



DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de fin d'études

Présenté par

Mr Mansouri Abdelkrim

Pour l'obtention du diplôme de

Master en Sciences biologiques

Spécialité: Génétique fondamentale et appliquée

Thème

***Classification moléculaire des
cancer mammaires/Triple négative***

Soutenu le 24/06/2020

Devant le Jury

Présidente	M. DALACHE Fatiha	Professeur U.Mostaganem
Examineur	M.CHIBANI Abdelwahab	Professeur U.Mostaganem
Encadreur	M.GUEDOUAR Youcef	MCB U. Mostaganem



REMERCIEMENT

*Tout d'abord, je tiens à remercier **DIEU**, pour nous avoir donné la force, le courage, la patience et la santé afin d'accomplir Ce travail.*

J'adresse nos vifs remerciements à notre encadreur

***Mr. GUEDOUAR. Y** pour son aide qu'il je a apportée et ses précieux conseils.*

*J'adresse notre respectueux remerciement à tous les membres du jury : **Mr. CHIBANI. A** et **M^{me} DALACH.F** qui je fais l'honneur de juger notre travail.*

*Je tiens à exprimer toute ma gratitude et mes remerciements à tous nos enseignants de département de Biologie particulièrement : **Mr. CHIBANI, M^{me}.***

DALLACHE, M^{me} .ABASSANE.

*Je tiens à remercier tous ceux qui nous ont aidés à réaliser notre stage dans laboratoire d'anatomopathologie à hopitale de **chigiavara, CHUO, EHUO.***

Mes derniers remerciements et ce ne sont pas les moindres, vont à tous ceux qui ont contribué de près ou de loin pour l'aboutissement de ce travail.



Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes chers parents ma mère et mon père

*Pour leur patience, leur amour, leur soutien et leurs
encouragements.*

A mes frères

(Abdelhak, Omar, Amine, Khaled, youcef)

*A mes sœurs (Imen, Soumia, Rihab ,
chaimaa, Asma , Nadoucha)*

*A mes amies (Smail, Farid, Mohamed) et mes
camarades de M 2 GFA promos 2019-2020*

*Sans oublier Tous les enseignant de la spécialité
Génétique , A tous ceux qui nous ont aidés et
Encouragés de près ou de loin*

Mr MANSOURI ABDELKRIM

Résumé

Le cancer du sein est un véritable problème de santé publique, que ça soit en Algérie ou dans le monde entier. Dans notre pays, Il représente le premier cancer féminin par ordre de fréquence et la première cause de mortalité féminine.

L'objectif de notre travail est l'étude des particularités épidémiologiques, anatomo-pathologiques, évolutives du cancer du sein et l'évaluation phénotypique des sous-types moléculaires.

L'étude rétrospective a été réalisée sur 660 dossiers colligés au niveau du service d'oncologie médicale et du laboratoire d'anatomie pathologique du l'EPH de Mostaganem et d'Oran, sur une période de 5ans (2015-2020).

Les paramètres étudiés sont : l'âge, la taille tumorale, la localisation, le type et le grade histologique, les ganglions lymphatiques, le type de prélèvement, les récepteurs hormonaux et les sous types moléculaires. Un total de 660 cas de cancers du sein a été recensé. La tranche d'âge la plus touchée par cette maladie est celle de [40-49], avec des extrêmes de 20 et 89 ans , âge moyen des patientes : 50 ans. Selon la localisation, le sein gauche est le plus touchées dans 356 cas (54.09%), le sein droit dans 300 cas (45.45%) et le sein bilatérale 4 cas (0.45%). Sur le plan anatomopathologique, le type histologique dominant est le carcinome canalaire infiltrant (81%), avec un grade histopronostique SBR II élevé : 65,15%. La taille tumoral pT2 est la plus fréquente (51%). L'envahissement ganglionnaire selon classification TNM sont : N0 :24,64%, N1 avec 29,33%, N2 :20,85%, N3 :13,87%, les ganglions lymphatiques positivespN+ : 65,23%. Letype de prélèvement dominant est la mastectomie (49,86 %). Les récepteurs hormonaux (RE+ : 58%,RE- :39%, RP+ :57,27%,RP- :39,54% des cas). Le marqueur de prolifération KI67 positifs dans 58% des cas et l'HER2 surexprimé dans (Score0 :43,18%, Score1 :27,78%, Score2 :9.39%, Score3 :18,63%) des cas.

L'évaluation phénotypique des sous-types moléculaires est effectuée en précisant leur proportion relative et leurs caractéristiques biologiques. L'analyse IHC est réalisée à l'aide d'anticorps spécifiques des récepteurs hormonaux, de l'oncoprotéine HER2, l'antigène Ki67. Le groupe Luminal comporte le sous-type LA retrouvé dans 9,69% et LB dans 7,87%. Le sous-type HER2 est recensé dans 85%. Nous avons répertorié les tumeurs n'exprimant pas les récepteurs estrogéniques RE, les récepteurs progestéroniques RP et l'oncoprotéine HER2 : RE- RP- HER2-. Ces carcinomes du sous-type triple-négatif TN sont observés dans 17,12%. La détermination des sous-types moléculaires en IHC confirme le caractère tumoral agressif de mauvais pronostic chez les patientes : faible proportion de LA (9,69%) et LB (7,87%) de bon pronostic, prédominance des sous-types de pronostic défavorable HER2 (85%), TN (17,12%). La caractérisation de ces sous-types et l'établissement de leur pronostic ont permis d'améliorer significativement la prise en charge thérapeutique des patientes.

Parmi les 660 tumeurs étudiées, nous avons répertorié 113 tumeurs n'exprimant pas les récepteurs estrogéniques RE, les récepteurs progestéroniques RP et l'oncoprotéine HER2 : ce sont des carcinomes TN. Caractéristiques des carcinomes TN : âge moyen des patientes :50,53 ans. Taille tumorale pT1 : 61%, pT2 :36% et pT3 :3%. Sur le plan anatomopathologique, le type histologique dominant est le carcinome canalaire infiltrant (88%), avec un grade histopronostique SBR II élevé : 69,91%. Présence d'envahissement ganglionnaire pN+ : 68%. L'envahissement ganglionnaire en classe N1 avec 56%, N0 :40%, N2 :4%. Selon la localisation, le sein gauche est le plus touchées (51%) et le sein droit (49%). Le type de prélèvement dominant est la mastectomie (63,73 %).

L'analyse des résultats montre que les tumeurs triple-négatives sont des tumeurs agressives de mauvais pronostic prédominantes chez les femmes jeunes, de grande taille, de grade SBR élevé, avec une importante activité mitotique et un envahissement ganglionnaire dominant.

Mots clés : Cancer du sein, carcinomes infiltrant, Sous-types moléculaires, Triple négatif, Immunohistochimie.

Abstract

Breast cancer is a real public health problem, whether in Algeria or around the world. In our country, it represents the first female cancer in frequency and cause of female mortality.

The objective of our work is the study of the epidemiological, anatomo-pathological, evolutionary features of breast cancer and the phenotypic evaluation of molecular subtypes.

The retrospective study was carried out on 660 files collected at the medical oncology service and the pathological anatomy laboratory of the EPH of Mostaganem and Oran , over a period of 5 years (2015-2020).

The parameters studied are: age, tumor size, location, type and histological grade, lymph nodes, type of sample, hormone receptors and molecular subtypes. A total of 660 cases of breast cancer have been identified. The age group most affected by this disease is that of [40-49], with extremes of 20 and 89 years, average age of the patients: 50 years. Depending on the location, the left breast is the most affected in 356 cases (54.09%), the right breast in 300 cases (45.45%) and the bilateral breast 4 cases (0.45%). Pathologically, the dominant histological type is invasive ductal carcinoma (81%), with a high SBR II histopronostic grade: 65.15%. The pT2 tumor size is the most frequent (51%). Lymph node invasion according to TNM classification are: N0: 24.64%, N1 with 29.33%, N2: 20.85%, N3: 13.87%, lymph nodes positive pN +: 65.23%. The dominant type of sample is mastectomy (49.86%). Hormone receptors (RE +: 58%, RE-: 39%, RP +: 57.27%, RP-: 39.54% of cases). The proliferation marker KI67 positive in 58% of the cases and the HER2 overexpressed in (Score0: 43.18%, Score1: 27.78%, Score2: 9.39%, Score3: 18.63%) of the cases.

The phenotypic evaluation of the molecular subtypes is carried out by specifying their relative proportion and their biological characteristics. The IHC analysis is carried out using antibodies specific to hormone receptors, the HER2 oncoprotein, the Ki67 antigen. The Luminal group includes the LA subtype found in 9.69% and LB in 7.87%. The HER2 subtype is identified in 85%. We have listed tumors that do not express the estrogen RE receptors, the progesterone receptors RP and the HER2 oncoprotein: RE- RP-HER2-. These carcinomas of the TN negative triple subtype are observed in 17.12%. The determination of molecular subtypes in IHC confirms the aggressive tumor character of poor prognosis in patients: low proportion of LA (9.69%) and LB (7.87%) of good prognosis, predominance of prognostic subtypes unfavorable HER2 (85%), TN (17.12%). The characterization of these subtypes and the establishment of their prognosis have made it possible to significantly improve the therapeutic management of patients.

Among the 660 tumors studied, we have listed 113 tumors that do not express the estrogen RE receptors, the RP progesterone receptors and the HER2 oncoprotein: these are TN carcinomas. Characteristics of TN carcinomas: average age of patients: 50.53 years. Tumor size pT1: 61%, pT2: 36% and pT3: 3%. Pathologically, the dominant histological type is invasive ductal carcinoma (88%), with a high SBR II histopronostic grade: 69.91%. Presence of pN + lymph node invasion: 68%. Lymph node invasion in class N1 with 56%, N0: 40%, N2: 4%. Depending on the location, the left breast is the most affected (51%) and the right breast (49%). The dominant type of sample is mastectomy (63.73%).

Analysis of the results shows that triple-negative tumors are aggressive tumors with a poor prognosis predominant in young, tall women, of high SBR grade, with significant mitotic activity and dominant lymph node invasion.

Keywords: Breast cancer, invasive carcinomas, Molecular subtypes, Triple negative, Immunohistochemistry.

Sommaire

❖ Dédicace	
❖ Remerciement	
❖ Liste des abréviations	
❖ Liste des figures	
❖ Liste des tableaux	
❖ Résumé	
❖ Introduction	01

Chapitre I : le sein

I.Sein pathologique	02
1.Définition et généralités	02
2.Mécanisme de la cancérogénèse	02
2.1. Initiation	02
2.2. Promotion	02
2.3. Progression	03
3.Classification de cancer du sein	04
3.1.Classification OMS des tumeurs	04
3.1.1.Tumeurs benigne	04
3.1.2.Tumeurs maligne	04
3.1.3.Les carcinomes in situ (non infiltrants)	04
3.1.4.Les carcinomes invasif (infiltrants)	04
3.1.5.Les carcinomes métastatique	05
3.1.6.La maladie de paget du mamelon	05
3.2.Classification TNM	06
3.3.Caractéristique des cancer du sein par immunohistochimie	07
3.3.1.Grade histologique	07

3.3.2.L'envahissement ganglionnaire	07
3.3.3.Status here2	07
3.3.4.L'antigene ki67	07
3.4.Les marqueur tumoraux	08
3.4.1.Récepteur l'oestrogène (RE)	08
3.4.2.Récepteur à la progesterone (RP)	08
3.4.3.Récepteur à here 2	08
3.5.Classification moléculaire	09
3.5.1.L'objectif	09
3.5.2.Les sous types moléculaire	09
3.5.2.1.Le carcinome de type luminal A	09
3.5.2.2.Le carcinome de type luminal B	09
3.5.2.3.Le carcinome de type here 2	10
3.5.2.4.Le carcinome de type Basal-like	10
3.5.2.5.Le carcinome de type Normal-like	10
II. Prédiposition héréditaire au cancer du sein	11
1.Structure et fonction de gene BRCA1	11
1.1.Structure du gene BRCA1	11
1.2.Fonction de la proteine BRCA1	11
1.2.1.Réparation de l'ADN	12
1.2.2.Régulation de la transcription	12
1.2.3.Controle du cycle cellulaire	12
2.Structure et fonction de gene BRCA2	12
2.1.Structure du gene BRCA2	12
2.2.Fonction de la proteine BRCA2	13
2.2.1.Réparation de l'ADN	13
2.2.2.Controle du cycle cellulaire	13

3.BRCA1/2 et spécificité tissulaire	14
3.1.Perte d'hétérozygotie	14
3.2.BRCA1/2 et oestrogene	15
3.2.1.Oestrogène induction de BRCA1	15
3.2.2. RE α et BRCA1.....	15
3.2.3. BRCA1 et expression des RE	16
4.Hormothérapie : ciblage du RE dans le traitement de cancer du sein	17

Chapitre II : Matériel et méthodes

Introduction	19
1.La technique histologique	19
1.1. Enregistrement	19
1.2. Fixation	19
1.3. Mensuration et description des pièces	20
1.4. Déshydratation	20
1.5. Inclusion	22
1.6. Réalisation des coupes	23
1.7. Etalement les lames	23
1.8. Coloration	23
1.9. Montage les lames	24
1.10.Etude microscope optique	24
2.La technique immunohistochimie	25
2.1.Le repérage de la composant carcinomteuse infiltrant	25
2.2.La confection des coupes	25
2.3.Le protocole de technique immunohistochimie	25
2.3.1.Déparafinage	25
2.3.2.Réhydratation	25
2.3.3.Démasquage	26

2.3.4. Protocole de kit novocastra	28
2.3.5. Déshydratation	33
2.3.6. Montage les lames IHC	33

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractéristique globale de carcinome infiltrant	34
1.1. Caractéristique clinico histopathologique	34
1.2. Caractéristique Biologique	35
2. Détermination immunohistochimie des sous types moléculaire	36
2.1. Expression les sous types luminal A et B	36
2.2. Expression le sous type Here2	37
2.3. Expression le sous type Triple négative	37
3. Caractéristiques de tumeurs triple négatives	38
3.1. Caractéristique clinico. histopathologique	38
3.1.1. Répartition selon age des patientes	38
3.1.2. Répartition selon la localisation de la tumeur.....	39
3.1.3. Répartition selon le type de prélèvement.....	39
3.1.4. Répartition selon la taille tumorale.....	40
3.1.5. Répartition des cas en fonction de types histologique.....	40
3.1.6. Répartition selon des ganglions selon N	41
3.1.6.1. Répartition selon des ganglions lymphatique selon N	41
3.1.6.2. Répartition selon classification TNM	41
3.1.7. Répartition selon le grade SBR	42
4. Comparaison des tumeurs triple négatives versus non triple négatives.....	43

Conclusion

Référence bibliographique

Liste des abréviations

ADN :	Acide Désoxyribonucléique
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
CCIS :	Carcinome canalaire in situ
CLIS :	Carcinome lobulaire in situ
IHC	Immuno-histo-chimie
SBR :	Scarff-Bloom-Richardson
HER2 :	human epidermal growth factor receptor 2
KI67 :	Kiel 67
CK5/6 :	Cytokératine basiques
Fish :	Fluorescence in situ hybridization
RH :	Récepteurs hormonaux
RE :	Récepteur à l'œstrogène
RP :	Récepteur à la progestérone
CS :	Cancer du sein
EGF :	Epidermal Growth Factor
P53 :	Tumor protein 53
BRCA 1 :	Breast cancer1
BRCA 2 :	Breast cancer2
KDa :	KiloDalton
pH :	Potentiel hydrogène
ATM :	Ataxia Telangiectasia Mutated
Pb :	Paire de base
Kb :	Kilobase
ZING finger :	Really Interesting New Gene
BRCT :	BRCA1 C Terminus

CHK2 :	Checkpoint kinase 2
ARN :	Acide ribonucléique
HDAC :	Histone désacétylase
CtBP :	C-terminal-binding protein 1
ZFP1 :	Zinc finger protein 1
Re α :	Récepteur aux estrogènes alpha
cDNA	Acide désoxyribonucléique complémentaire
UTR :	Untranslated Transcribed Region
Hsp90 :	Protéines chaperones
IGF1R :	Insulin-like growth factor 1 receptor
TFAP2C :	Transcription Factor AP-2 Gamma
TBS :	Tris Buffered Saline

LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Les étapes de cancérogenèse	03
Figure 2:	Carcinome canalaire et lobulaire	05
Figure 3 :	Classification TNM du cancer du sein	06
Figure 4 :	Les principaux domaines fonctionnels de BRCA1.....	12
Figure 5 :	Principaux domaines fonctionnels de BRCA2	14
Figure 6 :	Les fonctions de BRCA1 et BRCA2 impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN	15
Figure 7 :	Rôle de BRCA1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire oestrogène dépendante	18
Figure 8 :	Hypothèse mécanistique du rôle des mutations de BRCA1 dans la progression tumorale hormonodépendante	18
Figure 9 :	Mécanismes d'action des différents traitements d'hormonaux thérapie	20
Figure 10 :	Grande pièce anatomie	23
Figure 11 :	Petit pièce anatomie	23
Figure 12 :	Etude macroscopique	23
Figure 13 :	Etude macroscopie	23
Figure 14 :	Appareil déshydratation	23
Figure 15 :	Appareil deshydratation	23
Figure 16 :	Placer la pièce dans le moule	24
Figure 17 :	Inclusion en paraffine : Réalisation des blocs	24
Figure 18 :	Refroidissement les blocs sur plaque	24
Figure 19 :	Les coupes au microtome	24
Figure 20 :	Bloc de pièce anatomie et leur lame étalée	25
Figure 21 :	Étalement les lames	25
Figure 22 :	Xylen de coloration	25
Figure 23 :	Alcool de coloration	25

Figure 24 :	Hématoxyline de coloration	25
Figure 25 :	Carbonate de léthium de coloration	25
Figure 26 :	Eosin de coloration	25
Figure 27 :	Acétone de coloration	25
Figure 28 :	Rinacge par l'eau de robinet	25
Figure 29 :	Lamelle de montage	26
Figure 30 :	Leukit	26
Figure 31 :	Résultats de montage	26
Figure 32 :	Les etapes de Rehydratation	28
Figure 33 :	Solution pH 6 et pH 9	28
Figure 34 :	Solution pH 6 et pH 9 dans bain marie	28
Figure 35 :	Refroidissement les solution pH par l'eau de robinet	28
Figure 36 :	Rincage par TBS	29
Figure 37 :	Lame sans cerclage	29
Figure 38 :	Cercler lame avec Novopen	29
Figure 39 :	Coffre de kit Novocastra	29
Figure 40 :	Chambre noire	29
Figure 41 :	Les lames dans la chambre noire	29
Figure 42 :	Chambre noire fermé	29
Figure 43 :	Péroxydase block	30
Figure 44 :	2 gouttes de peroxydase sur les lames	30
Figure 45 :	Chambre noire fermé	30
Figure 46 :	Rincage par TBS	30
Figure 47 :	Protein block	30
Figure 48 :	2 gouttes de Protein block sur les lames	30
Figure 49 :	Chambre noire fermé	31

Figure 50 :	Rincage par TBS	31
Figure 51 :	Les anticorps d'immunohistochimie	31
Figure 52 :	Les anticorps de cancer du sein (Ro , Rp , Here 2 , ki67)	31
Figure 53 :	Déposer les anticorps dans les lames d'immunohistochimie	31
Figure 54 :	Chambre noir	31
Figure 55 :	Rincage par le TBS	31
Figure 56 :	L'anticorp secondaire(Post primary)	32
Figure 57 :	Mettre 20ul de Ac seconadaire dans les lames IHC	32
Figure 58 :	Chambre noir	32
Figure 59 :	Rincage par le TBS	32
Figure 60 :	Novolink Polymere	32
Figure 61 :	Deposé 2 gouttes de novolink polymere dans tous les lames IHC	32
Figure 62 :	Chambre noir pendant 30 minutes	33
Figure 63 :	Rincage par le TBS	33
Figure 64 :	Novocastra DAB chromogene	33
Figure 65 :	Déposé 20ul de solution novocastra DAB chromogene	33
Figure 66 :	Chambre noir pendant 3 minutes	33
Figure 67 :	Rincage par le TBS	33
Figure 68 :	Novocastra hématoxyline	34
Figure 69 :	Déposer 2 gouttes d'hématoxyline dans tous les lames IHC	34
Figure 70 :	Rincage les lames par l'eau de robinet	34
Figure 71 :	Rincage par le TBS	34
Figure 72 :	Rincage par l'eau distilé	34
Figure 73 :	Les étapes de déshydratation	35
Figure 74 :	Lamelle de montage	35
Figure 75 :	Résultats de montage	35

Figure 76 :	Leukit	35
Figure 77 :	Proportion des tumeurs luminal A et luminal B.....	38
Figure 78 :	Répartition des patientes selon Expression de HER2.....	39
Figure 79 :	Répartition des patientes selon sous type Triple négative.....	40
Figure 80 :	Répartition des patientes selon l'âge (n=113).....	40
Figure 81 :	Répartition selon la localisation de la tumeur	41
Figure 82 :	Répartition selon le type de prélèvement	41
Figure 83 :	Répartition des tumeurs selon la taille pT.....	42
Figure 84 :	Répartition selon le type histologique	42
Figure 85 :	Répartition des patientes selon des ganglions lymphatique N	43
Figure 86 :	Répartition des patientes selon classification TNM	43
Figure 87 :	Répartition des tumeurs selon le grade SBR	44

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I	Principaux caractéristiques des deux sortes tumeurs	04
Tableau II :	Critères utilisés pour la classification moléculaire du cancer du sein	11
Tableau III :	Le passage déshydratation	22
Tableau IV :	Les étapes de coloration d'hématoxyline-eosine	26
Tableau V:	Les résultats d'analyse histopathologique des carcinomes infiltrants (660cas)	36
Tableau VI:	Les résultats d'analyse des récepteurs biologique des carcinomes infiltrants (660cas)	37
Tableau VII:	Les résultats de comparaison des tumeurs triple négative versus tumeurs non triple négative	45

Introduction

Le cancer du sein représente le premier cancer de la femme dans le monde et en Algérie. Il constitue un réel problème de santé publique. Son incidence est en nette augmentation particulièrement dans les pays en voie de développement où, contrairement aux pays développés, la mortalité reste élevée du fait d'un diagnostic tardif aux stades localement avancés ou métastatiques (*Michel et al.2008*).

Le cancer du sein est une maladie hétérogène constituée d'un ensemble des tumeurs de divers types histologiques qui sont classées en sous-groupes moléculaires bien définis dont la présentation clinique, l'évolution et le pronostic sont complètement différents (*Perou et al.2000*). La complexité de cette maladie impose une prise en charge multidisciplinaire afin de proposer aux patientes un traitement adapté à leur maladie.L'identification de ces sous types moléculaires de cancer du sein a été un moment-clef de la recherche, (*Sotirio et al, 2009*).

Notre connaissance du cancer du sein s'est enrichie de données cellulaires et moléculaires qui permettront à la fois de mieux comprendre et surtout de mieux traiter cette maladie en ciblant les cellules qui sont à l'origine du cancer : les cellules souches cancéreuses, (*Charafe –Gauffret et al, 2007*).

Le cancer du sein triple négatif est l'un des sous-groupes moléculaires du cancer du sein. Il est défini par l'absence d'expression des récepteurs aux estrogènes et à la progestérone ainsi qu'à l'absence de la surexpression del'oncogène HER2.

Le cancer du sein triple négatif est caractérisé par son évolution rapide et son pronostic péjoratif comparé aux autres sous-groupes moléculaires du cancer du sein avec un taux élevé de récives précoces locales et/ou métastatiques (*Cheang et al.2008*). Il atteint fréquemment des femmes plus jeunes. Le diagnostic est souvent fait à un stade localement avancé du fait de l'évolution rapide de la maladie (*Cheang et al.2008*).

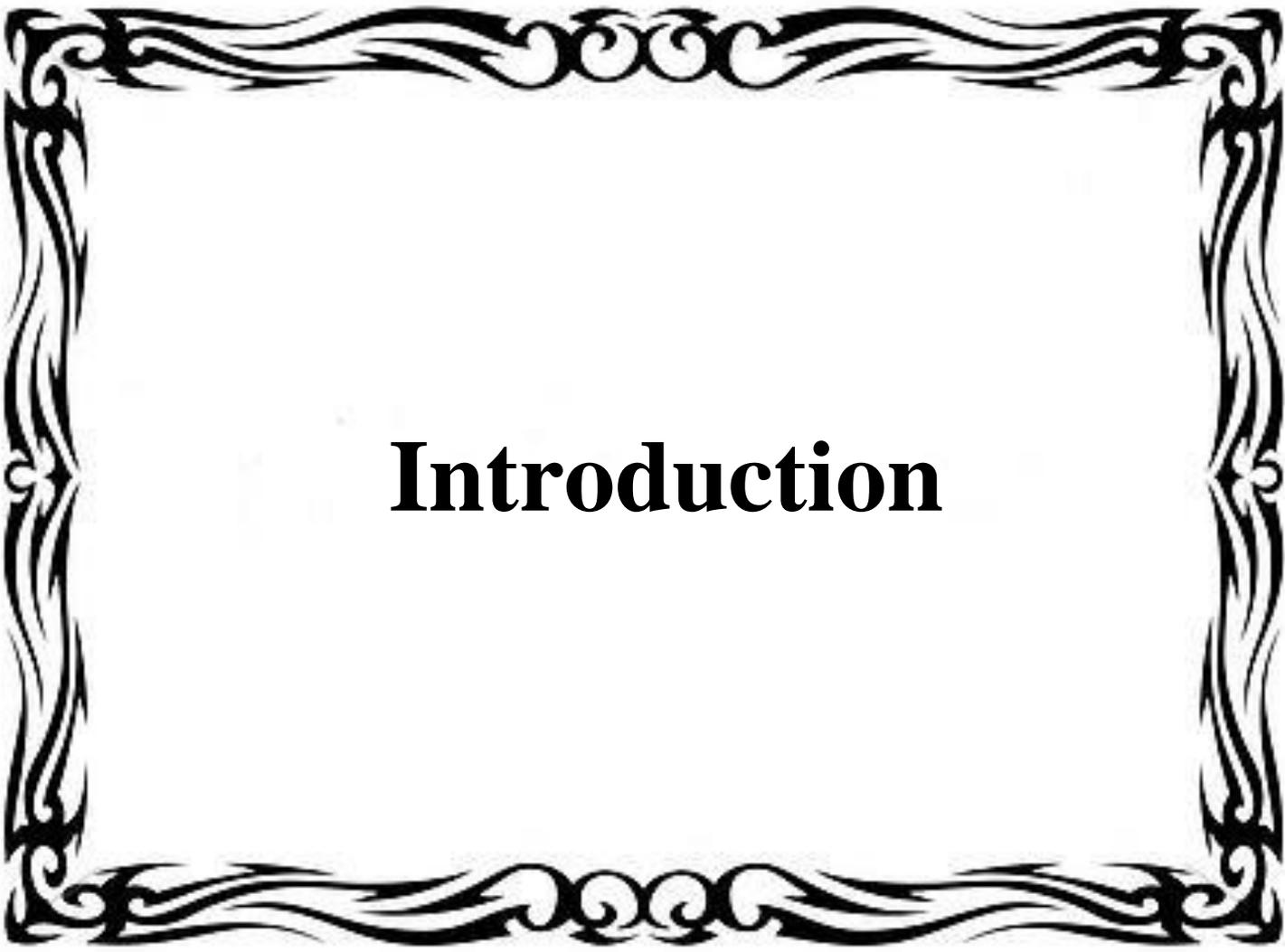
Malgré l'évolution de la prise en charge pluridisciplinaire, le cancer du sein demeure un véritable problème de santé publique et représente de nos jours « la maladie du siècle ».

En conséquence, notre analyse porte sur les caractéristiques cliniques, histopathologiques, biologiques et pronostiques des cancers triple-négatifs. Notre travail intéresse des patientes porteuses d'un carcinome infiltrant et comporte trois parties :

-Une étude bibliographique du cancer mammaire et de la classification moléculaire.

-La seconde partie définit les caractéristiques de patientes et les différentes méthodes utilisées pour la réalisation de ce travail.

-La troisième partie est consacrée aux résultats de notre analyse, la détermination des sous-types moléculaires et leur discussion en comparant les paramètres de l'ensemble des tumeurs, les triple-négatives et tumeurs non triple-négatives avec ceux de la littérature.

A decorative rectangular border with intricate, symmetrical scrollwork and floral patterns, framing the central text.

Introduction

Chapitre I



Etude

Bibliographique

I. Sein pathologique

1. Définition et généralités

Le cancer est une maladie génétique de la cellule animale, qui a pour origine une modification quantitative et/ou qualitative des gènes, aboutissant au dysfonctionnement des mécanismes de régulation cellulaire, qui se traduit par la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale maligne (*Pirici, 2012*). Le cancer du sein dans la plupart du temps est une prolifération maligne des cellules épithéliales au niveau canalaire ou lobulaire. C'est une maladie clonale (une seule cellule transformée), le résultat final d'une série de mutations somatiques, acquises ou germinales (héritées), peut exprimer le plein potentiel malin, dans une série d'événements qui se produisent d'une façon séquentielle et aléatoire (*Marie, 2013*).

2. Mécanisme de la cancérogénèse :

Le processus de cancérogénèse est long et comporte quatre phases : l'initiation, promotion, la progression et l'invasion, (**Fig.01**).

2.1. Initiation:

C'est la première phase de la cancérogénèse, elle ne concerne qu'une seule cellule, ainsi « initiée » sur la voie de la cancérisation. Cette phase correspond à l'introduction dans l'ADN d'une ou plusieurs lésions, transmissibles au génome des cellules filles par des modifications génotoxiques, ils sont dits génotoxiques et peuvent être d'origine chimique, physique ou biologique. Il existe des systèmes capables d'effectuer des réparations de l'ADN qui sont fidèles dans la majorité des cas, cependant ils peuvent se révéler infidèles ou fautifs, et dans ce réparer des lésions en insérant d'autres erreurs. L'accumulation des anomalies génétiques aboutit alors à des mutations de gènes importants dans le maintien de l'intégrité et des caractéristiques de chaque type cellulaire, (*Weinberg, 1996*).

2.2. La promotion :

Celle-ci est liée à l'induction d'une prolifération cellulaire qui provoque l'expansion clonale de la cellule initiée, soit que ce clone soit plus sensible que les cellules saines aux facteurs de croissance présents, soit que l'apoptose y soit diminuée.

La plupart des agents de promotion stimulent la prolifération, mais souvent de façon temporaire ou réversible. L'irritation mécanique prolongée et l'inflammation sont de promotion car, administrés en quantité importante, ils provoquent des lésions irréversibles conduisant à la mort d'une proportion élevée de cellules. L'intensité des événements dépend de la dose des agents de promotion, car ces derniers fonctionnent par effet seuil. Les lésions causées peuvent être réversibles quand l'exposition est faible. Par

contre la présence chronique ou itérative de l'agent promoteur pendant cette phase peut conduire à des lésions précancéreuses qui persistent à croître malgré l'interruption de l'exposition. Elle devient autonome. La deuxième phase de la cancérogenèse a alors été accomplie. Celle-ci se termine quand un clone de cellules initiées est devenu capable d'échapper au contrôle tissulaire pour entrer dans la troisième phase: la progression tumorale, (*Lauer-Fields et al, 2001*).

2.3. Progression :

Pendant cette phase, les cellules filles de la cellule transformée sont sélectionnées pour donner des clones plus malins et pour acquérir des propriétés leur permettant par exemple de métastaser. C'est l'étape finale dans le développement d'un cancer qui devient cliniquement détectable.

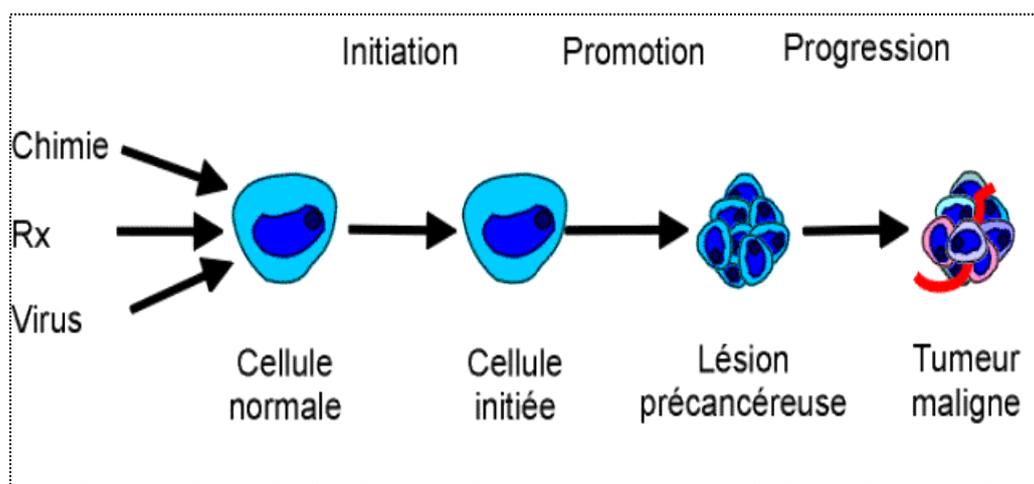


Figure 01 : Les étapes de cancérogenèse (*Campus d'Anatomie Pathologique, 2010*)

3. Classification de cancer du sein

3.1. Classification OMS des tumeurs :

Il y a deux sortes de tumeurs ; les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

3.1.1. Tumeurs bénignes :

Les tumeurs bénignes ne sont pas cancéreuses. Même si elles peuvent prendre la place des cellules normales, elles ne se répandent pas dans d'autres parties du corps démontré par Marcotte, et *al.*, 2008.

3.1.2. Tumeurs malignes :

Les tumeurs malignes liées à la multiplication d'une cellule transformée qui ne répond plus aux mécanismes de régulation du corps humain (*Guillaumot, 2012*).

Tableau I : Principaux caractéristiques des deux sortes tumeurs (*Asselah, 2012*).

Tumeurs bénignes	Tumeurs malignes
Reste localisée à l'endroit ou elle a pris Naissance	Ne reste pas localisée à l'endroit ou elle a pris naissance
Est bien limitée	Est mal limitée par rapport aux tissus préexistants
Circonsrite, refoule les tissus préexistants	Non circonscrite, avec dispersion des cellules tumoraes,
Pas de destruction des tissus voisins	Destruction et envahissement des tissus Préexistants
A peu de retentissement sur l'état général	Retentit sur l'état général
Pas de récurrence locale Pas de métastase	Récurrence possible Métastase possible
Son exérèse chirurgicale complète en permet la guérison	Est potentiellement mortelle

3.1.3. Les carcinomes in situ (infiltrants) :

Loriot et al. (2011) ; Baillet et al. (2015) ont rapporté que la prolifération épithéliale maligne est dans la lumière soit du canal galactophorique : carcinome intracanaire (85 % à 90 %) des carcinomes in situ ; soit des acini situés dans les lobules : carcinome intralobulaire (10 à 15 %). Mais la membrane basale est toujours respectée, Il n'y a pas d'infiltration. (**Fig.02**).

3.1.4. Les carcinomes invasifs (non infiltrants) :

Contrairement aux précédents, ce type de carcinome se distingue par la capacité des cellules cancéreuses à envahir le tissu conjonctif voisin. Ce groupe est constitué de plusieurs entités. Le premier type est le carcinome canalaire infiltrant. Il est le plus fréquent des tumeurs malignes soit environ 70% des cancers du sein. L'autre type est le carcinome lobulaire infiltrant représentant 5 à 15% des cancers. De nombreux autres carcinomes plus rares sont également décrits. Cette classification des tumeurs mammaires est actuellement remise en question par des études transcriptomiques à haut débit. En effet, les cancers du sein représentent une pathologie complexe et hétérogène, résultant de multiples altérations moléculaires. L'étude de cette hétérogénéité est cruciale pour le développement de thérapies plus efficaces ciblant spécifiquement la tumeur de chaque patiente, (**Fig.03**), (*Monbelli S, 2014*).

3.1.5. Les carcinomes métastatiques:

Les cellules néoplasiques des carcinomes invasifs envahissent le tissu mammaire environnant et peuvent disséminer à partir de la tumeur primaire, le plus souvent par le réseau lymphatique mais aussi

par les vaisseaux sanguins. Les premiers relais ganglionnaires sont colonisés et peuvent être à l'origine d'une dissémination générale du cancer. Cet envahissement des ganglions lymphatiques est le reflet du potentiel métastatique des cellules tumorales et est important dans le pronostic de la tumeur. Dans la plupart des cancers du sein, les métastases sont principalement localisées au niveau des os, des poumons et du cerveau et peuvent être également retrouvées dans le foie, la plèvre et la peau, (Fig.03), (Verbeke, 2010).

3.1.6. Maladie de Paget du mamelon :

On observe dans ce cas un écoulement sanglant ou eczéma du mamelon. L'analyse histologique met en évidence des cellules carcinomateuses au sein du revêtement malpighien du mamelon. Les cellules sont de grandes tailles, polygonales, au cytoplasme abondant clair, au noyau irrégulier et d'architecture lentigineuse. La maladie de Paget du sein témoigne d'un cancer infiltrant ou d'un carcinome intracanaulaire du sein. Il s'agit d'une propagation de cellules carcinomateuses au mamelon, (Tavassoéli et al, 2003).

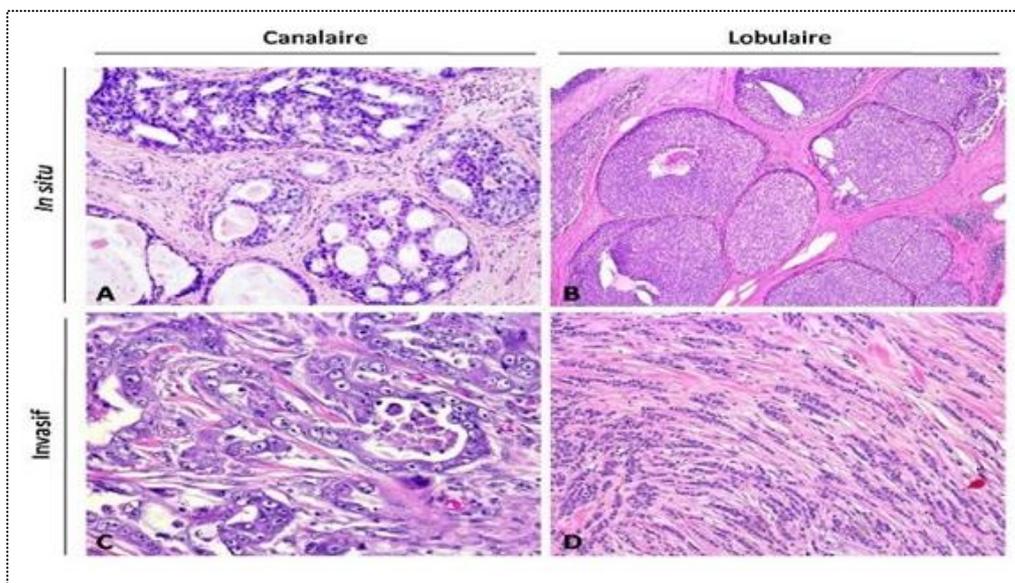


Figure 02 : Carcinome canalaire et lobulaire (Campus d'Anatomie Pathologique, 2010)

A : carcinome canalaire in situ

C : carcinome canalaire invasif

B : carcinome lobulaire in situ

D : Carcinome lobulaire invasif

3.2. Classification TNM :

La classification TNM est un système de classement reposant sur l'extension tumorale locale, régionale (ganglionnaire) et métastatique. Il a été établi pour permettre des comparaisons en particulier internationales. Il était initialement exclusivement clinique afin d'être applicable par toutes les équipes (classement simple à faire, peu coûteux). Son succès, les progrès de la cancérologie, le désir de faire des comparaisons plus fines, ont fait introduire dans ce classement certaines données de l'imagerie et les constatations anatomopathologiques.

Les classements ont varié dans le temps de sorte qu'il est nécessaire de préciser l'année du TNM choisi pour décrire une population tumorale. Les dimensions centimétriques de T et de N sont de plus en plus prises en compte au détriment des autres critères.

D'une certaine façon, le TNM résume l'observation mais ne la remplace pas. A lui seul, il ne peut permettre de poser les indications de façon correcte.

❖ Le T va de 1 à 3 ou 4 selon l'extension locale révélée par le bilan clinicoradiologique. Le pT va de 1 à 3 ou 4 et tient compte de l'extension tumorale constatée par l'examen anatomopathologique de la pièce opératoire.

❖ Le N va de N0 à N3 selon la taille et le siège des adénopathies. N- et N+ sont utilisés en l'absence ou en présence d'un envahissement ganglionnaire à l'analyse anatomopathologique des ganglions.

❖ Le M correspond à l'existence (M1) ou non (M0) de métastases.

Pour les comparaisons, on peut regrouper les cas en stades selon le schéma habituel suivant :

- Stade I : T1N0M0
- Stade II : T1 N1 M0 et T2 N0 ou N1
- Stade III : T1 N2 T2 N2 T3 N0 ou N1 ou N2
- Stade IV : T4 et/ou N3 et/ou M positif, (**Fig.03**), (*Singletary et al, 2003*).

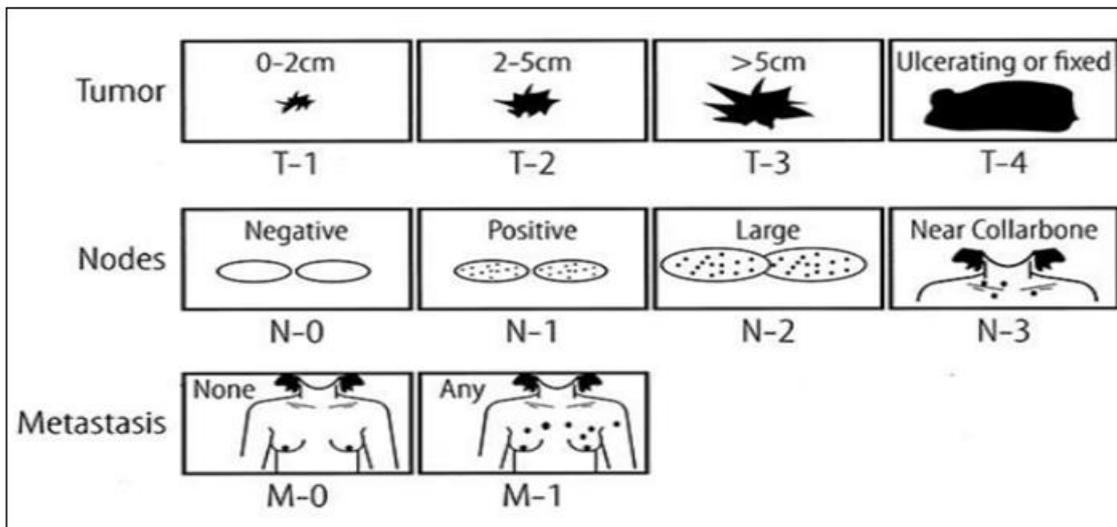


Figure 03 : Classification TNM du cancer du sein,(*Singletary et al, 2003*).

3.3.Caractérisation des cancers du sein par immunohistochimie:

3.3.1.Grade histologique:

Le rôle du grade histologique est maintenant largement admis pour les cancers infiltrants; le système le plus utilisé est le « grade de Scarff Bloom Richardson » (SBR), revu par le groupe de Nottingham et repris par l'European Community Working group for Breast Pathology.

La méthode du *grading* SBR consiste à évaluer trois paramètres morphologiques:

- ❖ La formation de tubules
- ❖ Le pléomorphisme nucléaire
- ❖ La fréquence des mitoses.

Un score allant de 1 à 3 est attribué à chacun de ces paramètres. Les différents scores sont additionnés pour obtenir le grade histologique global.

- ✓ Grade I = score 3-5
- ✓ Grade II = score 6-7
- ✓ Grade III = score 8-9

Les cancers de grade I sont mieux différenciés tandis que les cancers de grade III le sont moins. Les cancers indifférenciés ont habituellement une évolution plus grave et plus rapide que les cancers différenciés, mais ils se montrent aussi plus sensibles aux traitements néoadjuvants (*Chen et al, 2012*).

3.3.2.L'envahissement ganglionnaire :

Le cancer du sein est très lymphophile. L'envahissement ganglionnaire est habituellement considéré comme le plus important des facteurs pronostiques. Sa présence est corrélée à la taille de la tumeur et au grade SBR. D'autres éléments tels que la taille ganglionnaire, l'importance de l'envahissement et la rupture capsulaire sont également discutés. Actuellement, beaucoup d'équipes s'intéressent au caractère micro métastatique de l'envahissement déterminé par immuno-marquage, (*Mauriet al, 1999*).

3.3.3.Statut HER2 :

La protéine HER2 (human epidermal growth) est un récepteur transmembranaire qui possède une activité tyrosinekinase. Elle appartient à la famille des récepteurs de l'épidermal growth factor. Son activation se traduit par une prolifération des cellules tumorales humaines qui surexpriment HER2. Dans 15 à 20% des cancers du sein, HER2 est amplifié et surexprimé. La recherche du statut HER de la tumeur est obtenue par immunohistochimie ou par amplification génique (hybridation in situ en fluorescence: FISH), (*Sagliet et al, 2009*).

3.3.4.L'antigène Ki-67 :

La protéine Ki-67 est une protéine produite par le corps qui influence le processus de division des cellules cancéreuses du sein et, par là-même, leur vitesse de croissance (prolifération). Un taux élevé de Ki-67 dans les cellules cancéreuses peut indiquer une vitesse de croissance accrue (*Chen et al,2012*).

3.4.Les marqueurs tumoraux :

Le cancer du sein a la particularité que deux de ses facteurs pronostiques et prédictifs, nominalement les récepteurs hormonaux (RH) et l'oncoprotéine HER-2, sont dans le même temps des cibles thérapeutiques et demeurent, malgré les progrès récents liés aux signatures multigéniques, la clé de voute du pronostic et des choix thérapeutiques, (*Jacot et al, 2010*).

3.4.1.Récepteur à l'œstrogène (RE) :

Le récepteur à l'œstrogène fait partie de la superfamille des récepteurs nucléaires Il agit comme un régulateur de la transcription nucléaire. La première identification de ce récepteur est attribuable à l'équipe de D. Toft en 1966. Il a été cloné et séquencé à partir de cellules épithéliales mammaires cancéreuses, (*Sanchez, 2003*).

Dans les années1970, Mc Guire et al. Ont montré l'importance clinique de la quantification des RE comme facteur pronostique et prédictifdu bénéfice de l'hormonothérapie dans le CS. De nombreuses publications ont confirméque le pourcentage de cellules tumorales exprimant les RE une valeur pronostique et prédictive importante : la survie globale, la survie sans récidence et la réponse à l'hormonothérapie sont positivement corrélées au taux de RE,(*Marie, 2013*).

3.4.2.Récepteur à la progestérone (RP) :

Le PR est exprimé dans 60 à 70 % des cancers du sein. Dans les carcinomes, la proportion de cellules carcinomateuses positives varie de 1% à 100%. On observera en microscopie optique un marquage du noyau des cellules carcinomateuses. Les autres cellules présentes dans ou autour de la tumeur tels que les fibroblastes, adipocytes, lymphocytes ne sont pas marquées. Là aussi il y a une corrélation directe entre le niveau d'expression du PR et la réponse aux traitements hormonaux. Malgré le fait que l'expression du PR dépend de celle d'ER±, ils ne sont pas toujours exprimés simultanément dans les carcinomes. Quatre combinaisons sont donc observables : le phénotype [ER±+, PR+] est le plus fréquent (70%) et est associé avec la meilleure réponse thérapeutique ; les carcinomes négatifs pour ER± et PR [ER±-, PR-] représentent 25% des tumeurs et ne répondent pas aux thérapeutiques hormonales. Les deux autres phénotypes [ER+, PR-] et [ER-, PR+] montrent des réponses intermédiaires, (*Lakhani et al, 2012*).

3.4.3. Récepteur à HER2 :

La surexpression de l'HER2 joue un rôle dans la carcinogénèse et la progression du cancer du sein. Elle apparaît tôt et reste stable durant l'histoire naturelle de la maladie, (*Dansereau et Ferron, 2006*).

Dans les tissus mammaires sains, on compte environ 20000 récepteurs HER2 par cellule. Dans les cancers de sein présentant une amplification du gène HER2, on dénombre jusqu'à 100 fois plus de récepteurs par cellule, (*Manner et al, 2004*).

La surexpression de l'HER2, est rapportée dans approximativement 30% des cancers mammaires invasifs, mais aussi dans 60 à 70% des carcinomes canaux in situ, principalement peu différenciés, de haut grade histologique, de type comédocarcinome. (*Marie, 2013*).

Des Études de la famille des EGFR dans des modèles du cancer du sein ont montré que l'HER2 est le récepteur de la famille des EGFR le plus largement exprimé dans la cellule mammaire et que dans le cancer du sein, l'hétérodimère le plus représenté est HER2/HER3, (*Marie, 2013*).

3.5. Classification moléculaire:

A partir de l'année 2000 : les études fondatrices du profil génétique lancées par les travaux pionniers de Sorlie et Perou ont stipulé que l'hétérogénéité clinique et morphologique des cancers mammaires était associée à une hétérogénéité moléculaire se situant à un niveau transcriptionnel.

L'analyse du profil d'expression génique du cancer du sein, par l'étude de la variation globale de l'expression des gènes de 115 tumeurs du sein sur des puces à ADN utilisant un panel de 534 gènes, a permis de reclasser la population en 5 sous-types moléculaires, (*Goldhirsch et al, 2013*).

3.5.1. L'objectif:

La classification moléculaire permet :

- ✓ L'établissement d'une nouvelle taxonomie de cancer du sein,
- ✓ La définition d'index pronostiques basés sur les caractéristiques génétiques,
- ✓ La prédiction de la réponse aux différents traitements antitumoraux,
- ✓ L'identification de cibles moléculaires permettant de nouveaux traitements cibles, (*Goldhirsch et al, 2013*).

3.5.2.Sous type moléculaire:

3.5.2.1.Carcinomes de type luminal A:

Sur le plan du phénotype, en pratique clinique, on rappelle que ce, type correspond aux carcinomes tubuleux, Et à des carcinomes canauxaires infiltrants (CCI) ou à des carcinomes lobulaires infiltrants (CLI) de grade I ou II,(*Taneja, 2008*).

Représentant une réceptivité hormonale importante (ER±++) et une faible prolifération. Expression des cytokératines lumbales 8, 18 et du gène GATA3 impliqué dans le contrôle de la croissance et le maintien de la différenciation des tumeurs ER+.Généralement traités par hormonothérapie et de bon pronostic. P53 muté dans moins de 15% des cas,(*Verbeke, 2010*). (Tableau II)

3.5.2.2.Carcinomes de type luminal B:

Représente 15 à 20 % des cancers du sein et présente un phénotype plus agressif. Ces tumeurs souvent de plus haut grade histologique avec un index de prolifération plus élevé et un pronostic plus péjoratif. Ce sous-type présente un risque de récurrence plus élevé et un taux de survie après récurrence plus bas que pour le sous-type luminalA ,Ces tumeurs présentent un certain degré d'instabilité génomique.

Elles sont hormonosensibles mais bénéficient également de la chimiothérapie, voire d'une thérapie anti-HER2 quand elles surexpriment HER2. En immunohistochimie, le sous-type luminal B est défini comme RE positif, HER2 négatif et Ki67 élevé ou RE et HER2 positifs. En effet, 30 % des tumeurs HER2 positive s'appartiennent au sous- type luminal B. Cependant, 6 % des sous-types lumbaux B sont RE négatifs et HER2 négatifs, et c'est là une des failles de cette classification ,(*Charafe-Jauffret, 2012*), (Tableau II) .

3.5.2.3.Carcinomes de type HER2:

Représentent 15 à 20 % des cancers du sein. Le statut *HER2* positif confère une agressivité biologique et clinique. Ces tumeurs sont caractérisées par une forte surexpression de plusieurs gènes de l'amplification *HER2* et une négativité des récepteurs hormonaux. Le récepteur *HER2* est codé par le gène *HER2* qui est un pro-oncogène situé sur le chromosome 17. Ce sont des tumeurs hautement proliférantes avec un grade histopronostique élevé et fréquemment des mutations p53. Le profil immunohistochimique *HER2* positif et RE négatif ne correspondent pas tout à fait au sous-type moléculaire puisque seuls 70 % des tumeurs *HER2* en riches par puce à ADN surexpriment la protéine en immunohistochimie. À l'inverse, toutes les tumeurs avec amplification ou surexpression d'*HER2* ne sont pas incluses dans le cluster *HER2* par puces à ADN,(*Audrey, 2014*). (Tableau II)

3.5.2.4.Carcinomes de type basal-like:

Tumeurs dites «Triples négatives» c'est à dire n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (ER et PR) et ne surexprimant pas le récepteur *HER2*,(*Verbeke, 2010*).

Le type basal-like est caractérisé en analyse transcriptomique par un très faible niveau d'expression des gènes des RO, associé à une expression forte des gènes tels que cytokératines 5/6 et 17, EGFR. Sur le plan génomique, les carcinomes basal-like présentent de nombreuses altérations Génomiques avec plusieurs gains et pertes de segments chromosomiques (*Weigelt et al, 2010*).

Sur le plan morphologique les carcinomes basal-like sont de type canalaire le plus souvent de grade III peu différenciés à marges “refoulantes” associés à des plages de nécrose géographique souvent centrale avec un infiltrat inflammatoire lymphocytaire en périphérie Les cellules présentent des atypies nucléaires souvent marquées et un index mitotique élevé. Les cellules tumorales sont agencées en travées sans différenciation glandulaire, (*Livasy et al, 2006*).(**Tableau II**)

2.5.2.5.Carcinomes de type normale-like:

Caractérisé par un profil triple négatif et par l'expression de gènes observés dans le tissu mammaire normal et de tissu adipeux. cette classification cohortes de patientes porteuses d'un cancer du sein en utilisant un panel de gènes intrinsèques, et a montré que le groupe luminal/RE+ pouvait être subdivisé en au moins deux sous-groupes de pronostics différents, luminal A (bon pronostic) et luminal B (mauvais pronostic, incluant aussi des tumeurs RE+HER2+), sur la base notamment de la présence ou non d'un cluster de gènes liés à la prolifération, (*Sorlie et al, 2003*).

Tableau II:Critères utilisés pour la classification moléculaire du cancer du sein.

Les Sous-types moléculaire	Critères utilisés
Luminal A	RE (+), RP (+), HER2 (-) et Ki 67 < 20 %
Luminal B	RE (+), RP (+), HER2 (+) et Ki 67 élevé
HER-2	RE (-), RP (-) et HER2 (+)
Basal like	RE (-), RP (-), HER2 (-)

II. Prédiposition Hériditaire au cancer du sein

II.1. Structure et fonctions du gène BRCA1

1.1. Structure du gène BRCA1

Le gène *BRCA1* est constitué de 23 exons distribués sur 100 kb d'ADN génomique dont 22 exons codants. Les 22 exons codants comportent 5589 paires de bases. 60% de la séquence codante est située dans l'exon 11. Ce gène code pour une protéine nucléaire ubiquitaire de 220 kDa formée de 1863 acides aminés (*Fricker et al. 2000*).

De nombreux domaines, ayant des fonctions différentes, ont été identifiés au niveau de sa séquence (**Fig.04**) :

-un domaine ZING finger, ou domaine en doigt de zinc à l'extrémité amino terminale (*Huyton et al. 2000*). Il s'agit d'une région riche en résidus cystéine et histidine, pouvant lier des ions zinc. Il serait impliqué au niveau de différentes interactions protéines/protéines ;

-2 domaines BRCT (*BRCA1 C Terminus*) à l'extrémité carboxy terminale, s'étendant sur les résidus aminés 1 646 à 1 859. Il s'agit d'un motif d'acides aminés acides répétés en tandem. Ils interviendraient au niveau des interactions protéines/protéines et dans la réponse aux dommages de l'ADN (*Huyton et al. 2000*).

-4 domaines de signalisation de localisation nucléaire NLS (*Nuclear Localization Sequences*) (*Rodriguez et al. 2000*).

-un domaine d'exportation nucléaire NES (*Nuclear Export Sequence*) à proximité de l'extrémité amino terminale. Ce domaine faciliterait l'exportation de la protéine du noyau vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant d'un récepteur d'export nucléaire (*Rodriguez et al. 2000*).

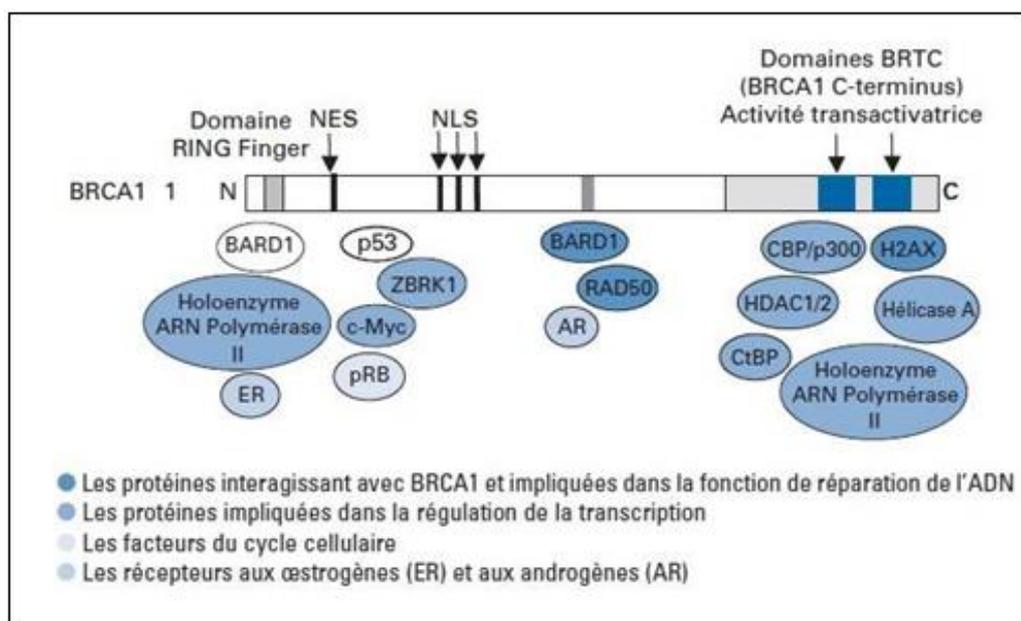


Figure 04 : Les principaux domaines fonctionnels de BRCA1 (*Rodriguez et al. 2000*).

1.2.Fonctions de la protéine BRCA1

Le gène BRCA1 est fortement exprimé en fin de phase G1 et en phase S ; son niveau reste élevé en phase G2-M puis diminue en début de phase G1 (*Scully et al. 2000*).

1.2.1.Réparation de l'ADN

BRCA1 est hyper-phosphorylé par les kinases ATM, CHK2 ou ATR en réponse aux dommages de l'ADN dus à des radiations ionisantes ou à des irradiations aux ultraviolets. BRCA1 phosphorylé forme ensuite des complexes de réparation de l'ADN avec l'histone H2AX et les facteurs RAD50 ou RAD51 impliqués dans la recombinaison homologue et la réparation de l'ADN (*Paull et al. 2000*).

1.2.2.Régulation de la transcription

BRCA1 interagit également avec l'holoenzyme ARN polymérase II et avec des régulateurs transcriptionnels tels que p53, CBP/p300, CtBP et les HDAC (*Scully et al. 2000*) et pourrait réguler spécifiquement la transcription via son interaction avec la protéine ZBRK1 (*Zheng et al. 2000*). Le complexe formé de BRCA1 et de la protéine ubiquitine ligase BARD1 serait impliqué dans l'inhibition de la transcription ainsi que dans la dégradation des protéines via le protéasome 26S (*Hashizume et al. 2001*).

1.2.3.Contrôle du cycle cellulaire

En réponse aux dommages à l'ADN, BRCA1, phosphorylé par ATM, pourrait réguler la transition G2/M, point de contrôle du cycle cellulaire jouant un rôle essentiel dans la survie cellulaire en empêchant la propagation des lésions de l'ADN (*Yarden et al. 2002*).

Enfin, BRCA1 joue un rôle dans la dynamique du fuseau mitotique et la ségrégation des chromosomes (*Lotti et al. 2002*).

II.2.Structure et fonctions du gène BRCA2

2.1.Structure du gène BRCA2

Le gène *BRCA2* est constitué de 27 exons, dont 26 sont codants, répartis sur 84 kb d'ADN. Deux exons centraux de grande taille (les exons 10 de 1116 pb et 11 de 4932 pb) représentent 59% de la séquence codante. Le transcrit principal de *BRCA2* de 11 kb code pour une phosphoprotéine de 3 418 acides aminés (*Welsh et al. 2001*).

Deux domaines fonctionnels ont été identifiés au niveau de la séquence de *BRCA2* :

➤ 8 éléments répétés constituant le motif BRC se trouvant au niveau de l'exon 11 (**Bork et al. 2004**). Ces domaines composés de 30 à 40 résidus aminés, sont conservés entre plusieurs espèces de

mammifères, suggérant une fonction primordiale. Ces domaines seraient essentiellement impliqués dans la liaison directe avec la protéine de recombinaison et de réparation de l'ADN, RAD51 ;

- 2 sites impliqués dans le signal de localisation nucléaire NLS à l'extrémité carboxy terminal (Spain et al. 2008).

2.2.Fonctions de la protéine BRCA2

2.2.1.Réparation de l'ADN

BRCA2 possède une activité de réparation de cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (Fig.05). Des cellules déficientes en BRCA2 sont plus sensibles aux agents génotoxiques mais ne présentent pas de dérégulations du cycle cellulaire ni de l'apoptose en réponse aux dommages de l'ADN. Elles montrent cependant des dysfonctionnements de l'assemblage du fuseau mitotique (Rodriguez et al. 2000).

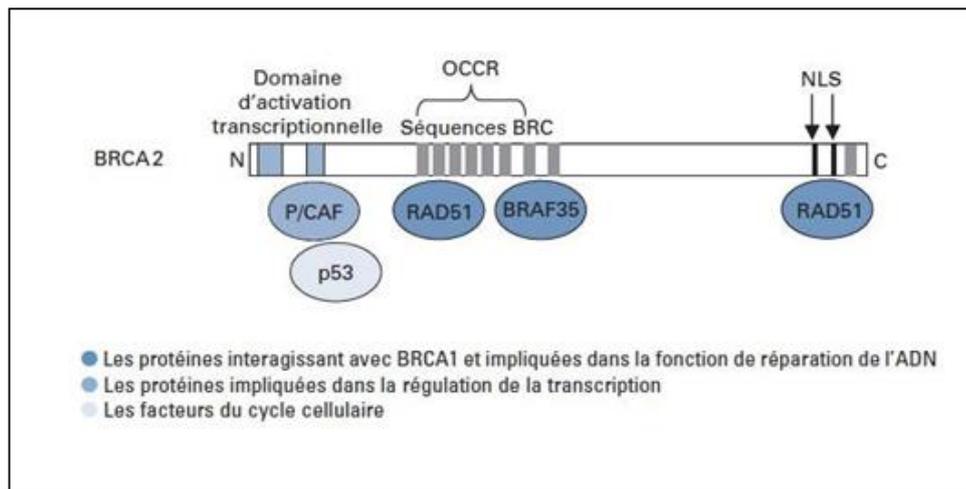


Figure 05 : Principaux domaines fonctionnels de BRCA2 (Rodriguez et al. 2000).

Le complexe BRCA2/RAD51 joue un rôle central dans la réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (Xia et al. 2001). Une mutation d'un site de liaison de RAD51 sur BRCA2 pourrait moduler la capacité de réparation de l'ADN par recombinaison et ainsi entraîner un risque accru de cancer (Galkin et al. 2005). (Fig.07).

2.2.2.Contrôle du cycle cellulaire

Le rôle de BRCA2 dans le contrôle de la transcription et du cycle cellulaire n'est pas bien défini. Un domaine d'activation transcriptionnelle a cependant été mis en évidence dans la région aminoterminal de BRCA2 (Milner et al. 2000). BRCA2 interagit avec la protéine co-activatrice transcriptionnelle P/CAF (p300/CBP associated factor) et pourrait ainsi réguler la transcription par modification de l'acétylation des histones. BRCA2 forme aussi des complexes avec p53, protéine induisant l'arrêt du cycle cellulaire dans le but de permettre la réparation de l'ADN ayant subi des

dommages (*Milner et al. 2000*). L'ensemble de ces observations suggèrent un rôle de BRCA2 dans la régulation du cycle cellulaire.

Les fonctions de BRCA1 et BRCA2 impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN. En réponse aux lésions de l'ADN, BRCA1/2 sont phosphorylées par les protéines kinases ATR, ATM ou CHK2 et vont exercer leurs fonctions de réparation de l'ADN, de régulation de la transcription du cycle cellulaire (**Fig.06**)

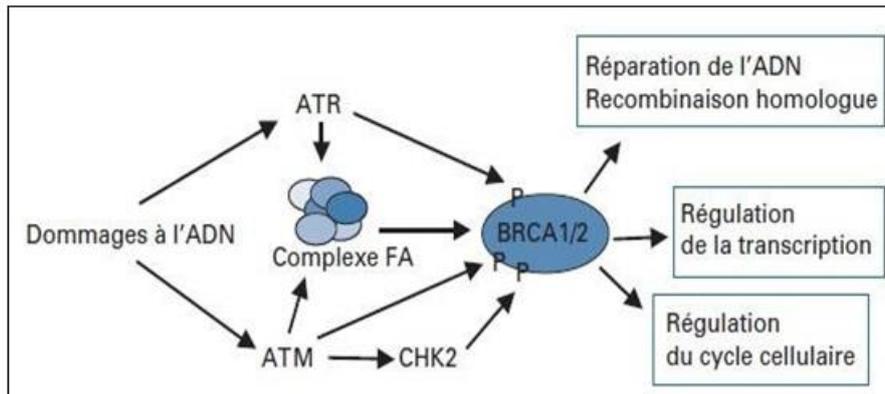


Figure 06 : Les fonctions de BRCA1 et BRCA2 impliquées dans la réponse aux dommages à l'ADN (*Rodriguez et al. 2000*).

II.3. BRCA1/2 et spécificité tissulaire

3.1. Perte d'hétérozygotie

Les individus porteurs d'une mutation inactivatrice dans *BRCA1* ou *BRCA2* sont prédisposés à plusieurs types de cancers mais plus particulièrement aux cancers du sein et de l'ovaire. Plusieurs hypothèses ont été élaborées pour expliquer cette spécificité tissulaire, dont tout récemment celle décrite par Monteiro et ses collaborateurs, où les effets de *BRCA1* sont catégorisés en deux classes d'évènements ; l'évènement dit proximal (primaire) et l'évènement dit distal (secondaire) (*Monteiro et al. 2003*). L'évènement proximal responsable de cette spécificité serait une différence dans la fréquence de perte d'hétérozygotie issue de la recombinaison mitotique au locus de *BRCA1*.

Le phénomène de perte d'hétérozygotie est beaucoup plus fréquent dans les tissus mammaires et ovariens contrairement à d'autres tissus et pourrait expliquer la prédominance de survenue de ces cancers. À ce jour, les mécanismes de LOH (*Loss Of Heterozygosity*) sont plus ou moins bien connus et seraient tumeurs et chromosomes spécifiques. Plusieurs facteurs sont déterminants dans le phénomène de LOH tel que le taux de recombinaison mitotique et méiotique (plus élevé chez la femme ainsi que l'environnement en chromatine. L'expression de *BRCA1* et donc son environnement en chromatine varie lors de différentes étapes du développement de la glande mammaire,). La présence d'éléments répétitifs dans l'ADN est aussi un facteur déterminant dans le LOH : environ 41 % de la

séquence du gène *BRCA1* est composé de séquences Alu versus environ 10% pour l'ensemble du génome (*Mueller et al. 2003*). Les œstrogènes auraient aussi un rôle important à jouer dans cette spécificité tissulaire.

3.2. *BRCA1/2* et œstrogènes

3.2.1. Œstrogène-induction de *BRCA1*

L'expression de *BRCA1* dans le tissu mammaire est augmentée durant la puberté et la grossesse, au moment où les taux d'œstrogènes sont les plus élevés. L'hypothèse d'un lien entre œstrogènes et expression de *BRCA1* est étayée par le fait que les œstrogènes et la progestérone stimulent l'expression mammaire de *BRCA1* chez des souris ovariectomisées (*Marquis et al. 1995*).

De façon concordante, la déplétion en œstrogènes de lignées de cancer du sein RE⁺ réduit l'expression de *BRCA1*, alors que le traitement par œstradiol augmente son expression. Notons cependant qu'il n'existe pas d'élément de réponse fonctionnel aux œstrogènes (ERE, séquence d'ADN spécifique sur laquelle se fixe le complexe récepteur-œstrogène) sur le gène *BRCA1* et que le mécanisme d'induction paraît être indirect (*Bennett et al. 2000*).

Par ailleurs, les œstrogènes induisent un phénotype distinct au niveau de la glande mammaire chez des souris hétérozygotes pour une mutation de *BRCA1* et de *BRCA2*. Ainsi, les souris mutées voient le développement morphologique de leurs canaux galactophores inhibé par l'action des œstrogènes, à la différence des souris non mutées. Ces observations sont en accord avec l'hypothèse que la perte du processus de réparation de l'ADN dans des cellules mammaires ayant une mutation de *BRCA1* ou de *BRCA2* entraîne une inhibition de la croissance et de la différenciation œstrogène-induites.

En conclusion, *BRCA1* et *BRCA2* pourraient participer activement à la prolifération et à la différenciation de la glande mammaire induite par les œstrogènes, en particulier au cours des périodes d'exposition hormonale importante (*Bennett et al. 2000*).

3.2.2. RE α et *BRCA1*

Les œstrogènes se fixent sur leurs récepteurs spécifiques, les RE α et β , qui agissent comme des facteurs de transcription. Le complexe œstrogène-RE se fixe sur la région promotrice de gènes cibles et en active la transcription. Dans les cancers sporadiques, il semble qu'il existe une relation entre l'expression des ARN messagers de *BRCA1* et du RE α (*Catteau et al. 2002*). En outre, la méthylation du promoteur de *BRCA1* apparaît être corrélée à la perte d'expression des RE et des récepteurs à la progestérone (RP) (*Catteau et al. 2002*). À notre connaissance, il n'y a pas d'études disponibles dans la littérature analysant l'expression du second type de RE, appelé RE α , dans les tumeurs chez les porteuses d'une mutation de *BRCA1*.

la réponse cellulaire aux œstrogènes peut être régulée par *BRCA1* (*Hamilton et al. 2003*). Dans des lignées de cancer du sein et de la prostate, *BRCA1* inhibe la transcription de certains gènes impliqués dans la prolifération cellulaire lorsque cette transcription est dépendante des œstrogènes via l'activation du RE α . Cela suggère qu'en plus de maintenir la stabilité du génome pendant des périodes de division cellulaire rapide (comme lors de la puberté ou de la grossesse), *BRCA1* pourrait aussi réduire l'expression de gènes œstrogène-induits. Ainsi, une des fonctions essentielles de *BRCA1* durant la puberté et la grossesse pourrait être de protéger le sein contre l'instabilité génomique secondaire à la prolifération induite par les œstrogènes via l'activation du RE α , d'induire la différenciation et de réparer les lésions de l'ADN. Une étude récente analysant la survenue de cancers chez des jumeaux homozygotes étaye cette hypothèse. La plupart des cancers héréditaires ne seraient pas liés à la succession des événements hormonaux de la vie mais plutôt à la précocité de la puberté résultant possiblement d'une sensibilité anormale de la glande mammaire aux hormones à cette période de la vie (*Hamilton et al. 2003*).

3.2.3. *BRCA1* et expression des RE

Les œstrogènes exercent un effet prolifératif bien caractérisé sur les cellules mammaires possédant des récepteurs aux œstrogènes et ont par là un effet mutagène indirect. En effet, le simple fait d'augmenter la prolifération sous-tend une augmentation du risque d'erreurs de réplication, et donc de mutations (**Fig.07**).

De plus, les œstrogènes peuvent provoquer des lésions directes de l'ADN par leurs métabolites (appelés adduits de l'ADN) (*Liehr et al. 2000*). Cet effet mutagène direct leur confère donc un rôle initiateur potentiel en plus de leur effet promoteur. Ainsi, la perte de fonction de la protéine *BRCA1*, impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN, pourrait rendre la cellule plus sensible aux effets mutagènes, directs ou indirects, des œstrogènes (**Fig.07**) (*Hilakivi et al. 2000*).

Plusieurs hypothèses concernant l'absence d'expression des RE, absence fréquemment retrouvée dans les tumeurs mammaires chez les porteuses d'une mutation de *BRCA1* peuvent être évoquées. D'une part, il a été montré que dans certains cas, l'expression des RE pouvait être régulée négativement sous l'effet des œstrogènes dans les cellules épithéliales mammaires normales et tumorales (*Vaziri et al. 2001*). Cette régulation négative des RE pourrait ainsi constituer un mécanisme de défense cellulaire visant à protéger la cellule vis-à-vis du stimulus œstrogénique prolifératif non contrôlé par la protéine *BRCA1* altérée. L'hypothèse d'une régulation négative des RE sous l'effet des œstrogènes peut être étayée par l'observation d'une négativité des RE observée uniquement en période d'activité génitale dans la cellule mammaire normale (*Vaziri et al. 2001*). La perte d'expression des RE dans les tumeurs avec une mutation *BRCA1* pourrait enfin correspondre à un événement moléculaire tardif de la progression tumorale. Cette perte d'expression des RE serait alors elle-même facilitée par l'instabilité génomique due à la perte de fonction de *BRCA1* (**Fig.08**).

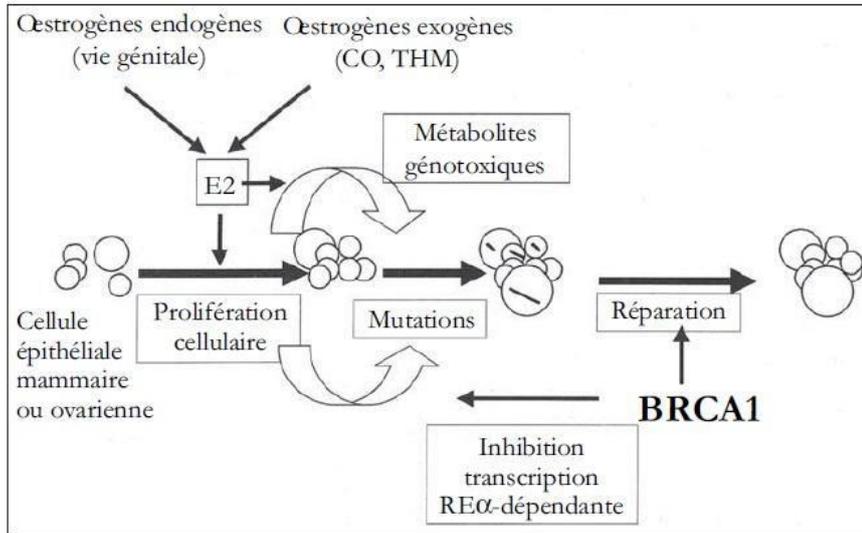


Figure 07 : Rôle de BRCA1 dans le contrôle de la prolifération cellulaire oestrogène dépendante (Rodriguez et al. 2000)..

CO: contraception orale ; THM: traitement hormonal de la ménopause ; E2 : œstradiol ; RE: récepteurs des œstrogènes.

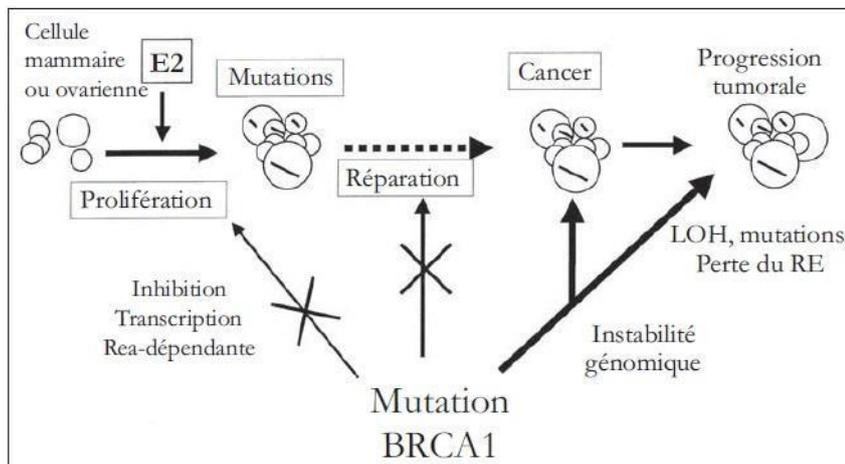


Figure 08 : Hypothèse mécanistique du rôle des mutations de *BRCA1* dans la progression tumorale hormonodépendante (Rodriguez et al. 2000).

II.4. Hormonothérapie : ciblage du RE dans le traitement du cancer du sein

Les principaux traitements du cancer du sein sont, en fonction de l'avancement de la maladie sont la chirurgie, la radiothérapie, l'hormonothérapie et la chimiothérapie. Les cancers du sein positif pour le RE sont les plus fréquemment observés et le développement du cancer du sein est largement associé à l'activité du RE (*Group 2002*). En réponse aux hormones stéroïdiennes, le RE va réguler positivement ou négativement l'expression d'un grand nombre de gènes, ce qui va conduire à une prolifération aberrante des cellules cancéreuses. Le RE est une cible majeure dans le traitement du cancer du sein. Cette approche thérapeutique visant à inhiber l'action du RE et des estrogènes, est plus communément appelée thérapie endocrine ou hormonothérapie. Le ciblage de l'activité des estrogènes et du RE peut se faire à différents niveaux. (*Ignatiadis & Sotiriou 2013*).

Plusieurs molécules anti-estrogéniques regroupées sous le terme SERMs (*Selective Estrogen Receptor Modulator*), vont permettre de bloquer l'action du RE dans les cellules cancéreuses (*Maximov et al., 2013*). Depuis le début des années 70, un anti-estrogène connue sous le nom générique de Tamoxifène, est utilisé dans le traitement du cancer du sein en vue de bloquer l'action du RE. Il s'agit donc d'une référence en terme de thérapie endocrine depuis plus de 30 ans, pour les patientes ayant un cancer du sein ER+. Son efficacité a été prouvée durant toutes ces années dans les cancers du sein, aussi bien à des stades précoces que tardifs. (*Clemons et al., 2002*). Ces dernières années, plusieurs analogues du tamoxifène, tel que le raloxifène et le torémifène, ont permis d'améliorer l'efficacité thérapeutique de ces SERMs (*Maximov et al. 2013*). Toujours dans le cadre de l'hormonothérapie, les anti-aromatases vont bloquer la synthèse des estrogènes, constituant une autre alternative thérapeutique dans les cancers du sein ER+ (*Ma et al., 2015*). Enfin une dernière classe de molécules appelée SERDs (*Selective Estrogen Receptor Downregulator*), vont permettre de diminuer l'expression du RE, afin de réduire son activité (*McDonnell et al., 2015*) (**Fig.14**).

Malgré ce large éventail thérapeutique dans le traitement des cancers du sein ER+, les mécanismes de résistance à l'hormonothérapie sont plus que fréquents (*Hart et al. 2015*). De manière étonnante, dans la plupart des cancers du sein résistant à l'hormonothérapie, le RE est toujours actif et continue d'être exprimé. Plusieurs études ont montré que cette persistance de la signalisation estrogénique, implique de nombreux mécanismes, dont l'augmentation d'expression du RE lui-même et de ses co-activateurs, ou encore son interaction fonctionnelle avec différentes voies de signalisation altérées dans le cancer du sein (*Osborne & Schiff 2011*). Plusieurs mutations dans le gène *ESR1* sont également considérées comme des biomarqueurs prédictifs de résistance à l'hormonothérapie. En effet, il a notamment été montré récemment que la fréquence des mutations de *ESR1* est faible dans les tumeurs primaires, alors qu'elle est plus importante dans les cancers métastatiques, suggérant ainsi une expansion clonale des cellules présentant des mutations dans le gène *ESR1* suite au traitement anti-hormonal (*Wang et al. 2016*). De plus, il est également connu que la perte d'expression du RE au cours de la progression

tumorale est un mécanisme de résistance à l'hormonothérapie. Cette conversion d'un statut ER+ vers un statut ER- doit être pris en considération dans le choix du traitement, car une étude montre qu'elle a été observée dans 15 à 20% des cancers du sein métastatiques résistants à l'hormonothérapie (Hoefnagel et al. 2012).

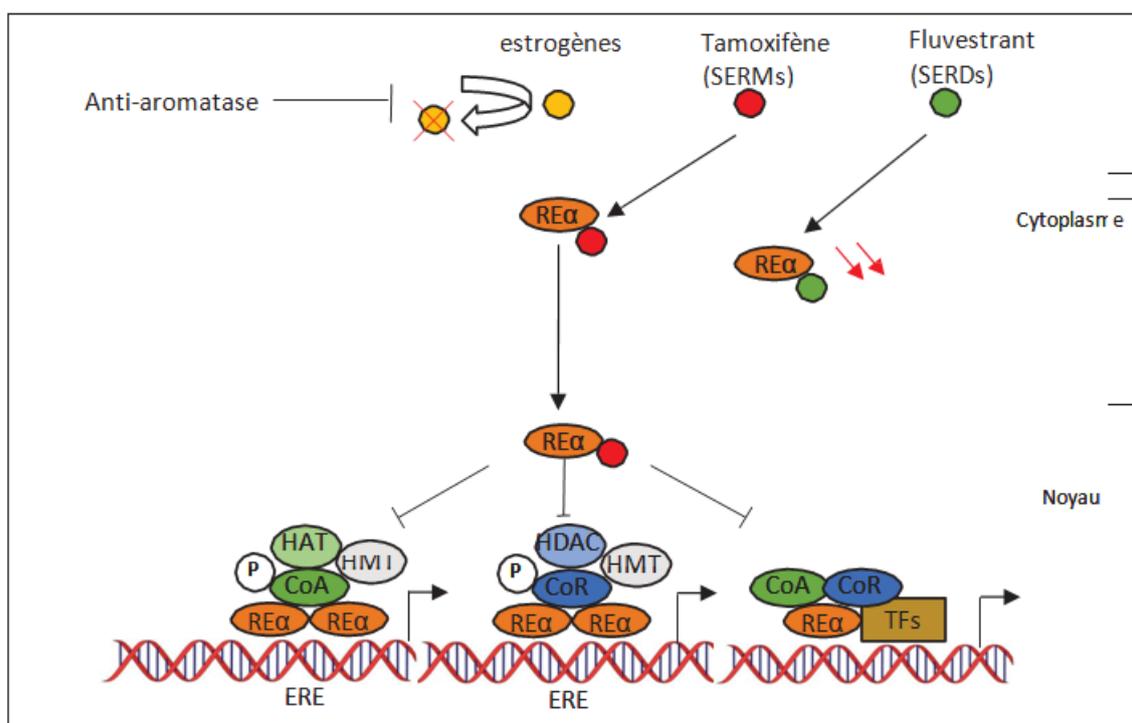


Figure 9 : Mécanismes d'action des différents traitements d'hormonothérapie.
(McDonnell et al., 2015)

Chapitre II



Matériel

Et Méthodes

Introduction :

Notre travail est réalisé au niveau de laboratoire d'anatomopathologie du Docteur Handouze (CHUO) et dans le laboratoire d'anatomopathologie du Docteur Belbachire (EHUO) à Oran et au niveau de laboratoire du Docteur Benchaïbe à Mostaganem (Hopital Che-guevara).

Notre étude est effectuée sur des patientes porteuses d'un nodule, recrutées pour une tumorectomie ou mastectomie avec curage axillaire. Seuls les cas de carcinomes canaux et lobulaires infiltrants ont été retenus et c'est ainsi que nous avons sélectionné 660 patientes pour lesquelles les diverses caractéristiques tumorales sont précisées.

1. La Techniques histologique :

Les différents prélèvements des pièces opératoires (le sein) provenant des services cliniques, de la radiologie ou du bloc opératoire, doivent être acheminés sans délai dans le service d'anatomie pathologique s'ils sont à l'état frais. Fixés, l'acheminement peut être moins rapide.

Les étapes suivantes sont le prélude à l'analyse histologique et au compte rendu. La qualité apportée à la technique est fondamentale.

1.1. Enregistrement :

Lorsqu'un prélèvement parvient au laboratoire, il est enregistré et reçoit un numéro d'identification unique. Celui-ci sera retranscrit sur les blocs et les lames, qui seront examinées au microscope après le traitement technique du prélèvement. Chaque prélèvement doit être accompagné d'une fiche de Renseignements remplie par le médecin prescripteur qui doit mentionner :

- L'identité du patient : nom, prénom(s), date de naissance, sexe ; (**Fig.10**)
- le siège, la date (jour et heure) et la nature du prélèvement (biopsie ou exérèse) ; (**Fig.11**)
- Les circonstances cliniques et par aciniques qui ont motivé le prélèvement et éventuellement les hypothèses diagnostiques ;
- L'aspect macroscopique ou endoscopique des lésions (un compte-rendu opératoire peut être utilement joint), éventuellement l'aspect d'imagerie, en particulier pour les tumeurs osseuses ;
- Les nom et coordonnées du médecin prescripteur et du préleveur, et éventuellement ceux des autres médecins correspondants.

1.2. Fixation :

La fixation est indispensable pour conserver la morphologie cellulaire, elle doit être immédiate ou au moins très rapidement débutée après l'obtention du prélèvement. Toute fixation défectueuse rend l'étude anatomopathologique difficile voire impossible (dessiccation et/ou autolyse du tissu).

Nature du fixateur : le fixateur le plus habituellement utilisé est le formol à 10 % tamponné. Pour les biopsies de petites tailles, des fixateurs à base d'alcool peuvent être utilisés (fixation encore plus rapide, mais effet délétère sur certains antigènes, ce qui peut nuire à des techniques particulières d'immunohistochimie) et fixée les tissus de sein pour protéger le structure du sein.

La durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement : au minimum 2 à 5 heures pour une **petite pièce opératoire** et **16 heures pour une grande pièce opératoire**.

1.3. Mensuration et description des pièces : Etude macroscopique

L'examen macroscopique détaillé est une partie essentielle de l'étude d'une pièce opératoire : la pièce (sein) est examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée. Chaque lésion est repérée sur un schéma et éventuellement photographiée. Ces constatations sont confrontées aux documents cliniques et/ou radiologiques, ce qui souligne l'importance des renseignements écrits fournis par le médecin clinicien. En cas de pièces opératoires complexes (exérèse monobloc de plusieurs organes, ou pièce de résection selon une méthode non conventionnelle), le chirurgien devra adresser la pièce avec des indications de repérage topographique.

Il peut être utile de marquer les berges d'une pièce de résection de tumeur avec une encre indélébile : Ceci ne nuit pas à l'étude histologique et permet d'apprécier exactement la distance entre la tumeur et la limite chirurgicale de la pièce. (Fig.12 ;13)

1.4. Désydratation

Les prélèvements ayant achevé leur fixation sont déposés dans des cassettes en plastique, directement s'il s'agit de biopsies ou, s'il s'agit de pièces opératoires, après l'étape d'examen macroscopique au cours de laquelle sont prélevés des fragments de petite taille (en moyenne 2 x 0,3 cm). (Fig.14 ;15) Puis les tissus contenus dans les cassettes sont déshydratés par passage désydratation . (Tableau III)

Tableau III :Le passage désydratation :

Le passage	Les bains	La durée
1	Formol	1h :30
2	Alcool 100%	1h :30
3	Alcool 80%	1h :30
4	Alcool 60%	1h :30
5	Alcool 50%	1h :30
6	Alcool 30 %	1h :30
7	Alcool 20%	1h :30
8	Toluene ou Xylen	1h :30
9	Toluene ou Xylen	1h :30
10	Parafine	1h :30
11	Parafine	1h :30



Figure 10 : Grande pièce anatomie

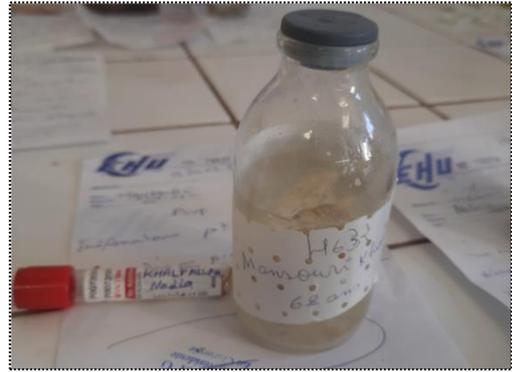


Figure 11 : Petite pièce anatomie



Figure 12 : Etude macroscopique
(<http://www.histalim.com>)



Figure 13 : Etude macroscopique



Figure 14 : Appareil déshydratation



Figure 15 : Appareil déshydratation

1.5. L'inclusion :

L'inclusion se fait dans des cassettes spéciales, la paraffine chauffée à une température de 56 à 58°C pendant 30 min à 1 heure est préalablement filtrée puis versée dans le moule, la pièce étudiée après avoir été orientée est alors immergée dans la paraffine et entièrement recouverte, les blocs démoulés sont étiquetés afin de les référencer. (Fig.16)

1.6. Réalisation des coupes :

En se refroidissant, le fragment, imbibé de paraffine, se trouve inclus dans un bloc solide à partir duquel (Fig. 17 ;18), grâce à un microtome comportant un rasoir, des coupes de 5 microns d'épaisseur sont obtenues. (Fig.19)



Figure 16 : Placer la pièce dans le moule.



Figure 17 : Inclusion en paraffine : Réalisation des blocs



Figure 18: Refroidissement les blocs sur plaque



Figure 19 : Les coupes au microtome

1.7.Étalement sur lames :

Plusieurs motifs de coupe tissulaire sont étalés sur lames (Fig. 20). Les lames sont alors séchées afin d'assurer une bonne adhésion à la lame des tissus avant coloration. (Fig.21)



Figure 20 : étalement les lames



Figure 21 : Bloc de pièce anatomie et leur lame étalée

1.8.coloration :

La coloration utilisée est une coloration de type Hématoxyline-Eosine (HE), largement utilisée en histologie. La coloration usuelle associe un colorant basique nucléaire (hémateïne, hématoxyline) et un colorant acide cytoplasmique (éosine, érythrosine, ou phloxine).(Tableau IV)

Les produits de coloration :



Figure 22 : Xylen



Figure 23 : Alcool



Figure 24 : Hématoxyline



Figure 25 : Carbonate de lithium



Figure 26 : Acétone



Figure 27 : Eosin



Figure 28 : Rinçage par l'eau de robinet

Tableau IV :Les étapes de coloration d'hématoxyline-eosine:

Le passage	La solution	La durée
1	Xylen	2 minutes
2	Xylen	2 minutes
3	Alcool	30 seconde
4	Alcool	2 minutes
5	Rincage (l'eau de robinet)	30 secondes
6	Hématoxyline	2 minutes
7	Rincage (l'eau de robinet)	30 secondes
8	Carbonate de lithium	10 secondes
9	Rincage (l'eau de robinet)	30 secondes
10	Alcool	1 minute
11	Eosin	10 secondes
12	Acétone	10 secondes
13	Acétone	10 secondes
14	Acétone	30 secondes
15	Xylen	1 minute

1.9.Montage des lames :

La phase de montage représente la dernière phase de la coloration. Elle consiste à couvrir la coupe par une lamelle (**Fig.29**) soigneusement posée sur une grosse goutte de leukit (**Fig.30**) des petites pressions sur la lamelle permettent l'élimination complète des bulles d'aires, qui entravent l'observation au microscope. (**Fig.31**)



Figure 29 : Lamelle de montage



Figure 30 : Résultats de montage



Figure 31 : Leukit

1.10.Etude en microscopie optique :

L'observation des coupes colorées est effectuée à l'aide d'un microscope optique. Cet appareil permet d'obtenir une image agrandie (20 à 1000 fois) par une combinaison optique de la coupe éclairée par une lumière qui la traverse.

Colorant	Affinité	Coloration
Hématoxyline	Noyaux	Violet
L'éosine	Cytoplasme	Rose

2. Technique immunohistochimique :

Les techniques d'immunohistochimie (IHC) sont réalisées sur les prélèvements fixés et inclus en paraffine contenant les tumeurs primitives pour la détermination des facteurs moléculaires avec les anticorps spécifiques. Après le repérage de la composante carcinomateuse infiltrante, les carcinomes canaux ou lobulaires infiltrants sont délimités sur lame en vue de l'étude immunohistochimique. La technique immunohisto-chimique est comparable pour les récepteurs hormonaux RH, pour l'oncoprotéine HER2 et pour les cytokératines en tenant compte des spécificités de chaque anticorps. La sensibilité et la spécificité de détection immunohistochimique des récepteurs sont très variables en fonction du fixateur, du type de prétraitement, de l'anticorps primaire et de la méthode de révélation.

La première partie de l'étude IHC permet de préciser le statut des récepteurs RE/RP et HER2 pour les 120 tumeurs .

2.1. Le repérage de la composante carcinomateuse infiltrante :

Ce repérage est réalisé en l'histologie. C'est une étape indispensable puisque la mise en évidence des récepteurs par les anticorps spécifiques au niveau de la tumeur ne prend en compte que la composante infiltrante. La réalisation des témoins internes et/ou externes est capitale.

2.2. La confection des coupes :

Des coupes de 2 à 4 μ réalisées au microtome sont montées sur lames traitées au 3-aminopropyltriéthoxy-silane à 2% (Sigma). Les coupes sont étiquetées (RE, RP, HER2 et CK5/6 et Ki67) et collées à l'albumine bovine (Dako) sur plaque chauffante .

2.3. Protocole de technique immunohistochimie

2.3.1. Déparaffinage :

Les lames, rangées dos à dos et placées dans un porte lames, subissent un prétraitement thermique dans l'étuve à 37°C durant 24 heures.

2.3.2. Réhydratation

Mettre le porte lame qui contient les lames de immunohistochimie dans des bains qui contient :

Le passage	La solution	La durée
1	Xylen	10 min
2	Xylen	10 min
3	Alcool 100%	10 min
4	Alcool 90%	10 min
5	Alcool 70%	1 min
6	Alcool 50%	1 min
7	L'eau distilé	5 min



Figure 32 : Les étapes de Réhydratation .

2.3.3. Démasquage

Préparer bacs avec solution pH6 ou pH9 (Fig.33), les disposer dans le bain marie à 92-98° y déposer le panier de lame 40-45 min . (Fig.34)



Figure 33 : Solution pH 6 et pH 9 .



Figure 34 : Solution pH 6 et pH 9 dans bain marie .

Après 45 minutes , refroidir les bacs en les déposants dans un bain d'eau du robinet quelques minutes . (Fig.35)



Figure 35 : Refroidissement les solution pH par l'eau de robinet

Après le refroidissement , rincer avec le TBS (Fig.36) et cercler l'échantillon avec le novopen.(Fig.38)



Figure 36 : Rincage par TBS

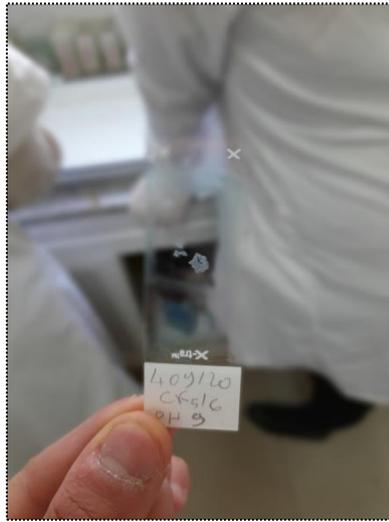


Figure 37 : Lame sans cerclage



Figure 38 : Cercler lame avec Novopen

Utilisation du kit Novocastra



Figure 39 : Coffre de kit Novocastra

Avant d'utilisé le coffre de novocastra (Fig.39), il faut preparer une chambre noire humide (Fig.40) et mettre les lames immunohistochimie dans la chambre noire . (Fig.41), (Fig.42)



Figure 40 : Chambre noire



Figure 41 : Les lames dans la chambre noire



Figure 42 : Chambre noire fermé

2.3.4. Protocole de kit Novocastra :

✓ **Etape 1 : Bloquet peroxydase (peroxydase block)**

Mettre 2 gouttes de Peroxydase (**Fig.43**) dans tous les lames d'immunohistochimie (**Fig.44**) pour bloquer l'activité de peroxydase et faire chambre noire pendant 10 minutes (**Fig.45**) et après 10 minutes rincer avec le TBS . (**Fig.46**)



Figure 43 : Peroxydase block



Figure 44 : 2 gouttes de peroxydase sur les lames



Figure 45 : Chambre noire fermé



Figure 46 : Rincage par TBS

✓ **Etape 2 : Bloquet les proteines (Protein block)**

Mettre 2 gouttes de protein block (**Fig.47**) dans tous les lames d'immunohistochimie (**Fig.48**) pour bloquer les activités de protéines et faire chambre noire pendant 5 minutes (**Fig.49**) et après 5 minutes rincer avec le TBS .(**Fig.50**)



Figure 47 : Protein block



Figure 48 : 2 gouttes de Protein block sur les lames



Figure 49 : Chambre noire fermé



Figure 50 : Rincage par TBS

✓ **Etape 3 : Déposer les anticorps**

Mettre 20 ul d'anticorp (Fig.51 ;52) dans tous les lames immunohistochimie (Fig.53) (chaque lame possede un anticorp spécifique) pendant 45 minutes dans le chambre noire (Fig.54) pour voire s'il ya un tumeur ou pas , avec le degré de tumeur , Après 45 minutes rincer par le TBS . (Fig.55)



Figure 51 : Les anticorps d'immunohistochimie



Figure 52 : Les anticorps de cancer du sein (Ro , Rp , Here 2 , ki67)



Figure 53 : Déposer les anticorps dans les lames d'immunohistochimie



Figure 54 : Chambre noire



Figure 55 : Rincage par le TBS

✓ **Etape 4 : Déposer les anticorps secondaire (Post primary)**

Mettre 2 gouttes d'anticorp secondaire (**Fig.56**) dans tous les lames d'immunohistochimie (**Fig.57**) pour la confirmation les tumeurs dans les échantillons et faire chambre noire pendant 30 minutes (**Fig.58**) , après 30 minutes rincer par le TBS . (**Fig.59**)



Figure 56 : L'anticorp secondaire (Post primary)



Figure 57 : Mettre 20ul de Ac seconadaire dans les lames IHC



Figure 58 : Chambre noir



Figure 59 : Rincage par le TBS

✓ **Etape 4 : Déposer les polymères**

Mettre 2 gouttes de polymere (**Fig.60**) dans tous les lames d'IHC (**Fig.61**) pour eliminé tous les polymere dans les echantillons et faire chambre noire (**Fig.62**) pendant 30 minutes , après 30 minutes rincer par le TBS . (**Fig.63**)



Figure 60 : Novolink Polymere



Figure 61 : Deposé 2 gouttes de novolink polymere dans tous les lames IHC



Figure 62 : Chambre noire pendant 30 minutes



Figure 63 : Rincage par le TBS

✓ **Etape 5:** Déposer le novocastra DAB chromogene

Mettre 20ul de solution DAB chromogene (**Fig.64**) dans tous les lames d'IHC (**Fig.65**) pour donné la coloration maron et pour voir le tumeur dans les echantillons et faire chambre noire (**Fig.66**) pendant 3 minutes , après 3 minutes rincer par le TBS . (**Fig.67**)



Figure 64 : Novocastra DAB chromogene



Figure 65 : Déposé 20ul de solution novocastra DAB chromogene



Figure 66 : Chambre noire pendant 3 minutes



Figure 67 : Rincage par le TBS

✓ **Etape 6:** Déposer l'hématoxyline

Mettre 2 gouttes d'hématoxyline (**Fig.68**) dans tous les lames d'IHC (**Fig.69**) et faire chambre noire pendant 5 minutes , après 5 minutes rincer par :

- L'eau de robinet pendant 3mn et nous mettre les lames d'IHC dans le porte lames . (**Fig.70**)
- Le TBS pendant 3mn . (**Fig.71**)
- L'eau distilé pendant 3mn . (**Fig.72**)

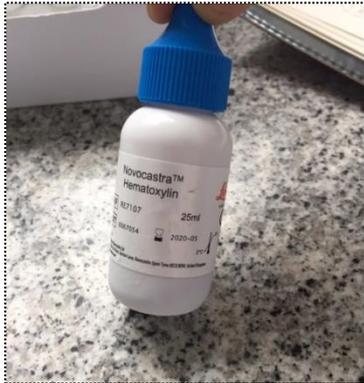


Figure 68: Novocastrol hématoxyline



Figure 69 : Déposer 2 gouttes d'hématoxyline dans tous les lames IHC



Figure 70 : Rincage les lames par l'eau de robinet



Figure 71 : Rincage par le TBS



Figure 72 : Rincage par l'eau distilé

2.3.5. déshydratation:

Mettre le porte lame qui contient les lames de immunohistochimie dans des bains qui contient :

Le passage	La solution	La durée
1	L'eau distilé	5 min
2	Alcool 50%	1 min
3	Alcool 70%	1 min
4	Alcool 90%	10 min
5	Alcool 100%	10 min
6	Xylen	10 min
7	Xylen	10 min

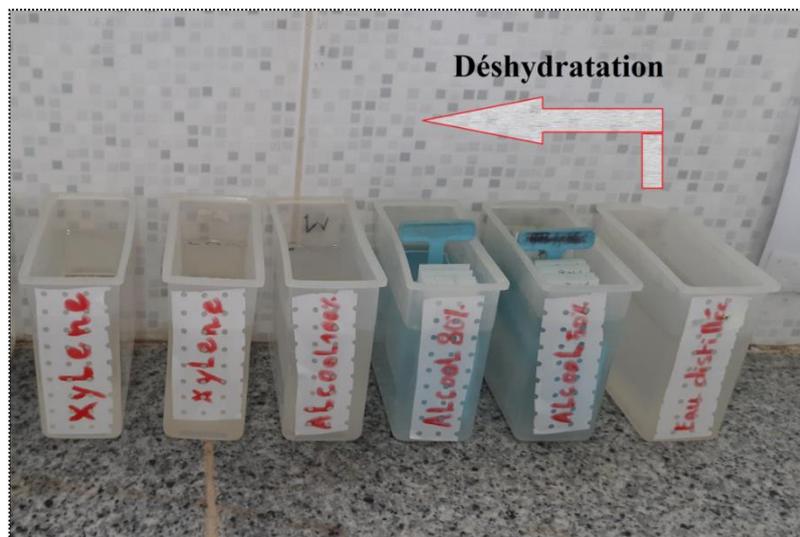


Figure 73 : Les étapes de déshydratation

2.3.6. Montage les lames d'IHC :

La phase de montage représente la dernière phase de la IHC . Elle consiste à couvrir la coupe par une lamelle (Fig.74) , soigneusement posée sur une grosse goutte de leukit (Fig.75) des petites pressions sur la lamelle permettent l'élimination complète des bulles d'aires, qui entravent l'observation au microscope. (Fig.76)



Figure 74 : Lamelle de montage



Figure 75 : Résultats de montage



Figure 76 : Leukit

Chapitre III



Résultats

ET Discussion

III-RESULTATS ET DISCUSSION :

Les résultats de notre étude portent sur **660 cas** de carcinomes mammaires infiltrants, montrent une répartition variable selon les paramètres cliniques, histopathologiques et biologiques, diagnostiqués au service d'anatomie pathologique et déterminés par immunohistochimie.

➤ Les résultats sont exposés en quatre parties :

1 - Etude des caractéristiques globales des **660 cas** de carcinomes infiltrants.

1-1-Analyse des paramètres clinico-pathologiques des carcinomes infiltrants.

1-2-Analyse des paramètres biologique.

2- Détermination des paramètres d'immunohistochimie des sous-types moléculaires.

3 - Etude des caractéristiques de sous-type triple-négatives.

3-1-Analyse des paramètres clinico-pathologiques de tumeurs triple-négative.

4- Comparaison des tumeurs triple-négatives versus non triple-négatives .

1.Caractéristiques globales de carcinome infiltrant :

Notre analyse globale des données mises en œuvre dans l'étude des carcinomes mammaires est réalisée sous forme de tableaux résumant l'ensemble des résultats obtenus.

1.1.Caractéristiques clinico-histopathologiques :

L'étude histologique des prélèvements permet de préciser les paramètres tumoraux tels que : l'âge, la taille tumorale, le type histologique, le grade SBR, l'envahissement ganglionnaire, le type de prélèvement, localisation de la tumeur. (**Tableau VII**)

Tableau V: Les résultats de l'analyse **histopathologique** des carcinomes infiltrants (660cas).

	Age moyen des patients	Taille tumorale Pt			Type Histologique		Envahissement Ganglionnaire N selon					
							Ganglion lymphatique		Classification TNM			
		T1	T2	T3	CCI	CLI	N+	N-	N0	N1	N2	N3
Carcinomes infiltrants 660 cas	50 ans	47%	51%	2%	81%	19%	65,23%	34,47%	24,26%	29,33%	20,85%	13,87%

Grade histopronostic SBR			Localisation de la tumeur			Type de prélèvement			
SBR I	SBR II	SBR III	Gauche	Droite	Bilatérale	Mastéctomie	Tumectomie	Biopsie	Cytoponction
5,30%	65,15%	29,55%	54,09%	45,45%	0,45%	49,86%	27,42%	11,51%	11,21%

La première partie de notre travail concerne l'étude histopathologique des carcinomes infiltrants et

montre les caractéristiques péjoratives dominantes des tumeurs chez les 660 patientes.

- ✓ L'âge varie entre [20-89].
- ✓ Age moyen : **50 ans**.
- ✓ Taille post-chirurgicale : **pT1 (47%), pT2 (52%) et pT3 (2%)**.
- ✓ Type histologique : **CCI (81%)**.
- ✓ Envahissement ganglionnaire selon :
 - Ganglions lymphatiques : **pN+ (65,23%)**.
 - Classification TNM : **pN2 (29,33%)**.
- ✓ Grade histopronostique : **SBRII (65,15%)**.
- ✓ Sein atteint : **Gauche (54,09%)**.
- ✓ Type de prélèvement : **Mastectomie (49,86%)**.

- Ces résultats concordent avec les travaux de (Guedouar et al.2014, 2017), (Ladjeroud a.,2018), (Nait behloul n.,2018), (Ouattara h.,2018).

1.2.Caractéristiques Biologiques :

L'étude biologique des prélèvements permet d'analyser les récepteurs hormonaux (RE et RP) et l'oncoprotéine HER2 et le marqueur de prolifération KI67. (Tableau V) .

Analyse de l'expression des facteurs biologique des carcinomes infiltrants (660cas) chez les femmes avec l'âge des patientes varie entre [20-89].

Tableau VI:Les résultats d'analyse des récepteurs biologique des carcinomes infiltrants (660cas).

	Récepteurs Biologiques Spécifiques							
	Récepteurs œstrogènes RE		Récepteurs progestérone RP		Récepteurs oncoprotéines HER2		Récepteurs antigène Ki67	
	RE-	RE+	RP-	RP+	HER2- (Score 0-1)	HER2+ (Score 2-3)	Ki67++ Modéré	Ki67+++ Fort
Carcinomes infiltrants 660 cas	39%	58%	39,54%	57,27%	71,96%	28,02%	38%	58%

L'analyse immunohistochimique, met en évidence la prédominance des récepteurs biologiques de mauvais pronostic au niveau des carcinomes infiltrants :

- ✓ Récepteurs hormonaux : RE+ 58% ; RP+ 57,27%.
- ✓ Oncoprotéine HER2 : HER2- (score 0-1) 71,96%.
- ✓ Antigène Ki67 : Ki67+++ Fort 58%.

- Ces résultats rejoint les données et concordent avec ceux de la littérature et les travaux de (Guedouar et al. 2014, 2017), (Ladjeroud,2018), (Nait behloul,2018), (Ouattara,2018).

2. Détermination immunohistochimique des sous-types moléculaires :

L'étude biologique de profil génomique de l'ensemble des 660 cas de notre série permet de déterminer la classification des cancers du sein en 4 groupes : luminal A et B, HER2, triple négative selon l'expression des paramètres biologiques étudiés : RE, RP, HER2, Ki67.

La technique utilisée est l'immunohistochimie qui permet d'identifier et de localiser des protéines spécifiques sur une coupe de tissu.

2.1. Expression des sous-types luminal A et B :

- Le sous-type Luminal, majoritairement RE+, comprend deux groupes : **luminal A** et **luminal B** selon l'intensité du marquage **des RE**.
- Les résultats montrent que Sur les **660 patients**, Luminal A a été trouvé chez **64 patients** avec marquage nucléaire intense des récepteurs estrogénique et **absence** d'expression de HER2.
- Le phénotype de luminal A est : **RE++**, **RP+**, **HER2-**, **Ki67 faible (<20)**. (Fig.77). Les tumeurs de luminal A sont souvent de bas grade histologique
- Les résultats montrent que Sur les **660 patients**, Luminal B a été trouvé chez **52 patients** avec marquage nucléaire intense des récepteurs estrogénique et **présence** d'expression de HER2. (Fig.77)
- Le phénotype de luminal B est : **RE+**, **RP+/-**, **HER2-**, **Ki67 fort (>20)**. Les tumeurs de luminal B sont habituellement de haut grade histologique.
- Les résultats montrent que **544** des patientes **déterminées a des autres groupes (HER2, triple négative)**.
- Nos résultats concordent avec ceux de la littérature et les travaux de (Guedouar et al. 2011, 2014, 2017), (Nait behloul n.,2018).

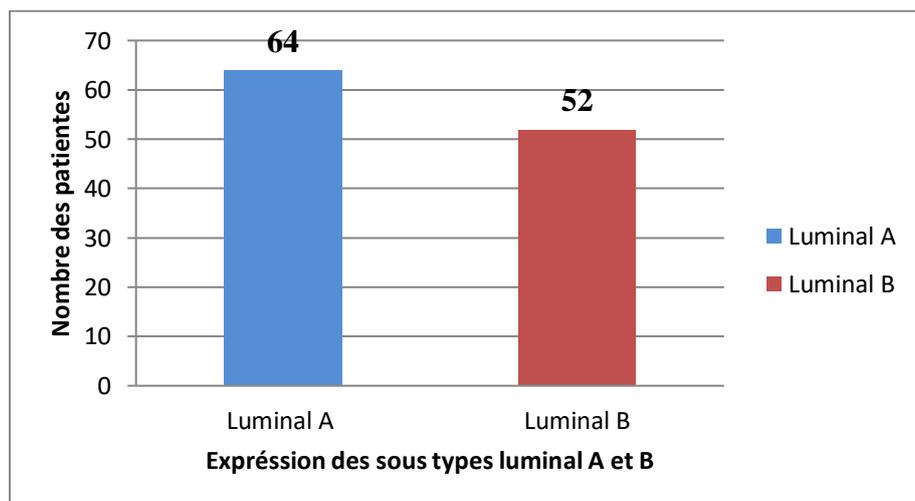


Figure 77 : Proportion des tumeurs luminal A et luminal B

2.2.Expression le Sous-type HER2:

- La présence du HER2 positive pour l'ensemble des cas (**660 patients**) est retrouvée dans **15 % (98 patientes)** avec fort d'expression de HER2. (**Fig.78**)
- Le phénotype de HER2 est : **HER2+, RE-, RP-, ce qui reflète un mauvais pronostic.**
- Les résultats montrent que Sur les 660 patients, HER2 négative (non HER2) est retrouvé dans **85% (562 patients)** avec absence d'expression de HER2. (**Fig.78**)
- Notre résultat concorde avec ceux de la littérature les travaux de (**Guedouar et al. 2011, 2014, 2017**), (**Nait behloul N.,2018**).

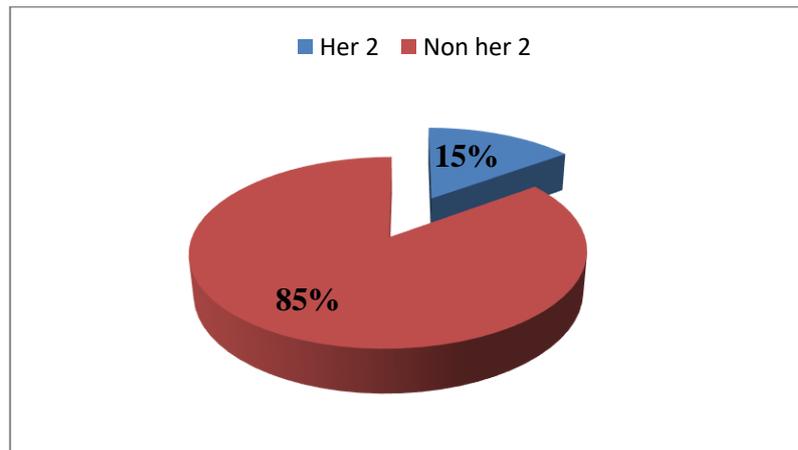


Figure 78 : Répartition des patientes selon Expression de HER2.

2.3.Expression lesous-type triple-négatif :

- Les triple-négatifs/basal-like sont un sous-type particulier au sein des carcinomes mammaires Caractérisé par l'absence d'expression des RE, RP et HER2 et l'expression de cytokératine CK 5/6.
- Le phénotype des triple-négatifs est : **RE-, RP-, HER2-.**
- Le phénotype des triple-négatifs/basal-like est : **RE-, RP-, HER2-, CK5/6+.**
- Les résultats montrent que Sur **les 660 patients**, les tumeurs de triple négative a été trouvé chez **113 patients** avec marquage l'absence d'expression des RE, RP et HER2. (**Fig.79**)
- Les résultats montrent que Sur les **660 patients**, les tumeurs non triple négative a été trouvé chez **547 patients** avec marquage présence d'expression des RE, RP et HER2 et l'expression de cytokératine CK5/6. (**Fig.79**)
- Ce résultat est similaire aux travaux de (**Guedouar et al, 2011, 2014, 2017**), (**Nait Behloul n.,2018**). Ceci met l'accent sur l'agressivité et la prédominance des tumeurs de pronostic sombre en Algérie.

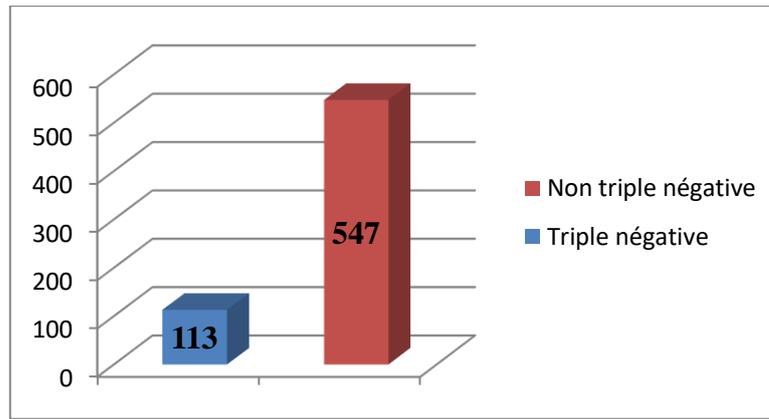


Figure 79 : Répartition des patientes selon sous type Triple négative.

3. Caractéristiques de tumeurs triple-négatives:

L'analyse immunohistochimique des marqueurs biologiques (RE, RP, HER2), au niveau de la composante infiltrante des carcinomes, a permis de répertorier **113 cas** de tumeurs négatives pour les trois récepteurs : ces tumeurs constituent les carcinomes triple-négatifs.

L'ensemble des paramètres clinico-pathologiques est déterminé en vue de mettre en évidence les spécificités de ce groupe de tumeur.

3.1. Caractéristiques clinico-histopathologiques :

Dans notre travail nous avons réalisé la répartition des patientes selon les paramètres cliniques. L'étude histologique des prélèvements permet de préciser les paramètres tumoraux tels que : l'âge, la taille tumorale, le type histologique, le grade SBR, l'envahissement ganglionnaire.

3.1.1. Répartition selon age des patientes (113 cas):

La majorité des 113 patientes se répartit entre 20 et 89 ans avec un âge moyen de 50,53 ans et 53,09% des patientes ont moins de 50 ans.

L'analyse du paramètre clinique âge montre que les tumeurs triple-négatives sont fréquentes chez les femmes jeunes, (Fig.80).

L'âge est un facteur clinique important car il est lié au statut hormonal de la femme, (moins de 50 ans étant l'âge de la ménopause admis statistiquement).

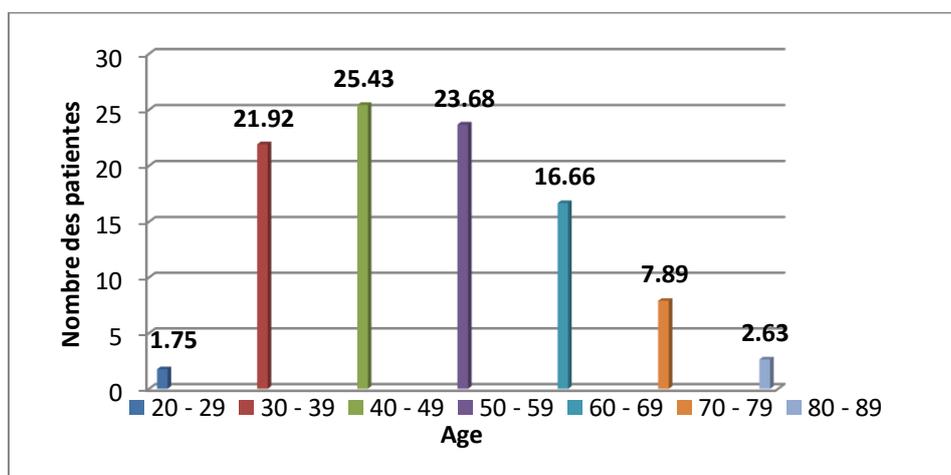


Figure 80 : Répartition des patientes selon l'age (n=113)

3.1.2. Répartition selon la localisation de la tumeur:

Les résultats montrent que dans les carcinome triple négative, le côté gauche est le plus atteint avec 51% (**58 patientes**), suivi du côté droit, 49% (**55 patientes**), (**Fig.81**). De manière générale, l'atteinte du sein gauche a été prédominante par rapport au sein droit, ce qui est trouvé dans les travaux de (**Nait behloul n.,2018**), (**Ouattara h.,2018**),(**Engbang et al,2015**).

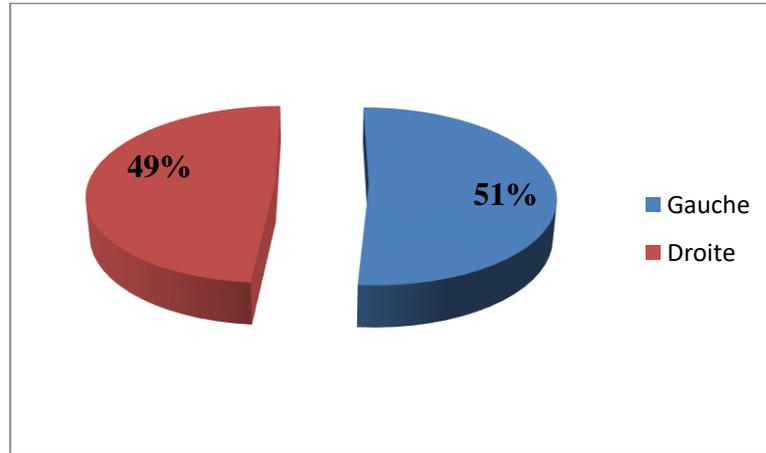


Figure 81 : Répartition selon la localisation de la tumeur

3.1.3. Répartition selon le type de prélèvement

Les résultats montrent que dans les carcinome triple négative, les prélèvements sont analysés par la mastectomie avec un pourcentage de 50% (**72 patientes**) des cas et le tumorectomie avec un pourcentage de 36,27% (**42 patientes**), (**Fig.82**).

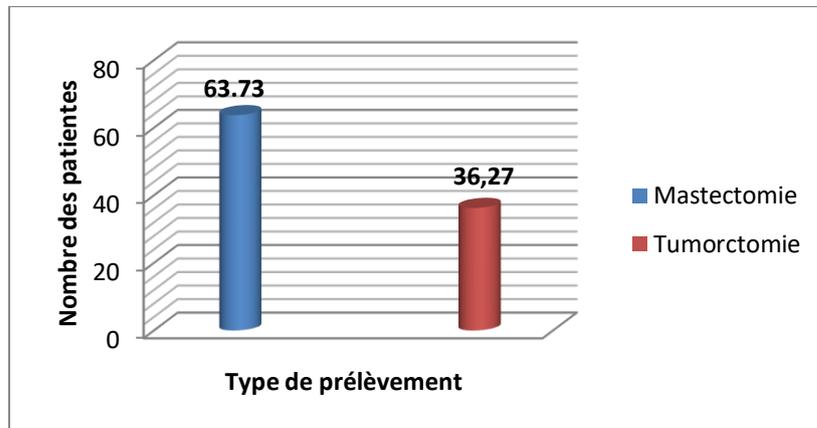


Figure 82 : Répartition selon le type de prélèvement

3.1.4. Répartition selon la taille tumorale :

- Dans notre série, La taille varie de **pT1 à pT4 (0,3 cm et 9,3) cm.**
- La taille post chirurgical (pT) des tumeurs déterminées par la classification pTNM
- Les résultats montrent que la fréquence de **pT1 est de 61%,(0 à 2cm)** et la fréquence de **pT2 est de 36%, (2 à 5 cm)** et la fréquence de **pT3 est 3%, (5 à 7 cm).**(Fig.83)
- Les résultats montrent que la taille tumorale **pT1 et pT2 sont dominants**, ce qui concorde avec les travaux de **(Ladjeroud a.,2018), (Nait behloul n.,2018), (Ouattara h.,2018).**

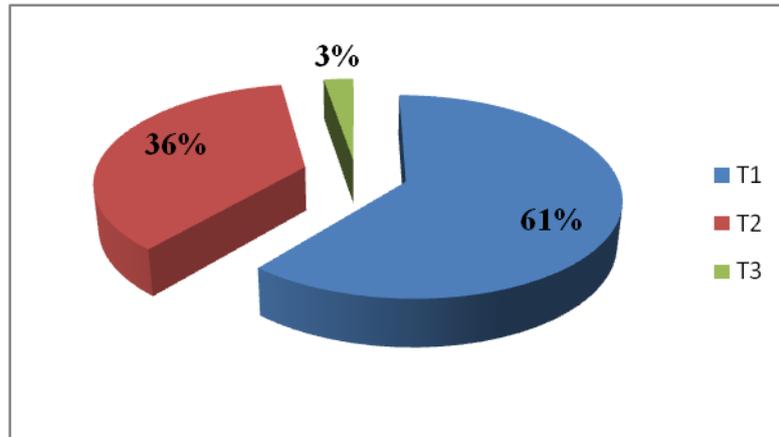


Figure 83 : Répartition des tumeurs selon la taille pt.

3.1.5. Répartition des cas en fonction de types histologique

Sur le plan histologique, le carcinome canalaire infiltrant (CCI) est prédominant avec 88% des patientes, suivis par le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) qui représentent 12%. (Fig.84)

➤ Ces résultats rejoint les données de la littérature et les travaux de **(Guedouar et al. 2014, 2017)**, **(Ladjeroud a.,2018), (Nait behloul n.,2018)** qui révèlent que le carcinome canalaire est la forme histologique la plus fréquente.

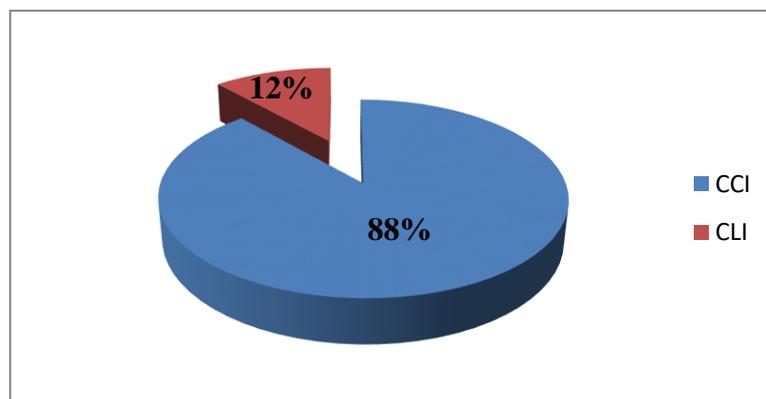


Figure 84 : Répartition des patientes selon le types histologique .

3.1.6. Répartition selon des ganglions selon N.

3.1.6.1. Répartition selon des ganglions lymphatique selon N.

Pour les triple-négatifs la diffusion métastatique aux ganglions lymphatiques axillaires est présente dans 68% des cas : c'est un élément majeur de mauvais pronostic, ce qui souligne une évolution défavorable. (Fig.85), Ce résultat est confirmé dans plusieurs études, (Guedouar et al. 2014, 2017).

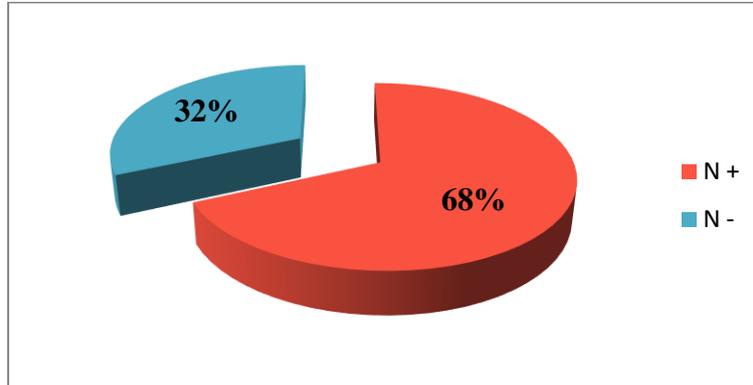


Figure 85 : Répartition selon des ganglions lymphatique N.

3.1.6.2. Répartition selon classification TNM :

L'analyse de la chaîne ganglionnaire axillaire est un facteur important pour prédire les rechutes métastatiques et la survie des patientes.

- Les résultats montrent que **40%** des patientes (**n=45**) marque l'absence des ganglions envahis (**N0**). (Fig.86).
- Les métastases ganglionnaires sont classées en **N1** (de **1 à 3 ganglions** envahis) dans **56%** des cas (**n=63**). (Fig.86)
- La classe **N2** (de **4 à 9 ganglions** envahis) ne représente que **4%** des cas (**n=5**). (Fig.86).
- Ces résultats concordent avec la littérature et les travaux de (Guedouar et al 2014, 2017), (Ladjeroud a.,2018), (Nait behloul n.,2018) qui révèlent que la chaîne ganglionnaire axillaire de **classe N1** est la plus fréquente par rapport les autres classe (**N0, N2, N3**).

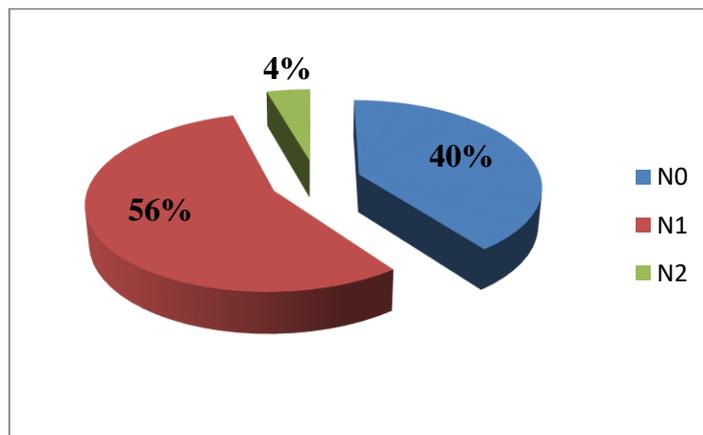


Figure 86 : Répartition des patients selon classification TNM

3.1.7. Répartition selon le Grade SBR :

La classification histopronostique de Scarff et Bloom-Rechandson (SBR) permet de distinguer 3grades : **SBR I**, **SBR II** et **SBR III**.

Les résultats montrent que dans les carcinome triple négative , le **Grade II** est le plus fréquent avec une fréquence de **69,91% (79 patientes)** , il est considéré comme de pronostic incertain , les tumeurs faiblement différenciées (**grade III**) représente une fréquence de **23,89% (27 patientes)** , alors que le **grade I** qui représente les tumeurs très différenciées de bon pronostic n'est trouvé que chez **6,19% (29 patientes)** (**Fig.87**), Ces résultats sont confirmés dans plusieurs études, (**Guedouar et al. 2014, 2017**), (**Nait behloul n.,2018**), (**Ouattara h.,2018**) .

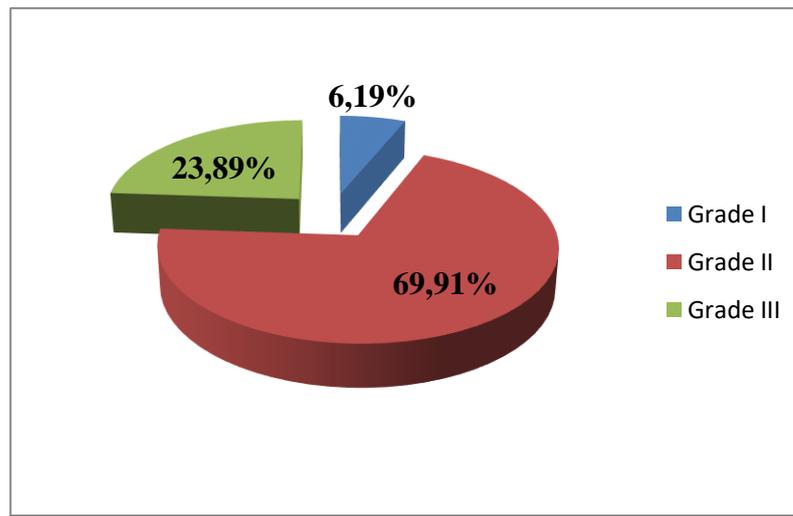


Figure 87 : Répartition des tumeurs selon le Grade SBR.

4. Comparaison des tumeurs triple-négatives versus non triple-négatives:

Sur la base de l'ensemble de nos données cliniques, histologiques et biologiques, une comparaison est effectuée entre différents groupes de tumeurs.

- Groupe 1 : Carcinomes infiltrants de notre série, (660 cas).
- Groupe 2 : Carcinomes infiltrants triple-négatifs. Ce groupe est déterminé par l'étude immunohistochimique des récepteurs RE, RP, HER2, (113 cas).
- Groupe 3 : Carcinomes infiltrants non triple-négatifs, (547 cas). Ce groupe est caractérisé par le marquage positif de RE et/ou RP et/ou HER2.

Tableau VII: Les résultats de cette analyse sont résumés dans le tableau suivant :

Caractéristiques analysées		Carcinomes infiltrants 660 cas	Carcinomes infiltrants Triple-négatifs 113cas	Carcinomes infiltrants Non triple-négatifs 547cas
Age moyen des patientes		50 ans	46,43 ans	50,58 ans
Femmes de moins 50 ans		59,09%	66,43%	44,60%
Taille tumorale pT3		2,72%	3%	2,74%
Grade histopronostique SBR III		29,55%	23,89%	22,30%
Envahissement ganglionnaire N+		65,23%	68%	60,48%
Récepteurs œstrogène RE	RE-	39%	100%	11,51%
	RE+	58%	0%	57,40%
Récepteurs progestérone RP	RP-	39,54%	100%	13,71%
	RP+	57,27%	0%	57,03%
Récepteurs oncoprotéine HER2	HER2- (Score 0-1)	71,96%	100%	52,10%
	HER2+ (Score 2-3)	28,02%	0%	27,42%

Après détermination et sélection des tumeurs triple-négatives (113cas) de la totalité des carcinomes infiltrants (660cas), nous constatons que les carcinomes non triple-négatifs (547cas) présentent un meilleur profil pour l'ensemble des caractéristiques étudiées tels que l'âge, la taille tumorale T3, le grade SBR III, l'envahissement ganglionnaire N+ et les facteurs biologiques (RE, RP, HER2) comme le montre le tableau ci-dessus.

La comparaison des tumeurs triple-négatives (TN), versus les non triple-négatives (non TN) montre que :

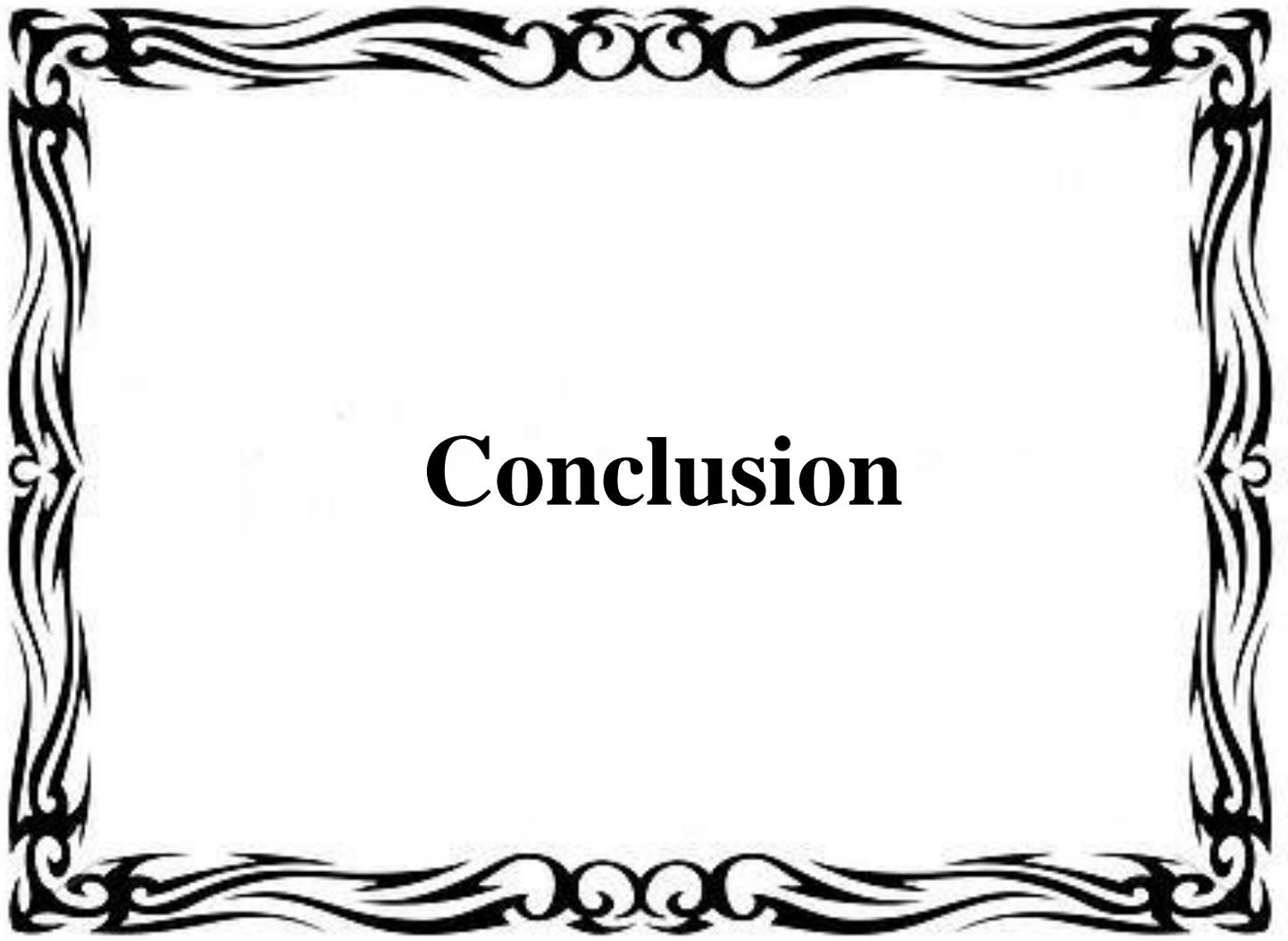
- ✓ Les TN apparaissent à un âge plus jeune : (46,43 ans versus 50,58 ans)
- ✓ Les femmes de moins de 50 ans sont plus touchées : 66,43% versus 44,60%.
- ✓ La taille tumorale T3 prédomine : 3% versus 2,74%.
- ✓ Le grade histopronostique SBR III est majoritaire : 23.89% versus 22.30%.
- ✓ L’envahissement ganglionnaire N+ est augmenté : 68,33% versus 60.48%.

De plus, l’analyse des paramètres biologiques est défavorable dans les tumeurs TN comparativement aux tumeurs non TN :

- | | | |
|---|---|---|
| <ul style="list-style-type: none"> • RE- : 100% versus 11,51%. • RP- : 100% versus 13,71%. • HER2+ : 0% versus 27,42%. | } | RE-, RP-, HER2+ étant corrélés
à un pronostic péjoratif. |
|---|---|---|

Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature et de nombreux auteurs rapportent le caractère agressif des tumeurs TN qui sont identifiées comme de mauvais pronostic, (**Perou, 2001; Sorlie, 2003; Sotiriou, 2006; Mathieu, 2007; Charafe-Jauffret, 2007; Mathieu, 2010**).

L’analyse immunohistochimique des tumeurs RE- RP- HER2-, associées à un pronostic défavorable, est importante car ce groupe ne dispose pas encore de thérapie spécifique.



Conclusion

Conclusion

Conclusion :

Le cancer du sein est une maladie hétérogène. Cette hétérogénéité se retrouve aussi bien au niveau histologique que phénotypique et moléculaire.

Cette hétérogénéité de profils moléculaires et de marqueurs phénotypiques entre les tumeurs d'un même organe (hétérogénéité inter tumorale) conduit à une classification en sous-types des tumeurs.

Le succès de ces études dépendra de collaborations étroites entre chercheurs de différentes disciplines (anatomopathologistes, oncologues et biologistes) et de la qualité du suivi des patientes sans lequel toutes ces études seraient peu contributives à la compréhension de cette pathologie et à la prise en charge des malades dans notre contexte.

Les techniques d'immunohistochimie (IHC) sont réalisées sur les prélèvements fixés et inclus en paraffine contenant les tumeurs primitives pour la détermination des facteurs moléculaires avec les anticorps spécifiques.

Notre étude permet de définir le profil des tumeurs triple-négatives en analysant leurs caractéristiques cliniques. Les résultats sont rapportés en trois parties.

- Analyse de 660 cas de carcinomes infiltrants :

Caractéristiques cliniques : les patientes ont un âge compris entre 20 et 89 ans (âge moyen= 50 ans), 55,75% ont moins de 50 ans.

Facteurs histologiques dominants : la taille tumorale pT2 (51%), le type histologique le plus retrouvé est le carcinome canalaire infiltrant (81%), le grade SBRII (65,15%), l'envahissement ganglionnaire N+ (65,23%). L'activité mitotique modérée (58%).

Caractéristiques biologiques déterminées par immunohistochimie à l'aide d'anticorps spécifiques : RE+ (58%), RE- (39%) ; RP+ (57,27%), RP- (39,54%), HER2- (71,96%), HER2+ (28,02%).

- Détermination des sous types moléculaire :

Luminal A et Luminal B : (9,69%, 7,87%).

HER2 : (85%).

Triple-négatif : (17,12%).

- Analyse des tumeurs triple-négatives (113cas) :

Caractéristiques cliniques = l'âge des patientes est compris entre 20 et 89 ans (âge moyen= 50,53) et 53,09% ont moins de 50 ans.

Caractéristiques histologiques : taille tumorale pT2 (36%), le grade SBRII (69,91%), l'envahissement ganglionnaire N+ (68%), l'activité mitotique élevée (61,94%).

Caractéristiques biologiques : les tumeurs triple-négatives n'expriment ni les récepteurs oestrogéniques, ni les récepteurs progestéroniques, ni l'oncoprotéine HER2.

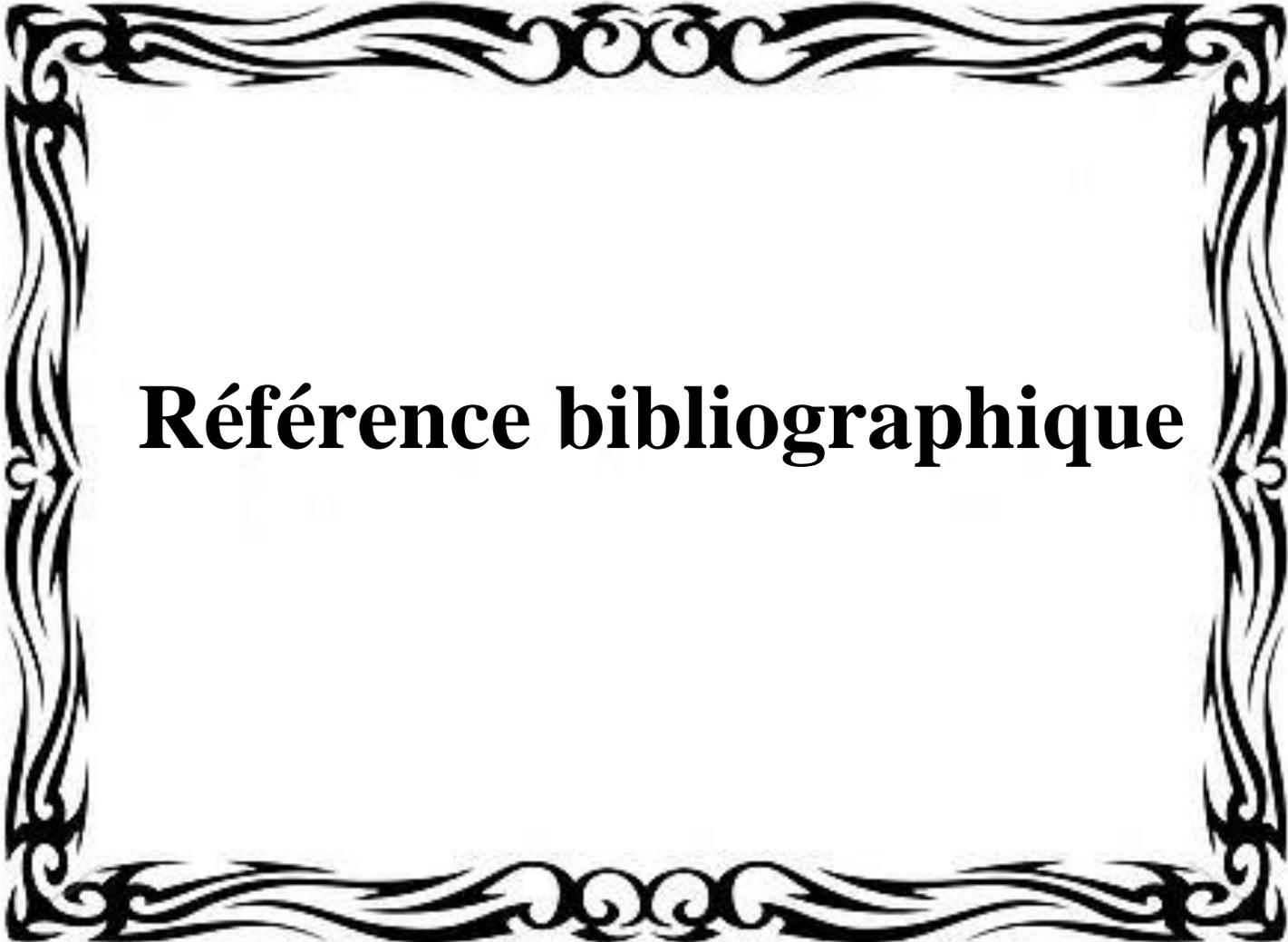
Conclusion

Dans notre étude, nous avons noté un taux d'expression des récepteurs hormonaux et de l'HER2 proche de celui décrit dans la littérature. Les récepteurs hormonaux sont corrélés entre eux et avec l'expression de l'HER2, Ceci nous aidera à choisir des traitements, potentiellement plus efficaces et moins toxiques.

Les résultats obtenus par notre étude sont encourageants. Les tumeurs de phénotype TN et HER2 sont associées à des caractéristiques cliniques et histopathologiques plus agressives que les tumeurs de phénotype luminal.

Nos résultats concordent généralement avec ceux de la littérature et les travaux de (**Guedouar y.,2014,2017**),(**Ladjeroud.a.,2018**), (**Nait behloul n.,2018**), (**Ouattara.h.,2018**), (**Engbang et al,2015**) et notre technique immunohistochimique a fait preuve de sa fiabilité.

Cependant, Cette étude mérite d'être approfondie et complétée avec une étude moléculaire pour mieux cerner les causes majeures du cancer du sein pour une meilleure prise en charge des patientes et en développant nos capacités de prédiction individuelle de la réponse ou non-réponse aux thérapeutiques.

A decorative rectangular border with intricate, symmetrical scrollwork and floral patterns, framing the central text.

Référence bibliographique

Référence bibliographie :

- 1. Michel PC , Manuela Q, Franco B, Jean-Michel L, Roberta DA, Riccardo C, Paolo B, Bernard R, Gemma G, Timo H, Andrea M, Milena S, Hannah KW, Mark J E, Hideaki T, Sergio K, Gulnar A.E.S, Silvia F, Mariano S, Arduino V, Hans H S, John L Y, 2008 .Cancer survival in five continents: a world wide population-based study (CONCORD). Lancet Oncol ; 9: 730–56**
- 2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen Dale AL, Brown PO, Botstein D, 2000. Molecular portraits of human breast tumours. Nature.406(6797):747–752.**
- 3.Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. N Engl J Med. 2009;360(8):790–800.**
- 4. Charafe-Jauffret E, Florence M, Christophe G, Gabriela D,Daniel B, Max S, 2007. Cancer Stem Cells in Breast.Pathobiology. 75(2): 75–84.**
- 5.Cheang maggie c u , david voduc, chris bajdik, samuel leung, steven mckinney, stephen k chia, charles m perou, torsten o nielsen, 2008. Basal-like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value Than Triple-Negative Phenotype ,1;14(5):1368-76.**
- 6.Pirici E, 2012 - Aspects diagnostiques et thérapeutiques des métastases osseuses du néoplasme de la glande mammaire, Thèse de doctorat, Université de Médecine et Pharmacie de Craiova, 112 P.**
- 7.Marie R, 2013 - Fibroadénome géant chez l’adolescente et influence hormonale : analyse d’une série de 90 cas thèse de doctorat, Université Paris 7 -Paris Diderot, 70 p.**
- 8.Weinberg, R. Molecular basis of carcinogenesis: understanding the cell cycle clock. Cytokines Mol. Ther.2(2):105-1, (1996).**
- 9.Lauer-Fields JL, Brder T, Srithan T, Chung L, Nagase H, Fields GB. Kinetic analysis of matrix metalloproteinase activity using fluorogenic triple-helical substrates.Biochemistry. 2001;40 :5795 803.**
- 10.Marcotte J., Ouimet R. et Landry G., 2008. Le cancer. Bibliothèque nationale du Québec ISBN. 2 e édition. Montréal (Québec), Canada, (40 pages).**

- 11. Guillaumot m-a., 2012.** Cancérologie hématologie. 2e Edition, Vernazobres-Grego, Paris, France, (228 pages).
- 12. Asselah F., 2012.** Bases anatomopathologiques des maladies. 3e Edition 2012, Office des publications universitaires, Algérie, (223 pages).
- 13. Loriot Y. et Mordant P., 2011.** Cancérologie. 2^e Edition, Elsevier Masson SAS, Paris, France, (573 pages).
- 14. Baillet F., Genestie C., Auclerc G., Blondon J. et Votadoro, A., 2015.** Cancérologie. Edition 2015, Université Pierre et Marie Curie, Paris, France, (298 pages).
- 15. Monbelli S, 2014.** Cancer du sein et immunologie anti tumoral. Thèse soutenue Dir. Paris. Hervé Curé P24-25.
- 16. Verbeke S, 2010** - Etude des voies de signalisation du récepteur p75^{ntr} impliquées dans la croissance des cellules de cancer du sein thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 170 p.
- 17. Tavassoéli F.A, Devilee P, 2003.** WHO. Pathology and genetics. Tumors of the breast and femal genital organs.
- 18. Singletary E, Craig A, Pandora A, Lawrence W B, Donald B, Kirby I B, Patrick I B, Gary C, Stephen B E, Daniel F H, Lorie L H, Robert V.P.H, Monica M, David L, Abram R, Richard L T, Ann T, Donald L W, Samuel H W, Frederick L G, 2003.** (Revision of the American Joint Committee on Cancer staging system for breast cancer. *J Clin Oncol* ; 20 : 3628-36.
- 19. Chen, S., Chen, C.-M., Yu, K.-D., Yang, W.-T. & Shao, Z.-M, 2012.** A prognostic model to predict outcome of patients failing to achieve pathological complete response after anthracyc line- containing neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *J. Surg. Oncol.* **105**, 577-585.
- 20. Mauri FA, Maisonneuve P, Caffo O, Veronese S, Aldovini D, Ferrero S, Cozzaglio F, Dalla Palma P, Galligioni E, Barbareschi M, 1999.** Prognostic value of estrogen receptor status can be improved by combined evaluation of p53, bcl2 and pgr expression: An immunohistochemical study on breast carcinoma with long-term follow-up. *Int J Oncol* ;15:1137-1147.
- 21. Saglier J, Beuzeboc P, Pommeyrol A, Toledano A, 2009.** Cancer du sein, Questions et réponses au quotidien. 3^{ème} édition. Issy-les-Moulineaux: Elsevier, Masson, p.194.

22.Jacot W, Romieu G, Lamy P-J,2010. Cancer du sein métastatique : progrès dans la prise en charge et limites actuelles. *Médecine Nucl.* 34(1):52–57.

23.Sanchez.M,2003 -Deneux Immunosuppresseurs et antistéroïdes dans les cellules de cancers de sein humains : effets sur la prolifération cellulaire, les récepteurs des oestrogènes et sur la transcription des gènes qu'ils régulent ; Thèse de doctorat de l'institut national agronomique Paris-Grignon ; p 30.

24.Lakhani, S.R, Ellis. I.O, Schnitt, S.J, Tan, P.H, van de Vijier, M.J. (2012).WHO Classification of tumors, volume 4.

25.Dansereau S, Ferron D. La thérapie ciblée en oncologie et la pointe de l'Iceberg. Première partie: le récepteur épidermique humain HER/ErbB. *Pharmactuel* ; Vol. 39 ; N° 3 ; Mai-Juin-Juillet 2006 ; p 135-43.

26.Manner L., Milano G., Penault L F., Merlin J.L,2004. Targeting of membrane receptor tyrosine kinase: is there resistance in the HER *Bulletin du cancer*, Vol 91, No 9, 685-94.

27.Goldhirsch, A , W C Wood, A S Coates, R D Gelber, B Thürlimann, H-J Senn, 2013.Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* **24**, 2206R23 .

28.Taneja S, Evans AJ, Rakha EA, Green AR, Ball G, Ellis IO,2008. The mammographic correlations of a new immunohistochemical classification of invasive cancer.*ClinRadiol* ;63: 1228—35.

29.Verbeke S, 2010 - Etude des voies de signalisation du récepteur p75^{ntr} impliquées dans la croissance des cellules de cancer du sein .Thèse de doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, 170 p.

30.Charafe-Jauffret E, Christophe G,2012. Entités moléculaires du cancer du sein : la différence est dans l'origine. *Annales de pathologie* 32S, S35-S36.

31.Audrey Mailliez,2014. Ce que le radiologue doit savoir des nouvelles classifications moléculaires des cancers du sein. *Imagerie de la Femme* 24, 159-164.

32.Weigelt B, Reis-Filho JS,2010. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. *Breast Cancer Research*;12(4):S5

- 33. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM,2006** .Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*;19:264-71.
- 34.Huyton T, Bates PA, Zhang X, Sternberg MJ, Freemont PS,2000.** The BRCA1 C-terminal domain:structure and function. *Mutat Res.* 30;460(3-4):319-32.
- 35.Rodriguez JA, Henderson BR,2000.** Identification of a functional nuclear export sequence in BRCA1. *JBiol Chem.*275(49):38589-96.
- 36.Scully R,2000.** Livingston DM. In search of the tumour-suppressor functions of *BRCA1* and *BRCA2*. *Nature.* 408 (6811): 429-32.
- 37. Paull TT, Rogakou E P, Yamazaki V , Kirchgessner C U, Gellert M, Bonner A.W. M,2000.** critical role for histone H2AX in recruitment of repair factors to nuclear foci after DNA damage. *Curr Biol.*10 (15):886-95.
- 38. Zhu Z, Jieping L , Xiang S, Fen D, Jing W, Dingyi W, Sinan W, Wanmu X, Jun W, Hong C, Yingqun J, Qun Y, Xiaomao X, Yuanhua Y, Zhenguo Z,Chen W,2000.** Sequencespecific transcriptional corepressor function for BRCA1 through a novel zinc finger protein, ZBRK1. *Mol Cell.*6 (4): 757-68
- 39. Hashizume R , Fukuda M, Maeda I, Nishikawa H, Oyake D, Yabuki Y, Ogata H, Ohta T,2001.** The RING heterodimer BRCA1- BARD1 is a ubiquitin ligase inactivated by a breast cancer-derived mutation. *J Biol Chem.* 276 (18): 14537-40.
- 40.Ronit I Y, Sherly P-R, Magda S, Kenneth H C, Lawrence C B,2002.** BRCA1 regulates the G2/M checkpointby activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet.* 30 (3): 285-9
- 41.Lotti LV, Ottini L, D'Amico C,2002.** Subcellular localization of the BRCA1 gene product in mitotic cells. *Genes Chromosomes Cancer.*35 (3): 193-203
- 42.Welcsh PL, King MC,2001.** BRCA1 and BRCA2 and the genetics of breast and ovarian cancer. *Hum MolGenet.*10(7):705-13.
- 43.Bork P, Blomberg N, Nilges M,2004.** Internal repeats in the BRCA2 protein sequence. *Nat Genet.* 13(1):22-3.

- 44.Spain BH, Larson CJ, Shihabuddin LS, Gage FH, Verma IM,2008.** Truncated BRCA2 is cytoplasmic: implications for cancer-linked mutations. Proc Natl Acad Sci USA. 96(24):13920-5.
- 45.Xia F, Taghian DG, Defrank JS,2001.** Deficiency of human BRCA2 leads to impaired homologous recombination but maintains normal non homologous end joining. Proc Natl Acad Sci USA. 98 (15): 8644-9.
- 46.Galkin V E, Fumiko E, Xiong Y, Shixin Y, Stephen C W, Edward H E,2005.** BRCA2 BRC motifs bind RAD51-DNA filaments.Proc Natl Acad Sci USA. 102 (24):8537-42
- 47.Milner J, Fuks F, Hughes-Davies L, Kouzarides T,2000.** The BRCA2 activation domain associates with and is phosphorylated by a cellular protein kinase. Oncogene. 19(38):4441-5.
- 48.Monteiro AN,2003.** BRCA1: the enigma of tissue-specific tumor development. Trends Genet. 19, 312-5.
- 49.Mueller CR, Roskelley CD,2003.** Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. Breast Cancer Res. 5:45-52.
- 50.Marquis S T , Rajan J V, Wynshaw-Boris A, Xu J, Yin G Y, Abel K J, Weber B L, Chodosh B L,1995.** The developmental pattern of Brca1 expression implies a role in differentiation of the breast and other tissues. Nat Genet. 11 :17-26.
- 51. Bennett LM, McAllister KA, Malphurs J, Ward T, Collins NK, Seely JC,2000.** Mice heterozygous for a Brca1 or Brca2 mutation display distinct mammary gland and ovarian phenotypes in response to diethylstilbestrol.Cancer Res. 60 : 3461-9.
- 52.Catteau A, Morris JR,2002.** BRCA1 methylation : a significant role in tumour development Semin Cancer Biol.12 : 359-71.
- 53.Hamilton SA, Mack TM,2003.** Puberty and genetic susceptibility to breast cancer in a case-control study in twins. N Engl J Med. 348 : 2313-22.
- 54.Liehr JG,2000.** Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen Endocr Rev 21 : 40-54.
- 55.Hilakivi-Clarke L,2000.** Estrogens, BRCA1, and breast cancer. Cancer Res. 60 : 4993-5001.

- 56.Vaziri SA, Krumroy LM, Elson P, Budd GT, Darlington G, Myles J,2001.** Breast tumor immunophenotype of BRCA1-mutation carriers is influenced by age at diagnosis. *Clin Cancer Res.* 7 : 1937-45.
- 57.Group, T.E.H. and B.C.C., 2002.** Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J.Natl.Cancer Inst.*, 94(0027–8874), pp.606–616.
- 58.Ignatiadis, M. & Sotiriou, C., 2013.** Luminal breast cancer: from biology to treatment. *Nature reviews. Clinical oncology*, 10(9), pp.494–506.
- 59.Maximov, P.Y., Lee, T.M. & Jordan, V.C., 2013.** The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr Clin Pharmacol*, 8(2),pp.135–155.
- 60. Clemons, M., Danson, S. & Howell, A., 2002.** Tamoxifen ('Nolvadex'): A review. *Cancer Treatment Reviews*, 28(4), pp.165–180.
- 61.Ma X C, Tomás R, Izabela C, Matthew J E, 2015.** Mechanisms of aromatase inhibitor resistance. *Nature Reviews Cancer*, 15(5), pp.261–275.
- 62.McDonnell, D.P., Wardell, S.E. & Norris, J.D., 2015.** Oral selective estrogen receptor downregulators (SERDs), a breakthrough endocrine therapy for breast cancer. *journal of medicinal chemistry*, 58(12), pp.4883–4887.
- 63.Hart, C.D. , Ilenia M, Luca M, Cristina G, Laura B , Angelo D L., 2015.** Challenges in the management of advanced, ER-positive,HER2- negative breast cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, 12(9), pp.1–12.
- 64.Osborne, C.K. & Schiff, R., 2011.** Mechanisms of endocrine resistance in breast cancer *Annual review of medicine*, 62, pp.233–47.
- 65.Xiaoxia W, Xiujuan Z, Sen Y, Yu C, Qinglin Z, Xiaoli Z, Hong Z, Pengfei G, Junwu L , Yu H, Anlian P, Xiangfeng D,2002 .** Sensitive detection of mono- and polyclonal ESR1 mutations in primary tumors, metastatic lesions, and cell-free DNA of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 22(5), pp.1130–1137.
- 66.Hoefnagel L.D.C, Cathy B M, S L Meijer, Henk-Jan van Slooten, Pieter W, Jelle W, Pieter J W, Joost B, Cornelis A S, Iris D N, Joost O, Paul V V, Carla H G, Elsken V W, Paul J D,2001 .**Prognostic value of estrogen receptor alpha and progesterone receptor conversion in distant breast cancer metastases. *Cancer*, 118(20), pp.4929–4935.

- 67.GUEDOUAR. Y, 2011,** Classification moléculaire des cancers mammaires invasifs triple-négatifs et basal-like. Mémoire de magister. Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie.
- 68.GUEDOUAR. Y, BEKKOUCHE. Z, Ben Ali. F, El Kebir. F. Z, 2014.** Évaluation phénotypique des sous-types moléculaires en carcinologie mammaire dans une population de l'Ouest algérien, J. Afr. Cancer 6 :150-158.
- 69. GUEDOUAR. Y, 2017,** Cancer Mammaire chez la Jeune Femme, Etude des Sous-types Moléculaires et Oncogénétique. Thèse de doctorat.Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, Algérie.
- 70.LADJEROUD A,2018** .-Amélioration de la réponse histologique complète (pCR)par chimiothérapie néoadjuvante à base de sel de platine dans les cancers du sein triple négatif : Thèse de Doctorat, Université d'alger-benyoucef benkhedda, 244p
- 71.Engbang JP, Essome H, Koh VM, Simo G, Essam JD, Mouelle AS, Essame JL ,2015.**Cancer du sein au Cameroun, profil histo-épidémiologique: à propos de 3044 cas , 21: 242,pp.50–120 .
- 72.Perou CM, Sorlie T, Tibshirani R ,(2001).** Gene expression patherns of breast carcinomas distinguish tumors subclasses with clinical implications. Proc Natl Acad Sci USA 98:10869–10874
- 73.Sorlie T, Tibshirani R, Parker J ,(2003)** .Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. Proc Natl Acad Sci USA 100:8418–8423
- 74.Sotiriou C, Wirapati P, Loi S ,(2006).** Gene expression profiling in breast cancer. Understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. J Natl Cancer Inst 98:262–272
- 75.Mathieu MC ,(2007).** Les sous-types moléculaires des cancers du sein. La lettre du sénologue 38:33–34 .
- 76.Emmanuelle Charafe-J, Max C, François B, Christophe G, Jocelyne J, Odile L, Daniel B , (2007)** . Les cancers du sein. Vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré. Med Sci 23:626–632
- 77.Mathieu MC, Dohollou N ,(2010).** Les tumeurs triple-négatives. La lettre du sénologue 50:6