes ont été décrits :

I.2.4.2.1- Fusions par délétion

C'est le mécanisme de fusion le plus fréquent représentant environ 60 à 70% des cas. Il s'agit de la délétion de la région entre les deux gènes mettant alors en contact l'extrémité 3' de TMPRSS2 et l'extrémité 5' de ERG.

I.2.4.2.2- Fusions par translocation

La région entre les gènes TMPRSS2 et ERG est transloquée sur un autre chromosome. Comme dans la délétion, les deux gènes se retrouvent donc au contact l'un de l'autre (**Taris, 2013**).

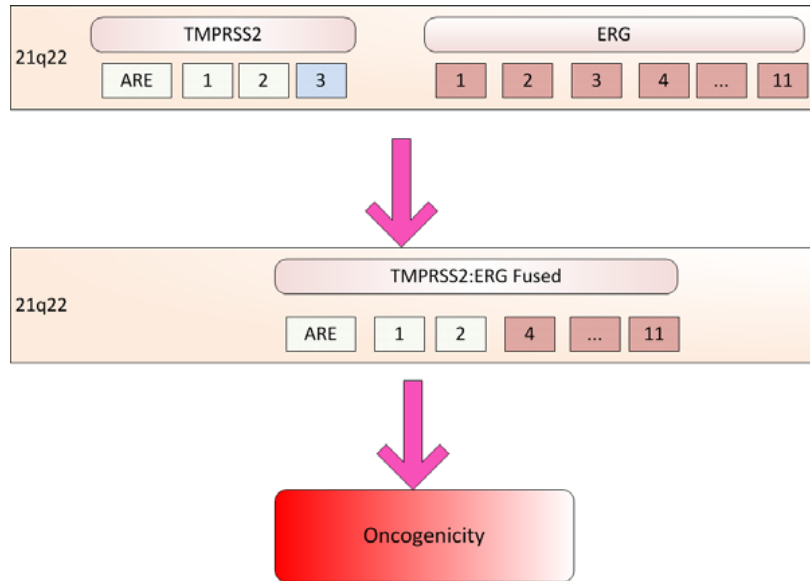


Figure 9 : Mécanisme de Fusion des gènes : TMPRSS2-ERG (McGarty, 2014).

I.2.4.3 - Rôle du transcrit de fusion TMPRSS2-ERG

La protéine synthétisée est une protéine ERG tronquée plutôt qu'une protéine chimérique. Dans la plupart des modèles in vitro et in vivo étudiés, l'expression de ERG consécutive à la présence du transcrit de fusion TMPRSS2-ERG augmente le potentiel de migration et d'invasion des cellules (Taris, 2013). L'activation d'ERG par la fusion avec TMPRSS2 serait responsable sous l'influence d'une stimulation androgénique de la surexpression de facteurs de transcription qui pourrait conduire à une reprogrammation épigénétique, une signalisation de WNT et une downregulation des voies de l'apoptose (Fig. 10). Les différents isoformes des gènes de fusion et leur niveau d'expression pourraient également affecter la progression tumorale (Molinié et al., 2008).

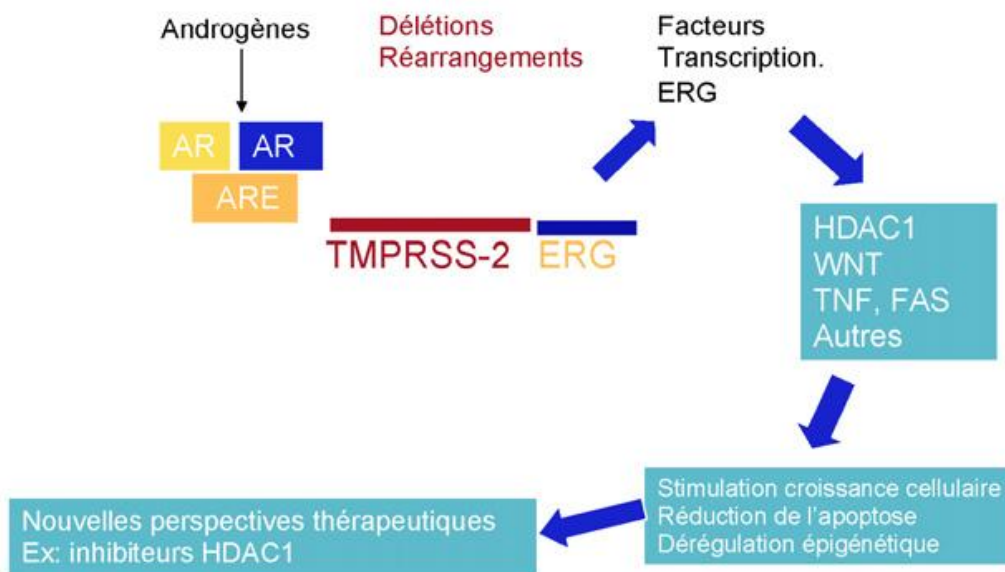


Figure 10 : Oncogénèse médiée par les androgènes après fusion/translocation (Molinié V et al. 2008)



Chapitre II

Matériel et méthodes

II.1 - Type d'étude

Il s'agit d'une étude rétrospective et prospective réalisée au niveau du service d'Anatomie Pathologique du C.H.U Mustapha Pacha d'Alger, incluant des patients qui présentent des lésions néoplasiques intraépithéliales prostatiques de haut grade (HGPIIN) sur une période de 4 ans, de 2012 à 2015. Ces patients proviennent de cabinets privés ou bien de consultations du service d'Urologie du CHU.

II.2 - Objectif de l'étude

Notre étude consiste à évaluer l'expression et l'utilité du marquage immuno-histochimique de l'anticorps anti-ERG dans les lésions HGPIIN.

II.3 - Matériel Biologique

II.3.1 - Population de l'étude

La population considérée dans notre étude est constituée de 30 patients, l'âge variant entre 56 ans à 78 ans, 3 ne présentent que des lésions isolées de HGPIIN et 27 présentent des lésions HGPIIN associées à un adénocarcinome prostatique.

Notre recherche rétrospective sur une période de 4 ans (2011-2014) nous a permis de trouver 29 cas, parmi eux 13/30 ont été réceptionnées en 2013, 9/30 en 2014, 4/30 en 2012 et 3/30 en 2011.

La recherche prospective sur une période de 4 mois de janvier 2015 à avril 2015 nous a permis de recenser un seul cas.

II.3.2 - Recueil des données

Effectué par une recherche exhaustive dans les fiches de renseignements des patients archivées dans le service, le critère d'inclusion exclusif est la présence de lésions HGPIIN.

II.3.3 - Analyse des données

Nous avons effectué un recueil de données par patient reporté sur le tableau Excel (**ANNEXE1**), concernant :

- Les données générales du patient : Numéro d'identification et âge au moment de l'intervention.
- Les informations en rapport avec l'intervention chirurgicale : nature du prélèvement
- Les données concernant le score de Gleason pour les cas associés à de l'adénocarcinome prostatique.

II.4 - Matériel non biologique

- **Fiches des patients** : Comportant les renseignements cliniques suivants : Numéro d'identification, Age, Nature du prélèvement, Diagnostic.
- **Lames confectionnées** : déjà réalisées pour les cas rétrospectifs et réalisées au cours du stage pour le cas prospectif.
- **Blocs de paraffine** : correspondant aux prélèvements de biopsie prostatique ou de prostatectomie.
- **Anticorps anti-ERG (Clone EP111)** : L'anticorps ERG est destiné à une utilisation en immunohistochimie. Cet anticorps est utile pour l'identification de l'adénocarcinome de la prostate, L'anticorps utilisé est conditionné sous forme concentré produit par la firme ZETA-CORP (**Tableau I**), les résultats des tests de l'expression de ce marqueur sur tissu sain ou tumoral sont rapportés dans les **Annexes 2 et 3**.
- D'autres matériels non biologiques utilisés sont rapportés dans **Annexe 4**.

Tableau I : Caractéristiques de l'anticorps anti-ERG.

Anticorps primaire	Dilution	Clonalité	Localisation	Ig Class	Référence industrielle
Anti-ERG	1/20	monoclonal	Nucléaire	Rabbit IgG	ZETA-CORP, ERG (Clone EP111, pareil à EPR3864)

II.5 - Méthodes

II.5.1 - Réception des prélèvements

Les prélèvements sont acheminés vers le laboratoire d'Anatomie Pathologique par le service d'Urologie, ils sont enregistrés et reçoivent un numéro d'identification propre. Celui-ci sera retranscrit sur les blocs et les lames et apposé sur les fiches de renseignements.

Les pièces de résection reçues sont contenues dans des récipients remplis de liquide fixateur, la fixation se fait dans du formol à 10 %. La quantité de formol doit représenter 5 fois le volume de la pièce afin que les biopsies ou les pièces opératoires soient bien immergées dans le liquide formolé pour une fixation la plus optimale possible. La fixation est destinée à immobiliser les structures cellulaires et tissulaires, dans un état aussi proche que possible de leur état vivant. Elle doit se faire immédiatement après le prélèvement, La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 5 à 6 heures pour une biopsie et entre 24 à 48 heures pour une pièce opératoire.

II.5.2 - Etude macroscopique

- La procédure en cas de prélèvement de prostatectomie radicale se fait selon les étapes suivantes :

- a) Orientation de la pièce :
 - les vésicules séminales sont en haut et en arrière
 - l'apex pointu est dirigé vers le bas.
 - le col vésical est situé en avant de la base, et comporte un aspect cruenté lié aux fibres musculaire lisses vésicales de gros calibre.
 - la face postérieure est plane avec un léger méplat au centre.
 - Repérage du trajet de la base vers l'apex.
- b) Pesée de la pièce après ablation des vésicules séminales pour apprécier le volume tumoral
- c) Extirpation délicate des clips et agrafes, de préférence à l'état frais, pour éviter de fausses marges positives.
- d) Mesure des 3 dimensions de la prostate : hauteur (de l'apex à la base des vésicules séminales), diamètre transversal et diamètre antéro-postérieur.
- e) La pièce opératoire doit être ensuite badigeonnée d'encre indélébile sur toute sa surface. L'encre indélébile utilisée est l'encre de Chine du commerce de couleur noire qui sert à marquer les limites d'exérèse pour évaluer l'infiltration tumorale.
- f) La pièce est ensuite tranchée selon le protocole de Standford (**Annexe 6**).

- Les fragments de petite taille et les biopsies sont prélevés et déposés directement dans des cassettes en plastique.

II.5.3 – Imprégnation et inclusion

L'inclusion a pour but de permettre la réalisation de coupes fines et régulières. Le milieu d'inclusion le plus utilisé est la paraffine. Comme la paraffine est hydrophobe, le prélèvement doit d'abord subir une déshydratation dans un automate à inclusion. Cet appareil contient 12 bains (**Annexe 4**). Dans une température ambiante, chaque échantillon devra passer 1 heure dans chaque bain. L'opération prend 12 h. Les prélèvements sont immergés dans des bains d'alcool de degré croissant puis l'alcool est éliminé par des solvants (xylène), puis par de la paraffine liquide à 56 °C qui imprègne les tissus. Ceux-ci sont ensuite refroidis. Cette étape a pour objectif de remplacer l'eau contenue dans les tissus par de la paraffine. L'étape finale de l'inclusion est manuelle réalisée à l'aide d'un appareil d'inclusion à la paraffine et consiste à orienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe dans un moule de

paraffine (**Annexe 8**). Après refroidissement, on se trouve en présence d'un bloc de paraffine, dur, à l'intérieur duquel la pièce prélevée est incluse.

II.5.4 - Coupes et colorations

Le bloc de paraffine est découpé en tranches fines à l'aide de microtome (**Annexe 9**) qui est un appareil qui permet de débiter les blocs de paraffines en rubans. La découpe est généralement améliorée lorsque l'échantillon et la paraffine présentent une dureté comparable. C'est la raison pour laquelle les blocs de paraffine doivent être froids pour la réalisation des coupes. Les blocs solides de paraffine contenant le tissu sont placés sur une plaque froide (**Annexe 7**) ou une surface froide humide pendant quelques minutes. Ils sont ensuite coupés en rubans de 3 à 5 microns d'épaisseur ; cette épaisseur sert à obtenir des coupes fines pour une analyse morphologique optimale. Les rubans sont ensuite étalés sur des lames en verre. On met les lames dans l'étuve à une température de 90C° pendant 1h, pour les déparaffiner. Ensuite on les place dans un portoir, émergé dans le xylène pendant 1 à 2 minutes. Les lames sont ensuite réhydratées dans des bains d'alcools à degré décroissant. Les objets biologiques coupés ne sont pas ou peu colorés : ils offrent très peu de contraste, donc de visibilité, et aucun détail ne peut être perçu. Il faut renforcer le contraste de couleur des différents organites en les colorants. Les lames de verre sont alors plongées dans des colorants. La coloration utilisée est un colorant basique nucléaire (hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine) (le protocole de coloration des lames est rapporté dans **Annexe 5**).

II.5.4 - Montage

Les coupes colorées sont montées entre lame et lamelle avec une résine synthétique (Eukitt) dont l'indice de réfraction est voisin de celui du verre.

- Application de 2 gouttes d'Eukitt sur l'échantillon.
- Inclinaison de la lamelle qu'on dépose sur la lame.
- Disposition de la lame montée sur une plaque chauffante pour le séchage.

On dispose alors d'une lame prête à être analysée au microscope optique. Les résultats sont ensuite consignés sous forme d'un compte rendu écrit (description et interprétation des lésions, diagnostic).

II.6 – Immunohistochimie

L'examen immuno-histochimique (IHC) consiste à révéler sur coupe histologique, par réaction antigène-anticorps, la présence de récepteurs antigéniques cellulaires intranucléaires, membranaires ou cytoplasmiques.

II.6.1 - Procédure de la technique d'IHC

II.6.1.1 - Confection des lames

Des coupes de 3 µm sont réalisées sur les blocs d'inclusion en paraffine des patients. Elles sont ensuite étalées sur des lames silanisées (on utilise les lames silanisées pour éviter que les prélèvements ne se décollent lors du démasquage) puis séchées dans une étuve à 57°C pendant une nuit.

II.6.1.2 - Déparaffinage

- Déparaffiner les lames dans 5 bains de xylène de 5 minutes chacun.
- Laver la section dans des bains d'alcool benzylique à 96°, 80° et 70° pendant 5 minutes chacun afin de réhydrater les tissus.
- Rincer à l'eau distillée.
- Bloquer les peroxydases endogènes pour inhiber leur réaction enzymatique en incubant le tissu dans du peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 3% pendant 10 min.
- Rincer à l'eau distillée.

II.6.1.3 - Démasquage

Le démasquage permet de démasquer des épitopes antigéniques cachés ou pliés par ouverture des protéines ce qui augmente considérablement le nombre d'anticorps utilisables sur coupes en paraffine.

- Immersion des lames dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0, et incubation à 95°C dans un bain-marie pendant 1 heure.
- Mise des lames à température ambiante et les laisser refroidir dans du tampon Tris-EDTA buffer, pH 9.0 pendant 15 min.
- Rinçage à l'eau distillée.
- Elimination de l'excès du liquide autour du tissu avec de la gaze et disposition des lames sur un plateau en milieu humide.

II.6.1.4 - Dépôt de l'anticorps sur la lame

- Délimitation de la zone de dépôt de l'anticorps à l'aide d'un marqueur hydrophobe.
- Application du peroxyde d'hydrogène pendant 10 minutes dans la zone encerclée.
- Rinçage des lames dans une solution tampon PBS (phosphate buffered saline) pendant 5 min. Ce tampon sert à rincer les cellules lorsqu'il faut enlever toute trace de milieu avant de les traiter.
- Elimination de l'excès du liquide sur les lames.

- Application sur le tissu de l'anticorps primaire dilué à l'aide d'une micropipette de 200ml jusqu'au recouvrir toute la zone à traiter. La dilution recommandée pour l'anticorps Monoclonal Rabbit Anti-Human ERG, Clone EP111, est de 1/20. Dilution réalisée dans le diluant Zeta-Corp.
- Entreposage des lames dans une chambre humide pendant 40 Min.
- Rinçage avec deux bains de PBS, 5 minutes chacun.
- Application de l'anticorps secondaire et laisser dans chambre humide 20min.
- Lavage 2 fois pendant 5 minutes dans une solution PBS.
- Application de l'Ac amplificateur Rabbit laissé pendant 20 min.
- Lavage 2 fois pendant 5 minutes dans une solution PBS.

II.6.1.5 - Révélation

- Ajout du chromogène DAB (Diaminobenzidine) à laisser agir pendant 10 minutes ; lors de l'oxydation, le DAB forme un produit final marron sur le site de l'antigène cible.
- Rinçage à l'eau distillée. Puis lavage PBS pendant 5min.
- Coloration à l'hématoxyline de Meyer pendant 5 minutes.
- Lavage à l'eau pendant 10 minutes.
- Réhydratation du tissu dans 2 bains d'alcool benzylique à 96% pendant 5 minutes chacun.
- Lavage du tissu dans 2 bains de xylène pendant 2 minutes chacun.
- Montage en utilisant l'Eukitt.
- Observation au microscope optique des lames confectionnées.

II.6.2 - Evaluation de l'immunomarquage

Le marquage attendu est de localisation nucléaire de couleur brunâtre, avec présence de témoins internes positifs au niveau des cellules endothéliales et des cellules lymphocytaires. Le test est considéré comme positif si le marquage est focal ou diffus, quelle que soit l'intensité.

II.7. Méthode d'analyse statistique des données

La comparaison des groupes avec variables catégorielles a été réalisée par le test exact de Fisher. Ce test est une alternative au test de Chi-deux lorsque les échantillons sont petits.

Une différence était retenue comme significative pour une valeur de $p < 0,05$.

L'ensemble des calculs statistiques a été effectué à l'aide du logiciel Office EXCEL 2013.



Chapitre III

Résultats et discussion

III.1 - Critères sociodémographiques

Dans notre étude nous avons pris en compte 30 patients de sexe masculin présentant des lésions HGPIN.

III.1.1 - Age

L'âge moyen de nos patients est de 67 ans avec un écart type de $\pm 6,66$ ans, et une médiane de 65,5 ans. La tranche d'âge la plus représentée est celle des 60 - 65 ans avec 8 cas enregistrés soit 26% de nos patients, les classes 65-70, 70-75 et 75-80 comptent 20% chacune soit 6 patients par classe, la classe des 55-60 est la moins présente avec 13% des cas.

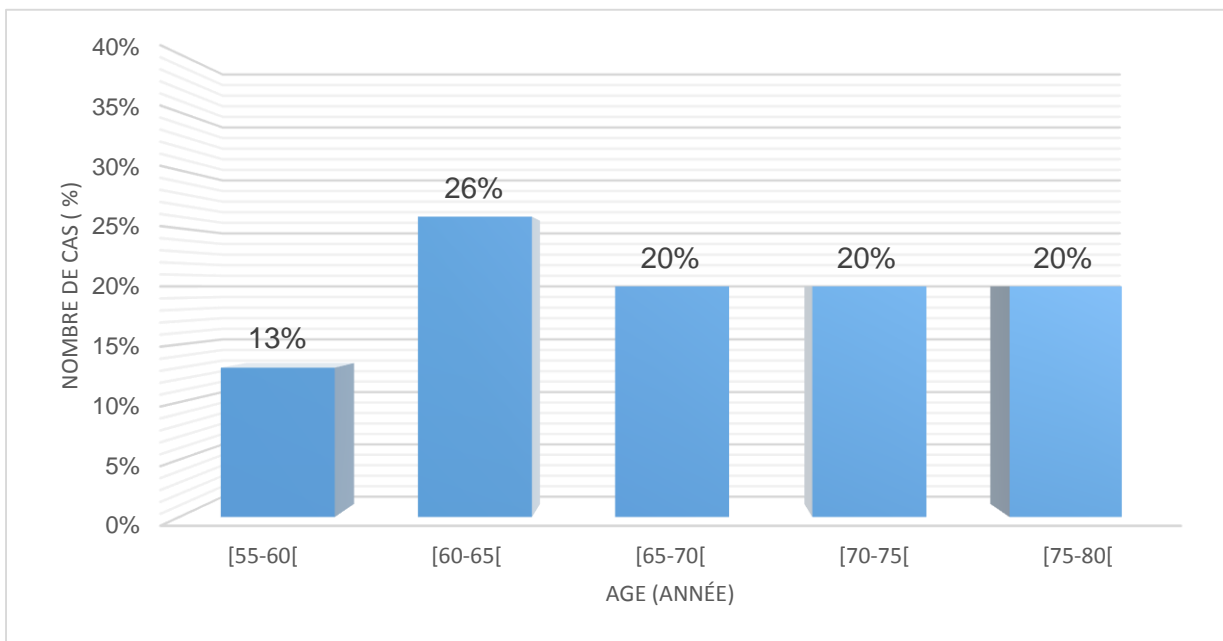


Figure 11 : Répartition des patients en fonction de la tranche d'âge

III.1.2 - Nature du prélèvement

On retrouve deux types de prélèvements prostatiques étudiés dans notre population : les biopsies prostatiques qui représentent les deux tiers des échantillons (67% soit 20/30), et les pièces de prostatectomie radicale ou partielle qui représentent le tiers restant (33% soit 10/30).

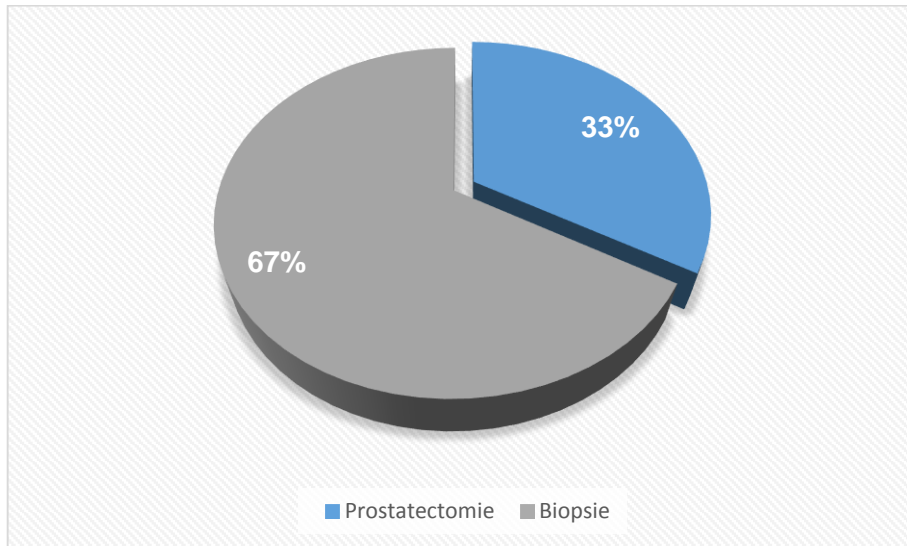


Figure 12 : Répartition des patients selon la nature du prélèvement.

III.2 - Résultats microscopiques

III.2.1 Aspect macroscopique

La majorité de nos patients sont diagnostiqués avec un adénocarcinome prostatique, 90 % (27/30) de la population présentent des lésions HGPIN associées à un adénocarcinome prostatique (ADK), les 10% restant ne présentent que des lésions isolées de HGPIN.

Tableau II : Répartition des patients selon l'aspect macroscopique

Type histologique	Nombre de cas	Pourcentage (%)
HGPIN associée	27	90
HGPIN isolée	3	10

III.2.2 - Caractéristique selon le score de Gleason :

20% de nos patients ont un score de Gleason inférieur ou égal à 6, 63% avec score de Gleason 7 parmi eux 47% avec un score de 7 (3+4), 17% avec un score de 7 (4+3) et 7% avec un score ≥ 8 .

Tableau III : Répartition des patients selon le score de Gleason

Score de Gleason	Nombre de cas	Pourcentage (%)
≤ 6	6	20
7	19	63
7 (3+4)	14	47
7 (4+3)	5	17
≥8	2	7

III.2.2 - Résultat immunohistochimique de l'expression de ERG

L'expression du marqueur ERG dans les foyers HGPIN est positive dans 33% (10/30) des cas, sur les deux tiers restants (67%, 20/30) le marquage est négatif sans expression de l'oncogène ERG (Voir figure 14 p.25).

Tableau IV : Résultats de l'expression de ERG

Expression ERG	Positive	Négative
Nombre de cas	10	20
Pourcentage (%)	33	67

Dans les cas positifs, l'expression est d'une positivité focale intense dans 9/10 cas contre 1 cas d'intensité modérée.

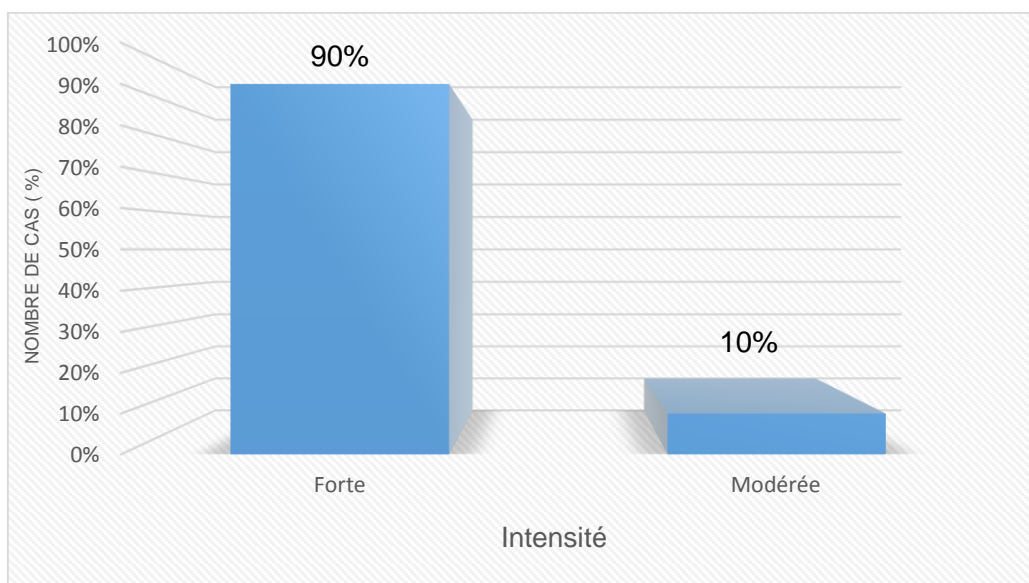


Figure 13 : Répartition selon l'intensité de l'expression.

Les observations au microscope révèlent les images suivantes :

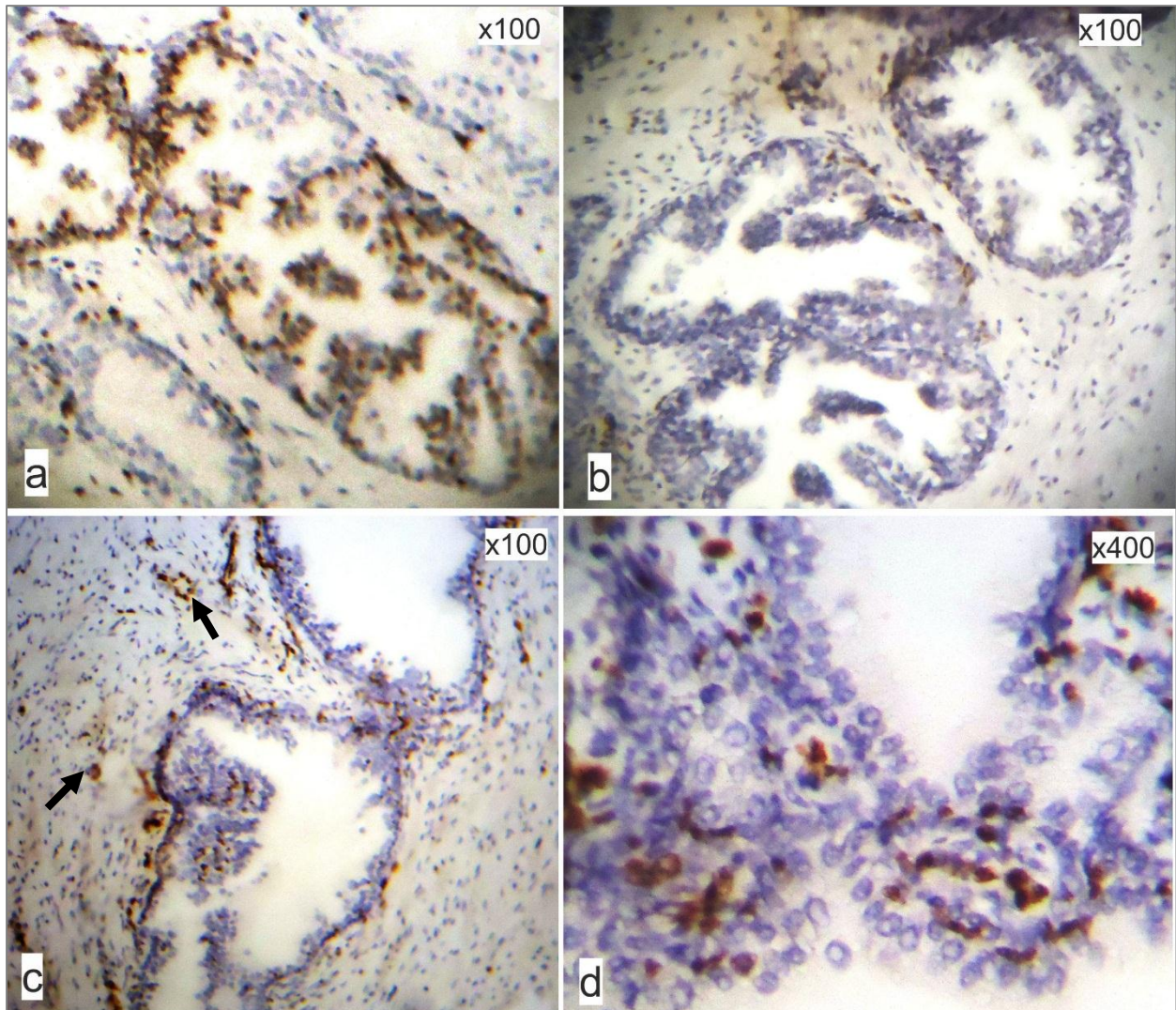


Figure 14 - Expression de ERG en immunohistochimie : **a** : Foyer HGPIN avec expression positive de ERG (couleur brunâtre) ; **b** : Foyer HGPIN avec expression négative de ERG ; **c** : expression positive de quelques cellules avec présence de témoin interne (flèche noire) ; **d** : expression nucléaire de ERG.

III.2.3 - Expression de ERG en fonction de l'aspect macroscopique

L'expression de ERG chez les patients présentant des lésions HGPIIN associé au ADK était positive dans 33% (9/27) contre 67% (18/27) de cas négatifs, Pour les patients qui présentent des lésions de HGPIIN isolée on a noté un seul cas positif (33%) contre 2 (67%) cas négatifs.

Tableau V : Résultats de l'expression de ERG selon l'aspect macroscopique

Type histologique	Erg Positive		Erg Négative	
	n	%	n	%
HGPIIN associée (n = 27)	9	33	18	67
HGPIIN Isolée (n = 3)	1	33	2	67

III.2.4 - Expression de ERG en fonction du score de Gleason

La corrélation entre l'expression de l'ERG dans les foyers HGPIIN et le score de Gleason a révélé que chez les patients avec un Gleason ≤ 6 , l'ERG est exprimé dans 50% (n=3/6) des cas, lorsque le score est de 7(3+4) le résultat est positif dans 29% (n=4/14) des cas, avec un score de 7(4+3) on observe un résultat positif dans 40% (n=2/5) des cas, pour le score ≥ 8 il n'y a pas eu d'expression de ERG dans les 2 cas étudiés.

On constate aussi que la p-value (0,70) est supérieur au seuil de significativité (0,05) cet analyse nous indique donc que le résultat est statistiquement non significatif.

Tableau VII : Résultats de l'expression de ERG selon le score Gleason

Score de Gleason	Erg Positive		Erg Négative		P-value
	n	%	n	%	
≤ 6 (n=6)	3	50	3	50	0,70
7 (3+4) (n=14)	4	29	10	71	
7 (4+3) (n=5)	2	40	3	60	
≥ 8 (n=2)	0	0	2	100	

III.3.Discussion

Notre étude a porté sur les tissus prostatiques de 30 patients présentant des lésions HGPIN, l'âge moyen était de $67 \pm 6,66$ ans, cet âge est proche de celui de l'étude menée en Egypte par Abdel-Khalek et al. (2004) qui était de $64,8 \pm 7,8$ ans, la moyenne d'âge était aussi élevée sur une étude chinoise de He et al. (2012), avec une moyenne de 63 ans, ces études semblent indiquer qu'un âge avancé constitue un facteur de risque d'atteinte de HGPIN.

Concernant la nature du prélèvement, nous avons retrouvé que 67% des prélèvements effectués sont des biopsies prostatiques, contre 33% de prostatectomies radicales ou partielles ces chiffres sont proches de l'étude de Ananthanarayanan et al. (2004) où les taux étaient de 71% de biopsie prostatique, 19% de Prostatectomie et 10% de cystoprostatectomies.

Dans notre cohorte le score de Gleason 7 était majoritaire avec 63% (19/30) des cas, le score ≤ 6 était observé avec 20% et ≥ 8 avec 7% dans des études similaires de Teng et al. (2013), le score de Gleason 7 était présent dans 54% des cas, 32% avec un score ≤ 6 et 12% pour les scores ≥ 8 .

HGPIN et Gène fusion ERG-TMPRSS2

En cas de diagnostic de lésions HGPIN sur des prélèvements prostatiques lors d'une première série de biopsies, de nouvelles biopsies doivent être effectuées non seulement sur le siège des anomalies mais aussi à distance dans les différents quadrants de la glande où peut être détecté un cancer de la prostate (**Fournier et al., 2004**). Les biopsies prostatiques sont des examens contraignants pour les patients et peuvent présenter des complications post-biopsie qui sont essentiellement d'ordre infectieux et hémorragiques (**Sibert, 2009**)

Des données récentes ont révélé que la probabilité de diagnostiquer un adénocarcinome après diagnostic initial de HGPIN isolée sur des biopsies d'aiguille est plus faible que précédemment rapporté.

En outre, Il existe peu de bio-marqueurs cliniquement utilisés pour prédire le risque d'évolution de ces lésions, ce qui rend la gestion clinique des patients atteints de HGPIN isolée problématique. Par conséquent, l'étude des HGPIN au niveau moléculaire semble être nécessaire pour aider à évaluer et à stratifier ce risque (**Mosquera et al., 2008**).

Jusqu'à présent, les gènes de fusion étaient considérés comme des événements rares dans les tumeurs épithéliales qui se caractérisent habituellement par des altérations chromosomiques complexes, non spécifiques. La mise en évidence récente de gènes de fusion TMPRSS2—ETS dans une majorité des cancers de la prostate représente une véritable révolution dans la connaissance biologique de ces tumeurs.

Les méthodes de détection initiales s'appuyaient sur la PCR et la FISH. Depuis 2010, le développement de deux anticorps anti-ERG, a rendu possible une détection plus facile de

l'expression de ERG. Cette expression a été fortement corrélée, par de nombreuses études, à la présence du réarrangement TMPRSS2-ERG dans le cancer de la prostate. Ce réarrangement est très spécifique de ce cancer (**Taris, 2013**). Dans notre étude, nous avons pratiqué la technique d'immunohistochimie en utilisant l'anticorps anti-ERG.

Cerveira et al. ont montré les premiers que des gènes de fusion TMPRSS2—ERG pouvaient être présents dans des PIN de haut grade (4/19, soit 21 %). Dans notre étude l'expression de la protéine codant pour le gène de fusion a été retrouvée dans 33% (1/3) des cas HGPIN non associé au cancer. La présence de ces réarrangements moléculaires est en faveur d'une apparition précoce de l'anomalie. D'autres auteurs ont confirmé la présence de l'expression du gène fusion dans 16 % des 143 PIN de haut grade analysés (**Beuzeboca et al., 2009**).

Prévalence d'expression de ERG

Dans notre cohorte, l'expression de ERG était positive chez 33% (10/30) de nos patients, tous stades d'évolution confondus. On ne retrouvait aucune expression dans le tissu prostatique non tumoral, où l'on notait bien les témoins positifs internes au niveau des cellules endothéliales et des lymphocytes, comme décrit par Park et al. ; et qui sont bien connus par les anatomo-pathologistes qui peuvent ainsi témoigner d'une technique d'IHC correcte.

Nous avons observé une prévalence similaire par rapport aux études précédentes, récemment l'étude de Gao et al. qui rapporte que le gène de fusion était exprimé chez 59 patients (36%) sur 162 cas étudiés. Sur une autre étude de Lee et al. (2014) ERG était exprimé dans 27% des foyers HGPIN parmi les 119 étudiés.

L'intensité de l'expression de ERG dans les résultats positifs était intense dans 90% des cas ; ce résultat est similaire à celui de l'étude de Park et al. (2014) qui ont retrouvé une forte intensité d'expression dans 96% des cas.

Expression de ERG et corrélation avec le score de Gleason

L'expression de ERG dans les foyers de HGPIN chez les patients avec un score de Gleason 7 était de 29% pour le score 3+4 et de 40% pour le score 4+3, et de 50 % pour les scores de Gleason inférieur ou égal à 6 (3/6) et pas d'expression pour les scores supérieurs à 8. La relation entre l'expression de ERG dans les foyers HGPIN et le score de Gleason était non significative ($p=0.7$). Ces chiffres semblent aller dans le même sens que l'étude de Teng et al (2013) où ils n'ont pas retrouvé de corrélation ($p=0.521$) entre ERG exprimé dans HGPIN et le score de Gleason.

Les résultats sont parfois contradictoires d'une étude à l'autre, certaines retrouvent une association entre l'expression de ERG ou la présence du réarrangement TMPRSS2-ERG, et les paramètres clinico-pathologiques comme le stade TNM et le score de Gleason. Lorsqu'une telle association est retrouvée, ERG est plutôt associé à un stade TNM et un score de Gleason

élevés, ce qui n'a pas été le cas dans nos cas de score supérieur ou égal à 8 (absence d'expression de ERG)

ERG : MARQUEUR PRONOSTIQUE ?

Plusieurs auteurs se sont intéressés à la signification pronostique de la présence de gènes de fusion. Une étude sur un collectif de patients avec cancer de prostate non traité (attitude d'observation – watchful waiting) indique cependant que les cancers TMPRSS2ERG sont effectivement caractérisés par une évolution clinique plus agressive que les tumeurs TMPRSS2ERG négatives (**Kirsten et al., 2010**).

Sur une cohorte de 111 patients, Demichelis et al. ont rapporté une corrélation entre la présence d'altération génomique d'ERG et la survie spécifique.

En 2008, Attard et al. ont montré que la perte de la séquence 5'- ERG associée à la duplication des gènes de fusion TMPRSS2—ERG était un facteur péjoratif de survie, indépendant du score de Gleason et du taux des PSA.

Selon Park et al. l'expression ERG dans HGPIN est associée au développement du cancer de la prostate. Un biomarqueur comme ERG prédit le risque invasif du cancer ce qui peut aider à la stratification du risque, en limitant les biopsies de la prostate en cas de résultat ERG négatif, et un suivi rapproché des patients avec ERG positif.

Ces lésions PIN TMPRSS2ERG positives semblent constituer de vrais précurseurs des cancers invasifs. Il paraît donc intéressant de déterminer plus particulièrement le statut fusionnel dans les cas où les biopsies de la prostate montrent des PIN de haut grade et/ou des glandes prostatiques atypiques.

Dans les PIN isolés, la détermination du statut fusionnel pourrait cependant aussi être utile dans les cas où un cancer invasif de la prostate aurait été manqué lors des biopsies. La présence dans ces cas d'une fusion TMPRSS2ERG ouvre de nouvelles possibilités thérapeutiques.

Cependant d'autres publications, plus récentes, ne semblent pas corroborer ces résultats. L'étude de He et al. sur l'expression de ERG dans des biopsies prostatiques présentant des lésions de HGPIN sans cancer initial, ne retrouvait pas d'association entre l'expression de ERG et la transformation des lésions de HGPIN en adénocarcinome invasif sur les biopsies de surveillance. L'initiation et la progression du cancer de prostate pourraient être provoquées par la coopération entre le réarrangement TMPRSS2-ERG et d'autres anomalies moléculaires, comme la perte de PTEN par exemple. Les délétions de PTEN seraient associées de façon significative avec la présence de réarrangements TMPRSS2-ERG. L'association de ces deux anomalies moléculaires favoriserait peut être la transformation des lésions de HGPIN en adénocarcinome invasif (**Taris, 2013**). Et pourrait expliquer ces résultats contradictoires.

Vu la complexité liée à la présence de différentes variantes et le nombre réduit des échantillons étudiés, on ne peut pour l'instant pas répondre à la question de savoir si les fusions géniques ETS ont une valeur pronostique permettant une stratification des patients en groupes de traitement.

Ces données, si elles étaient validées par de larges études, montreraient que la détection de la présence de ces gènes de fusion pourrait avoir dans le futur des implications diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques (**Molinie, 2008 ; Kirsten, 2010**).

| Conclusion |

Notre étude a consisté à évaluer l'expression et l'utilité du marquage immunohistochimique de l'anticorps anti-ERG dans les lésions HGPIN.

L'évaluation de l'expression de ERG a été réalisée par étude immunohistochimique sur des blocs de paraffines contenant des prélèvements de biopsie prostatique dans 20/30 cas et des prostatectomies dans 10/30 cas.

Les résultats de notre étude ont révélé que l'expression du marqueur ERG dans les foyers HGPIN est positive dans 33% (10/30) des cas, et négative dans 67% (20/30). La corrélation entre la présence de ERG et le score de Gleason est non significative.

L'expression de la protéine ERG, produit du gène fusion TMPRSS2-ERG dans les foyers HGPIN est en faveur de l'apparition précoce de l'anomalie. La présence de ces gènes de fusion entraîne, lors d'une stimulation androgénique physiologique, une surexpression de gènes impliqués dans la croissance et la différenciation cellulaires. Concomitamment, l'altération de nombreuses voies de signalisation (facteurs de croissances, voies Wnt- β -caténine, PI3K-Akt) est responsable de l'apparition d'un phénotype tumoral agressif.

Des sous-types moléculaires distincts pourraient définir des populations à risque de progression différente. Plusieurs autres études ont évalué la signification pronostique de l'existence de gènes de fusion avec des résultats contradictoires et peu interprétables du fait de la taille limitée des effectifs.

La variabilité d'une étude à l'autre de l'impact pronostique de la présence du réarrangement ne permet pas, dans l'état actuel des choses, de retenir le réarrangement TMPRSS2-ERG comme un élément qui permettrait de différencier les cancers de prostate indolents des cancers agressifs.

La compréhension de l'implication des gènes de fusion et de ERG dans le cancer de la prostate nécessitera, entre autres, l'analyse des interactions entre ERG et ses potentiels partenaires, et la détermination plus précise des gènes cibles.

Cette étude doit être poursuivie et élargie sur un nombre plus important de témoins et de malades afin d'être validée statistiquement.

References bibliographique

Références bibliographique

- **Abdel-khalek, M., El-Baz, M., Ibrahiem, E.H.** (2004): Predictors of prostate cancer on extended biopsy in patients with high-grade prostatic intraepithelial neoplasia: a multivariate analysis model . Urology and Nephrology Center, Mansoura University, Mansoura, Egypt, B JUINTERNATIONAL, 94, 5 2 8 – 5 3 3, doi:10.1111/j.1464-410X.2004.04996.x.
- **Ahouandjinou, T.V.** (2008). Facteurs nutritionnels associés à la présence de lésions précancéreuses de la prostate (pin) chez des hommes ayant une hypertrophie bénigne de la prostate thèse faculté des études supérieures. Faculté de médecine. Université Laval. Québec. 113 p.
- **Ananthanarayanan, V., Deaton, J., Yang, X., Pins, M., Gann, P.** (2005) Alpha-Methylacyl-CoARacemase (AMACR) Expression in Normal Prostatic Glands and High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia (HGPIN): Association With Diagnosis of Prostate Cancer. Wiley-Liss, Inc., The Prostate 63:341-346
- **Attard, G., Clark, J., Ambroisine, L., Fisher, G., Kovacs, G., Flohr, P.** (2008) Duplication of the fusion of TMPRSS2 to ERG sequences identifies fatal human prostate cancer. Oncogene;27: 253—63.
- **Bastien, L., Fourcade, RO., Makhoul, B., Meria, P., Desgrandchamps F.** (2011). Hyperplasie bénigne de la prostate. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Urologie, 18-550-A-10.
- **Berger, N.** (2004). Le diagnostic de l'adénocarcinome prostatique et de la néoplasie intra épithéliale prostatique (PIN) sur ponction biopsie prostatique. Ann Pathol.; Service d'Anatomie Pathologique, Centre Hospitalier Lyon Sud, Pierre Bénite. 24 : 1S96- 1S10.
- **Beuzeboc, P., Soulié, M., Richaud, P., Salomon, L., Staerman, F., Peyromauref, M., Mongiat-Artusg, P., Cornud, F., Papareli, P., Davin, J.L., Moliniéa, V.** (2009). Gènes de fusion et cancer de la prostate. De la découverte à la valeur pronostique et aux perspectives thérapeutiques. Progrès en urologie 19, 819—824.
- **Beuzeboca, P., Souliéb, M., Richaud, P.** (2009). Gènes de fusion et cancer de la prostate. De la découverte à la valeur pronostique et aux perspectives thérapeutiques, Progrès en Urologie, Volume 19, Issue 11, December 2009, Pages 819—824
- **Blanchard, Y., Bernard, R.,** (1997). Le mode d'action des androgènes et la 5α-réductase. médecine/sciences n° 4, vol. 13,
- **Bostwick DG.** (1995). High grade prostatic intraepithelial neoplasia. The most likely precursor of prostate cancer. Cancer; 75(7):1823-1836.
- **Bostwick, D.G., Brawer, M.K.** (1987). Prostatic intra-epithelial neoplasia and early invasion in prostate. Cancer. 59:788-794.
- **Bostwick, DG.** (1996). Prospective origins of prostate carcinoma. Prostatic intraepithelial neoplasia and atypical adenomatous hyperplasia. Cancer; 78(2):330-336.

- **Cerveira, N., Ribeiro, F.R., Peixoto, A., Costa, V., Henrique, R., Jeronimo, C.** (2006). TMPRSS2-ERG gene fusion causing ERG overexpression precedes chromosome copy number changes in prostate carcinomas and paired HGPIN lesions. *Neoplasia*; 8(10):826-32.
- **Cornu, J.N., Cussenot, O.** (2011). *Biologie moléculaire de la prostate normale et pathologique*. EMC (Elsevier Masson SAS, Paris), Urologie, 18-500-B-10.
- **Dayon, A.** (2008). Rôle de la sphingosine kinase-1 dans la survie et la progression des cellules tumorales prostatiques Incap vers l'androgéno-indépendance. Thèse doctorat. Physiopathologie. Université Toulouse III.
- **Demichelis, F., Fall, K., Perner, S., Andren, O., Schmidt, F., Setlur, S.R.** (2007) TMPRSS2—ERG gene fusion associated with lethal prostate cancer in a watchful waiting cohort. *Oncogene*;26:4596—9.
- **Eble, J.N., Sauter, G., Epstein, J.I., Sesterhenn, A.** (2004). *Tumours of the urinary system and male genital organs*. Lyon : IARC press.
- **Erdmann, E.** (2007). Etude de la voie de signalisation du récepteur des androgènes dans le cancer de la prostate. Mémoire de l'Ecole Pratique des Hautes Etudes, Université Louis Pasteur, 31p.
- **Fournier, G., Valeri, A., Mangin, P., Cussenot, O.** (2004). Cancer de la prostate. Diagnostic et bilan d'extension. *Annales d'urologie*, 38 207–224, doi: 10.1016/j.anuro.2004.06.003
- **Gao, X, Li, L.Y., Zhou, F.J.** (2012). ERG rearrangement for predicting subsequent cancer diagnosis in high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and lymph node metastasis. *Clin Cancer Res* 18:4163- 4172,
- **Harris, W.P.** (2009). Androgen deprivation therapy: progress in understanding mechanisms of resistance and optimizing androgen depletion. *Nat Clin Pract Urol* doi:10.1038/ncpuro1296.
- **He, H., Osunkoya, A.O., Carver, P., Falzarano, S., Klein, E., Magi-Galluzzi C.** (2012). Expression of ERG protein, a prostate cancer specific marker, in high grade prostatic intraepithelial neoplasia (HGPIN): lack of utility to stratify cancer risks associated with HGPIN. *BJU International.*;110(11b):E751-E755.
- **Kirsten, D. Mertz, Mark, A.** 2010 La fusion génique TMPRSS2-ERG dans le cancer de la prostate Marqueur tumoral de nouvelle génération?. Société suisse de pathologie,
- **Klink, J.C., Miocinovic, R., Galluzzi, C., Klein, E.A.** (2012). High-Grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia. *Korean J Urol*. May;53(5):297-303.
- **Kroiss, A.** (2013). Régulation androgénique du microARN miR-135a et implication dans la progression tumorale prostatique. *Agricultural sciences*. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON.

- **Kufe, DW., Pollock, RE., Weichselbaum, RR.** (2003). Holland-Frei. Cancer Medicine. 6th edition.
- **Lee, S.L., Yu, D., Wang, C., Saba, R.** (2014) ERG Expression in Prostate Needle Biopsy: Potential Diagnostic and Prognostic Implications. Appl Immunohistochem Mol Morphol.
- **Lowsley, OS.** (1915). The prostate gland in old age. Ann Surg; 62:716-37.
- **Lüllmann-Rauch, R.** (2008). Histologie.1^{er} cycle, De Boeck. 704 p.
- **Martin, P-M., Muracciole X., Berenguer, C., Boudouresque, F., Ouafik L'H.** (2008). Évolution de la cellule normale à la cellule cancéreuse prostatique hormonodépendante–hormono-indépendante. Médecine Nucléaire 32.p. 5–23
- **McGarty, T.P.** (2014). ERG, TMPRSS2 and prostate cancer. Draft white paper no110 37p.
- **McNEAL, J.E., BOSTWICK, D.G.** (1986). Intraductal dysplasia: a premalignant lesion of the prostate. Human Pathol, 17: 64-71.
- **McNeal, JE.** (1968). Regional morphology and pathology of the prostate. Am J Clin Pathol;49:347- 57.
- **Mertza, K., Rubinb, M., Cathomas, G.** (2011). La fusion génique TMPRSS2-ERG dans le cancer de la prostate Marqueur tumoral de nouvelle génération?. Société suisse de pathologie, Forum Med Suisse ,11(1–2) :18–19.
- **Molinié, V.** (2004). Foyer Minime, Foyer Suspect et Néoplasies Intra-épithéliales Prostatiques de Haut Grade. Quelles Significations ? Quelles Conséquences ?. Revue QUESTIONS D'ACTUALITES.
- **Molinié, V., Beuzeboc, P., Mahjoub, W.K.** (2008). Biologie moléculaire et cancer de prostate : évolution ou révolution ? Annales de pathologie. 28, 354—362.
- **Montironi, R., Mazzucchelli, R., Lopez-Beltran, A., Cheng, L., Scarpelli, M.** (2007). Mechanisms of Disease: high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and other proposed preneoplastic lesions in the prostate. VOL 4 NO 6 NATURE CLINICAL PRACTICE UROLOGY.
- **Moore, KL., Dalley, AF.** (2001). Anatomie médicale.Aspects fondamentaux et applications cliniques. De Boecks superieur,1177p.
- **Mosquera, J.M., Perner, S., Genega, E.M., Sanda, M., Hofer, M.D., Mertz, K.D.** (2008) Characterisation of TMPRSS2—ERG fusion high-grade prostatic intraepithelial neoplasia and potential clinical implications. Clin Cancer Res; 145(11):3380—5.
- **Organisation Mondiale de la santé OMS.** (2012). International agency for research on cancer, Globocan, Mortality and prevalence in worldwide [en ligne]. Consultée le 20/02/2015. <URL: http://globocan.iarc.fr/Pages/DataSource_and_methods.aspx >
- **Organisation Mondiale de la santé OMS.** (2014). profils des pays pour le cancer [Document en ligne]. Consultée le 20/02/2015. <URL : <http://who.int/countries/dza/fr/>>

- **Park, K., Tomlins, S.A., Mudaliar, K.M., Chiu, Y-L, Esgueva, R., Mehra, R.** (2010). Antibody-based detection of ERG rearrangement-positive prostate cancer. *Neoplasia*.;12(7):590-598.
- **Pignon, J-C.** (2010). Mécanismes d'action des androgènes sur l'expression des récepteurs de la famille du récepteur à l'EGF dans les cellules cancéreuses prostatiques : implication dans l'évolution des tumeurs vers l'hormono-indépendance. Thèse Doctorat en Sciences Biomédicales et Pharmaceutiques. Laboratoire d'Oncologie Moléculaire. Université de Liège
- **Prins, G.S., Putz, O.** (2008). Molecular signaling pathways that regulate prostate gland development. *Differentiation*, 76, 641-59.
- **Réveiller, M.** (2008). Etude du ligand TRAIL et ses récepteurs dans la prostate normale et pathologique reliée au statut hormonal. *Cellular Biology*. Universities Claude Bernard - Lyon I,
- **Roychowdhury, M.** (2012). Prostatic intraepithelial neoplasia (PIN) Low grade PIN. *Pathology outlines*. [en ligne]. Consultée le 29/03/2015. <URL: <http://www.pathologyoutlines.com/topic/prostatelowgradePIN.html>>
- **Sakr, WA.** (1999). Prostatic intraepithelial neoplasia: A marker for high-risk groups and a potential target for chemoprevention. *Eur Urol*; 35:474-8
- **Shen, M.**(2010). Molecular genetics of prostate cancer: new prospects for old challenges. *Genes & Development* : 24, Cold Spring Harbor Laboratory, ISSN 0890-9369/10.
- **Sibert, L.** (2009). Biopsies de prostate l'examen et ses complications Potentielles. *STRATÉGIES CHU de Rouen, MÉDECINE*, DOI : 10.1684/med.2009.0462
- **Taris, M.** (2013). Evaluation de l'expression de ERG dans le cancer de prostate et impact pronostique. Thèse pour le diplôme d'état de docteur en médecine, Université de Poitiers, 76p.
- **Teng, L., Wang, C., Dolph, M., Donnelly, B.,Bismar, T.** (2013) ERG Protein Expression Is of Limited Prognostic Value in Men with Localized Prostate Cancer. *Hindawi Publishing Corporation, ISRN Urology*, Volume, Article ID 786545, 6 p.
- **Viennois, E.** (2011). Impact d'une invalidation de LXR sur la physiologie prostatique : un dialogue avec la signalisation androgénique. *Agricultural sciences*. Université Blaise Pascal -Clermont-Ferrand II,
- **Villers, A., Molinie, V.** (2000). Indication et stratégie de nouvelles biopsies après diagnostic de néoplasie intra-épithéliale prostatique. *Progrès en Urologie* , 10, 1267-1270.
- **Zynger, D.L., Yang, X.J.** (2009). High-grade Prostatic Intraepithelial Neoplasia of the Prostate: The Precursor Lesion of Prostate Cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2, 327-338.

Annexes

Annexe 1

Tableau VII : Caractéristiques des patients de la série

	Année	Age (Ans)	Prélèvement
1	11	57	Prostatectomie
2	11	60	Prostatectomie
3	11	64	Prostatectomie
4	12	64	Biopsie
5	12	65	Prostatectomie
6	12	71	Biopsie
7	12	61	Biopsie
8	13	62	Prostatectomie
9	13	71	Biopsie
10	13	62	Biopsie
11	13	62	Prostatectomie
12	13	57	Biopsie
13	13	73	Biopsie
14	13	76	Biopsie
15	13	56	Biopsie
16	13	77	Prostatectomie
17	13	75	Biopsie
18	13	76	Biopsie
19	13	67	Prostatectomie
20	13	69	Biopsie
21	14	59	Biopsie
22	14	60	Biopsie
23	14	75	Biopsie
24	14	65	Biopsie
25	14	66	Biopsie
26	14	74	Biopsie
27	14	71	Biopsie
28	14	65	Prostatectomie
29	14	71	Prostatectomie
30	15	78	Biopsie

Annexe 2

Tableau VIII : Expression de ERG dans les tissus sains

Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs	Type de tissu (nb. testés)	Éléments tissulaires positifs
Surrénale (3)	3/3 cellules endothéliales (50-80 %), coloration nucléaire 1/3 adipocytes (50 %), coloration nucléaire	Pancréas (3)	3/3 cellules endothéliales (20-80 %), coloration nucléaire 3/3 adipocytes (10-20 %), coloration nucléaire
Moelle osseuse (3)	3/3 cellules de la moelle osseuse (50-60 %), coloration nucléaire	Parathyroïde (3)	3/3 cellules endothéliales (90 %), coloration nucléaire
Sein (3)	3/3 cellules endothéliales (30->90 %), coloration nucléaire 1/3 cellules myoépithéliales (50 %), coloration nucléaire	Hypophyse (3)	3/3 cellules endothéliales (70-80 %), coloration nucléaire
Cervelet (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire	Prostate (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 1/3 lymphocytes (30 %), coloration nucléaire
Cerveau (3)	3/3 cellules endothéliales (70-80 %), coloration nucléaire	Glande salivaire (3)	3/3 cellules endothéliales (90-100 %), coloration nucléaire 1/3 lymphocytes (100 %), coloration nucléaire 1/3 fibroblastes (30 %), coloration nucléaire
Col de l'utérus (3)	3/3 cellules endothéliales (>90 %), coloration nucléaire	Peau (3)	3/3 cellules endothéliales (40-70 %), coloration nucléaire 1/3 lymphocytes (50 %), coloration nucléaire
Côlon (2)	2/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 2/3 lymphocytes (30-50 %), coloration nucléaire 1/2 cellules du muscle lisse (5 %), coloration nucléaire	Intestin grêle (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 3/3 lymphocytes (80 %), coloration nucléaire
Œsophage (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 2/3 lymphocytes (70 %), coloration nucléaire	Rate (2)	2/2 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 2/2 lymphocytes (60 %), coloration nucléaire
Rein (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire	Estomac (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 2/3 lymphocytes (10-60 %), coloration nucléaire
Foie (3)	3/3 cellules endothéliales (10-80 %), coloration nucléaire 1/3 lymphocytes (50 %), coloration nucléaire 1/3 cellules de Kupfer (30 %), coloration nucléaire	Testicule (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire
Poumon (3)	3/3 cellules endothéliales (90 %), coloration nucléaire 3/3 pneumocytes (50-80 %), coloration nucléaire 2/3 lymphocytes (50 %), coloration nucléaire	Thymus (3)	3/3 cellules endothéliales (>90 %), coloration nucléaire 3/3 Lymphocytes (50->90 %), coloration nucléaire
Mésothélium (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire	Thyroïde (3)	3/3 cellules endothéliales (10-80 %), coloration nucléaire
Muscle, cardiaque (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 3/3 cellules cardiaques (40 %), coloration nucléaire	Amygdale (3)	3/3 cellules endothéliales (90 %), coloration nucléaire 3/3 lymphocytes (30-90 %), coloration nucléaire
Muscle, squelettique (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire	Utérus (3)	3/3 cellules endothéliales (>90 %), coloration nucléaire
Nerf périphérique (3)	3/3 cellules endothéliales (80 %), coloration nucléaire 1/3 adipocytes (25 %), coloration nucléaire 1/3 cellules du muscle lisse (20 %), coloration nucléaire		
Ovaire (3)	3/3 cellules endothéliales (>90 %), coloration nucléaire		

Annexe 3

Tableau IX : Expression de ERG dans le tissu Tumorale :

Tissus tumoraux	L'anticorps a marqué
Adénocarcinome de la prostate	10/28 (35,7 %)
Néoplasie intra-épithéliale prostatique	1/3 (33,3 %)
Carcinome endométrioïde ovarien	1/1 (100 %)
Tumeur stromale gastro-intestinale	1/1 (100 %)
Lymphome de Hodgkin	2/2 (100 %)
Lymphome à lymphocytes B	1/1 (100 %)
Lymphome du manteau	1/1 (100 %)
Lymphome différencié à grands cellules B	2/2 (100 %)
Lymphome anaplasique à Lymphocytes T	1/1 (100 %)

Annexe 4

- Matériels non biologiques :

Pour la macroscopie :

Matériel	Produits
Les cassettes Les couteaux Les ciseaux Le bistouri Les pinces Le mètre a ruban Le panier	Acétone Alcool Paraffine Xylène Formol

Pour l'histologie :

Matériel	Produits
Moule Groupe Thermoélectrique (TGE) Microtome Bain Marie Lames et lamelles Etuve	Paraffine Xylène Papier Buvard

Pour l'immunohistochimie :

Matériel	Produits
Lames et lamelles Récipients Bain Marie	Xylène Alcool 100° Eau distillé Eau oxygénée PBS La Biotine Streptavidine Coloration « Hématoxyline de Mayer » Ammoniac

Tableau X : constituants des bains de l'automate a inclusion

Numéro du Bain	Produit contenu
1	Formol
2	Alcool 75°
3	Alcool 95°
4	Alcool 100°
5	Acétone résidu ou évaporation = 0,001%
6	Acétone résidu ou évaporation = 0,001%
7	Acétone résidu ou évaporation = 0,001%
8	Xylène
9	Xylène
10	Xylène
11	Paraffine
12	Paraffine

Annexe 5

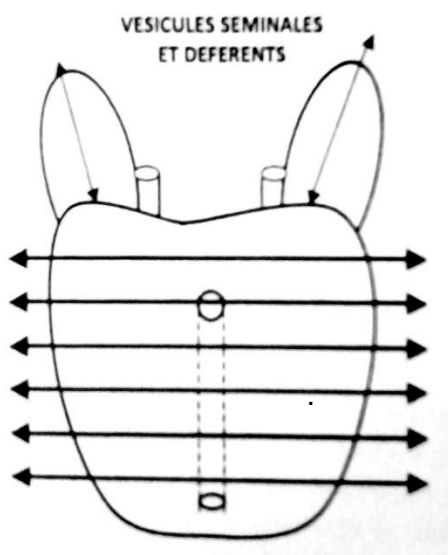
Tableau XI : Protocole de coloration usuelle de routine « Hématoxyline Eosine » :

NUMERO DU BAIN	PRODUITS	TEMPS
1	Toluène ou xylène	2 minutes
2	Alcool 100°	2 minutes
3	Alcool 95°	2 minutes
4	Alcool 75°	2 minutes
5	Eau	10 secondes
6	Hématoxyline Harris	5 minutes
7	Eau	10 secondes
8	Acide chlorhydrique	8 secondes
9	Carbonate de Lithium	10 secondes
10	Eau	10 secondes
11	Alcool 95°	1 minute
12	Eosine	10 secondes
13	Alcool 100°	2 minutes
14	Alcool 100°	2 minutes
15	Xylène ou toluène	2 minutes

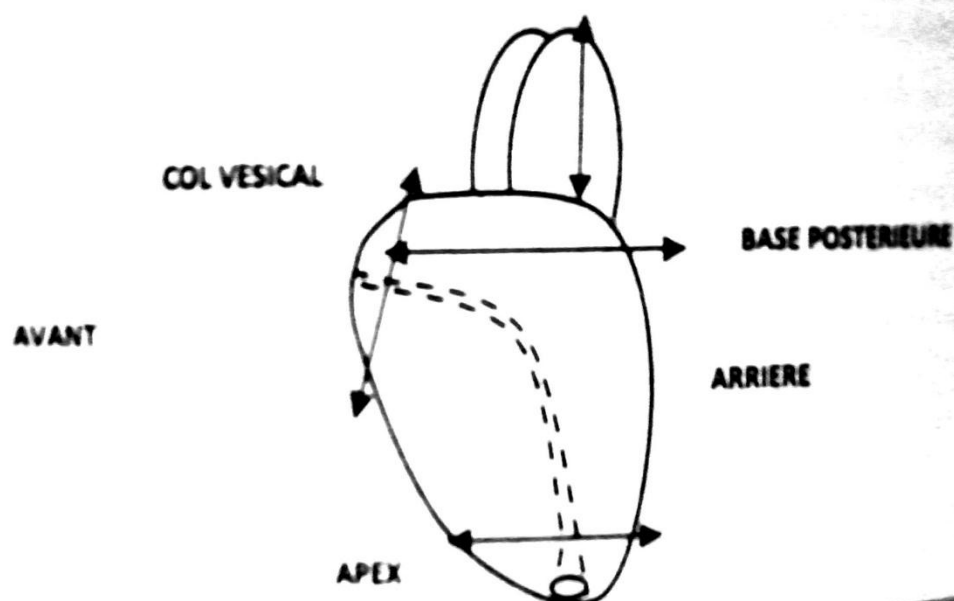
Annexe 6

Tableau XII : Prélèvements selon le protocole de Stanford :

Partie de l'organe	Technique
Base	tranche perpendiculaire au trajet de l'urètre, d'environ 5 mm d'épaisseur puis on recoupe cette tranche comme une conisation.
Apex	même procédé
Lobes prostatiques	on prélève chaque lobe de l'apex vers la base des vésicules séminales en faisant des tranches transversales d'environ 5 mm d'épaisseur perpendiculairement au plan postérieur ; chaque lobe est inclus séparément.
Vésicules séminales	coupées longitudinalement.
canaux déférents	coupe transversale de chaque canal.



Prostate vue de face antérieure



Prostate vue de profil

Annexe 7



Figure 11 : Appareils assurant la déshydratation et l'inclusion en paraffine

ANNEXE 8



Figure 12 : Différents moules utilisés pour l'inclusion en paraffine



Figure 13 : Disposition de pièce de tissu prostatique dans le moule à paraffine.

Annexe 9



Figure 14 : Appareil microtome

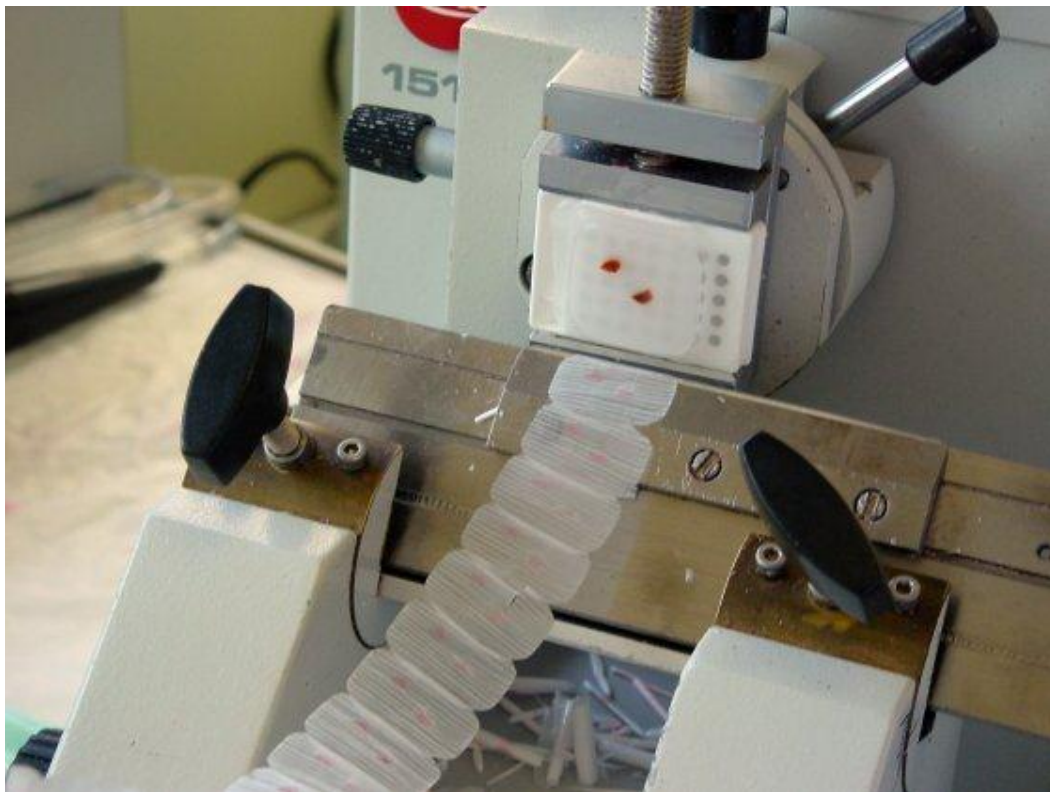


Figure 15 : Découpe en ruban d'un bloc de paraffine