

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE
MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES.

Présenté par :

(ELKEBAILI Wahida) et (GHERIBI Bochra)

Pour l'obtention du diplôme de :

MASTER EN BIOLOGIE.

Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée.

THÈME

**Classification moléculaire du cancer
du sien.**

Soutenue le .../.../2020

DEVANT LE JURY

Président	Mr. CHIBANI Abdelwahib	Professeur	Université de Mostaganem
Examineur	Mr. BOUZNAD Lahcen	M.C.B	Université de Mostaganem
Encadreur	Mr. GUEDOUAR Youcef	M.C.B	Université de Mostaganem




Remercîment

Au terme de cette recherche, nous tenons à remercier sincèrement M. Guedouar Youcef notre directeur du mémoire pour nous avoir guidé et pour ses conseils et ses directives qu'il nous a fournis afin d'accomplir ce travail.

Mes remerciements vont aussi à tous les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer notre travail.

Je tiens aussi à remercier toutes les personnes qui ont pu m'aider, d'une manière ou d'une autre, à élaborer ce travail, surtout ma cousine achoura.

Je ne saurais oublier tous les participants (le directeur de l'hôpital les Sœur Bedj à chlef et le directeur de laboratoire D'anatomie et de Cytologie Pathologique Dr Djaît.D sans oublier Zohra, Bochra et Abed) qui m'ont permis de réaliser ce travail.





Dédicace

A celui qui a m'aidé dans mon parcours éducatif, qui attend ma réussite : Ma chère mère et mon père qui m'ont toujours aidé sur ce long chemin d'étude, avec leurs encouragements, Leurs conseils et Leurs sacrifices. A mes sœurs : Nour El Houda et Sarah. A toute ma famille pour l'amour et le respect qu'ils m'ont toujours accordé.

A mes meilleur amies et à notre Promotion : génétique fondamental et appliquée. A toute personne qui m'a aidé à franchir un horizon dans ma vie.

Bochra





Dédicace


« Je rends grâce à dieu le tout puissant qui m'a permis de mener à bien ce projet de fin d'étude »

Je dédie ce modeste travail à ma mère et mon père qui m'ont soutenu tout au long de mon parcours. Sans oublier ma chère sœur Amina, car cette recherche n'aurait jamais vu le jour sans leur soutien actif. Je dédie aussi ce travail à toute la famille ELKEBAILI et à mon binôme GHERIBI Bochra et sa famille.

A toutes mes amies et à notre Promotion :
génétique fondamentale et appliquée

2019 / 2020

Wahida



Résumé

Le cancer du sein est le premier cancer féminin en Algérie et dans le monde de fréquence et de mortalité.

Le cancer du sein est une maladie hétérogène dont une meilleure connaissance moléculaire, grâce notamment aux outils transcriptomiques, a permis le dénombrement au moins 5 sous- type : basale-like, normale-like, HER2, luminal A, luminal B. Ces résultats constituent la classification moléculaire.

Notre objectif est d'étudier les paramètres épidémiologiques et anatomopathologiques du cancer du sein avec la détermination phénotypique des sous types moléculaires.

Notre travail représente l'étude rétrospective de 50 cas de cancer du sein féminin colligés au sein au service médicale et d'oncologie du l'hôpital de sœurs bedj (CHLEF) en 2019. L'évaluation de l'expression des récepteurs hormonaux (RE, RP) et HER2 était réalisé par méthode immunohistochemique.

Les paramètres étudiés sont : l'âge moyen, la taille tumorale, le type histologique, le grade SBR, les ganglions lymphatiques, les récepteurs hormonaux et les sous types moléculaires. Un total de 50 cas de cancers du sein a été recensé. L'âge moyen 50 ans, La taille tumorale prédominant T2 :90%, le types histologie le carcinome canalaire infiltrant 76%, le Grade SBRIII : 68%, l'envahissement ganglionnaire N + :63%, les Récepteurs hormonaux : RE+ : 66%, RE- : 34%, RP+ : 62%, RP- : 38%, HER2+ : 74%, HER2- : 34%.

Mots clés : cancer du sein, classification moléculaire, luminal A, luminal B, immunohistochemique.

Abstract

Breast-cancer is the common in Algeria and in the world in terms of frequency and mortality. The diagnosis of breast cancer is made by anatomopathology.

Breast- cancer is a heterogeneous disease of which better molecular knowledge, thanks in particular to transcriptomic tools, has enabled the enumeration of at least 5 subtypes: basal-like, normal-like, HER2, luminal A, luminal B. These results constitute molecular classification.

Our objective is to study the epidemiological and anatomopathological parameters of breast cancer with the phenotypic determination of molecular subtypes.

Our work represents the retrospective study of 50 cases of female breast cancer in the medical and oncology department of the bedj chlef sister's hospital in 2019. The evaluation of hormone receptor expression (PR, ER) and HER2 was performed by histological and immunohistochemical method .

The parameters studied are: mean age, tumor size, histological type, SBR grade, lymph nodes, hormone receptors and molecular subtypes. A total of 50 cases of breast cancer have been identified. Average age 50, tumor size predominant T2 :90%, the histological type is infiltrating ductal carcinoma 76% , Grade SBR III : 68% , presence of ganglionic invasion N + :63%,Hormon receptor :ER+ : 66% ,ER- : 34%, PR+ : 62%, PR- : 38%, HER2+ :74% , HER2- : 34% .

Key words: Breast cancer, molecular classification, luminal A, luminal B, immunohistochemical.

Sommaire

Remercîment

Dédicace

Résumé

Abstract

Liste des abréviations

Liste des tableaux

Liste des figures

Introduction.....01

Chapitre I : partie théorique

I.Le sein normal.....	03
1. Définition	03
2. Anatomie du sein.....	03
3. Histologique.....	04
4. Physiologie.....	05
II.Le sein pathologique.....	05
1. Historique.....	05
2. Définition.....	06
3. Type de cancer du sein.....	06
3.1. Cancer non invasif « Carcinome canalaire in situ » (CCIS).....	06
3.2. Cancer invasif « infiltrant ».....	06
3.2.1. Carcinome canalaire	07
3.2.2. Carcinome lobulaire	07
3.3. Autres carcinomes (médullaires, colloïdes ou mucineux, tubulaires, papillaires).....	07
3.4. Maladie de Paget.....	07
4. Les étapes de cancérogenèse prédisposition de cancer de sein en génétique.....	08
4.1. l'initiation.....	08
4.2. Promotion.....	08
4.3. Progression.....	08
5. Les facteurs de risque.....	09
5.1. Facteurs génétiques	09

5.1.1. Mutation des gènes BRCA1 et BRCA2.....	09
5.1.2. Gène P 53.....	09
5.2. Facteurs hormonaux	10
5.2.1. Hormones endogènes.....	10
5.2.1.1. Âge précoce des premières menstruations.....	10
5.2.1.2. Ménopause tardive.....	10
5.2.2. Hormones exogènes.....	10
5.2.2.1. Contraceptifs oraux.....	10
5.2.2.2. Traitement hormonal substitutif (THS)	11
6. Les facteurs biologique et moléculaire.....	11
6.1. Les récepteurs hormonaux (RH).....	11
6.1.1. Récepteur à l'oestrogène (RE).....	12
6.1.2. Récepteur à la progestérone (RP)	12
6.2. L'oncogène HER2 (HER2-neu ou c-erb2 ou neu)	13
6.3. L'antigène Ki 67.....	13
7. Classification histologique du cancer de sein.....	13
7.1. Classification TNM.....	13
7.2. Classification OMS.....	14
7.3. Classification SBR.....	14
III. Classification moléculaire du cancer de sein.....	17
1. Luminal like.....	17
1.1. Sous type luminal A.....	17
1.2. Sous type luminal B.....	17
2. Basal like.....	18
3. Normal like.....	18
4. Dit « HER2 ».....	18

Chapitre II : Partie pratique

I. Matérielle.....	21
II. Méthode.....	21
1. Histologique.....	21
1.1. Prélèvement.....	21
1.2. Fixation	22

1.3. Déshydratation.....	22
1.4. Inclusion.....	22
1.5. Coupe.....	23
1.6. Réhydratation.....	24
1.7. Coloration	24
1.8. Montage.....	25
1.9. L'observation	25
2. Immunohistochimie.....	25
2.1. Déparaffinage	26
2.2. Réhydratation.....	26
2.3. Démasquage.....	26
2.4. Utilisation du kit.....	27
2.5. Montage.....	28
2.6. L'observation microscopique.....	28

Chapitre III : Résultat et discussions

1. Caractéristiques globale de carcinome infiltrant.....	30
1.1. Caractéristiques clinico-histopathologiques.....	30
1.1.1. Répartition selon Age des patientes.....	30
1.1.2. Répartition selon la taille tumorale.....	31
1.1.3. Répartition des tumeurs selon le type histologique.....	32
1.1.4. Répartition selon le Grade SBR.....	32
1.1.5. Répartition selon l'envahissement ganglionnaire (N).....	32
1.2. Caractéristiques Biologiques.....	32
1.2.1. Répartition des carcinomes selon les récepteurs nucléaires.....	33
1.2.1.1.Expression des récepteurs d'oestrogène (RE).....	33
1.2.1.2.Expression des récepteurs progestérones (RP).....	33
1.2.2. Expression membranaire de l'oncoprotéine HER2.....	33
1.2.3. Expression de l'antigène Ki67.....	34
2. Détermination imminohistochimique des sous –types moléculaires.....	34

Conclusion

Référence bibliographique

Liste des Abréviations

- **AKT** : Protéine kinase B
- **BRCA1** : Breast- cancer gène 1
- **BRCA2** : Breast-cancer gene 2
- **CCIS** : Carcinome Canalaire In Situ
- **CLIS** : Carcinome Lobulaire In Situ
- **CDH** : Cadhérine
- **CCH** : Comparative Genomic Hybridization
- **CK** : Cytokératine
- **CCNE1** : Cycline E1
- **EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor
- **ERB** : Entrepreneur Resource Planning
- **ERbB** : Famille de Protéines contenant quatre Récepteurs tyrosine
- **FSH** : Hormones Receptor Folliculostimulines
- **GATA3** : Binding protéine 3
- **HER2** : Human Epidermal growth factor Receptor 2
- **Ki 67** : Cell-cycle related nuclear protein
- **LAMP4** : Lysosome Associated Transmembrane Protein 4- Beta
- **MAP3K1** : Mitogen-Activated Protein Kinase
- **NSE1** : Nuclease Sensitive Element Binding Protein 1
- **OMS** : Organisation Mondiale de la Santé
- **P53** : Protéine 53
- **PI3K3** : Phosphoinositide -3-Kinase
- **PTEN** : Phosphate and Tensin homolog
- **RB** : RétinoBlastome
- **RE /RO** : Récepteurs œstrogènes
- **RH** : Récepteurs Hormonaux
- **RP** : Récepteurs à la Progestérone
- **SBR** : Scarff Bloom et Richardson
- **THS** : Traitement Hormonal Substitutif
- **TNM** : Tumor Node Metastasis
- **V-MYB** : Avian Myeloblastosis Viral oncogene homolog
- **X-BP1** : X-Box Binding Protein 1

Liste des tableaux

- **Tableau 01** : Classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC).....15
- **Tableau 02** : Classification des tumeurs mammaires selon l'OMS 2003.....16
- **Tableau 03** : Critères utilisés pour la classification moléculaire du cancer du sein.....19
- **Tableau 04** : Caractéristiques des principaux sous-types moléculaires...19
- **Tableau 05** : la coloration.....24
- **Tableau 06**: Résumé les résultats d'analyse des récepteurs clinico-histopathologiques des carcinomes infiltrants.....35
- **Tableau 07**: Résumé les résultats d'analyse des récepteurs biologiques des carcinomes infiltrants.....36
- **Tableau 08**: Résumé les résultats d'analyse immunohistochimique des sous types moléculaires des carcinomes infiltrants.....36

Liste des figures

- **Figure 01** : Anatomie de sein (FNCLCC ,2009).....04
- **Figure 02** : Répartition de la prolifération de cellulaire de cancer canalaire
in situ et infiltrant.....07
- **Figure 03** : Les étapes de cancérogenèse.....08
- **Figure 04** : Appareille d'automate.....22
- **Figure 05** : L'étape de l'inclusion.....23
- **Figure 06** : L'étape de réalise des lames.....23
- **Figure 07** : Coloration par HE.....24
- **Figure 08** : Les lames histologiques.....25
- **Figure 09** : Les bacs de réhydrations.....26
- **Figure 10** : Préparation des bacs de l'étape démasquage.....27
- **Figure 11** : Les anticorps utilisé.....27
- **Figure 12** : Solution DAB.....28
- **Figure 13** : Le kit Novolink de Leica.....28
- **Figure 14** : Distribution de la population en fonction de l'âge.....30
- **Figure 15** : Répartition des tumeurs selon la taille.....31
- **Figure 16** : Répartition selon expression membranaire de HER2.....34
- **Figure 17** : Répartition des tumeurs selon la classification moléculaire. 35

Introduction

Le sein est un organe symbolique de la féminité, de la sexualité et de la maternité. Il est à développement continu depuis le stade embryonnaire, à travers la puberté, les cycles menstruels et la grossesse, jusqu' à l'atrophie à travers la ménopause (**Zaki et al.,2013**).

Le cancer du sein est la tumeur maligne la plus fréquemment chez la femme et la plus meurtrière. Il constitue un problème majeur de santé publique à la fois dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement où son incidence ne cesse d'augmenter d'année en année (**Coleman et al.,2008**).

Les facteurs cliniques et pathologiques comme la taille tumorale, le type histologique, le grade histologique, les métastases ganglionnaires, la présence d'une composante in situ et l'âge peuvent servir comme facteurs pronostique et prédictifs de la réponse à une thérapie adjuvante (**Tavassoli et al.,2004**) .

Bien que de nombreux gènes et protéines été étudiés dans ce cancer, actuellement seuls RE, RP et HER2 sont pris en compte pour le choix thérapeutique (Bekkouche et al.,2000 ;2007). Depuis quelques années, la classification et la compréhension de la carcinogénèse mammaire ont progressé grâce aux analyses des profils d'expression transcriptomique des carcinomes infiltrant du sein (Perou et al .,2000) .

L'hétérogénéité clinique se voit renforcée par la mise en évidence d'une hétérogénéité histologique précisée à l'aide des outils moléculaires de haut débit (Sorlie et al ., 2000). L'analyse de ces résultats permet de regrouper les tumeurs en fonction de leur profil l'expression génique. L'étude de cette expression permet de proposer une nouvelle classification dite « moléculaire ou intrinsèque » et de classer les tumeurs mammaires en sous -types :luminal A, luminal B, ErbB2(HER2), basal-like et normal-like selon (**Perou et Sorlie, 2000**) .

Partie théorique

I. Le sein normal

1. Définition

Le sein est un organe pair et globuleux situé en avant et en haut du thorax. Il contient la glande mammaire « qui se développe au moment de la puberté » noyée dans du tissu graisseux.

L'aréole « en anglais areola » est la zone de coloration rougeâtre et de forme circulaire située autour du mamelon.

Le mamelon « en anglais nipple » est la saillie, l'éminence en forme de cône qui constitue la pointe du sein de la femme ou de l'homme.

Les tubercules de Montgomery sont des petits grains disséminés à la surface de l'aréole. Ils deviennent saillants vers la huitième semaine de grossesse.

La glande mammaire se développe et fonctionne sous l'influence d'hormones sexuelles produites en quantité variable tout au long de la vie : les œstrogènes (RE) et la progestérone (RP).

Les seins jouent un rôle important dans la féminité et dans l'image que la femme a de son corps. (FNCLCC, 2009)

2. Anatomie (fig.1)

Sur une coupe longitudinale, on a trois constituants :

- Le tégument mammaire : richement innervé (centre mamelon entouré de l'aréole).
- Le tissu cellulaire sous cutané : couche adipeuse pré-mammaire assez épaisse et vascularisée.
- La glande mammaire proprement dite : fixée par des ligaments reposant sur le muscle du grand pectoral.

Le sein est divisé en quatre quadrants : supéro-externe, supéro-interne, inféro-externe et inféro-interne.

Partie théorique

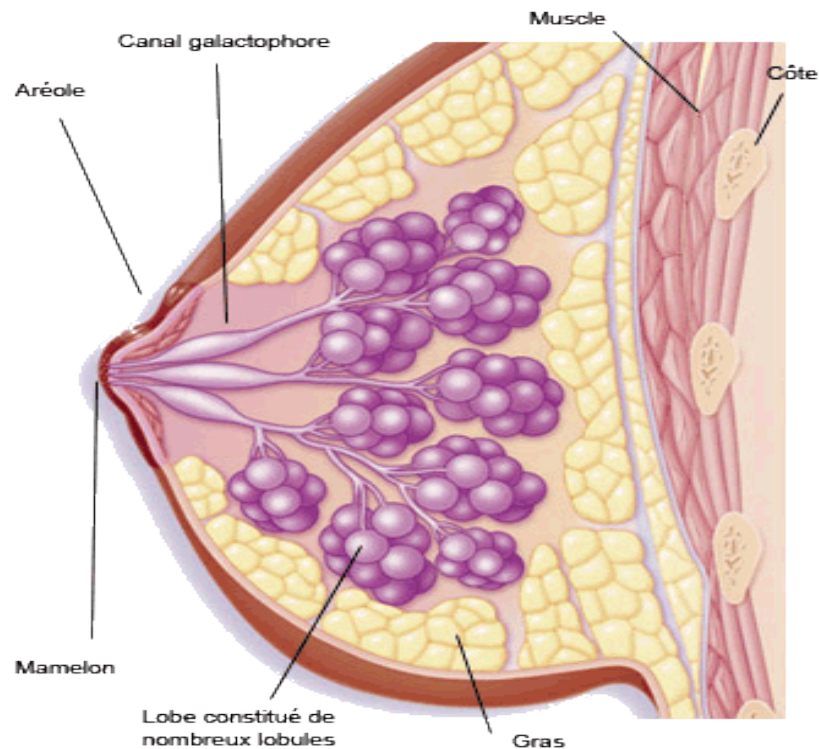


Figure 01 : Anatomie de sein (FNCLCC ,2009)

3. Histologique

Le sein est composé d'un tissu adipeux et d'une glande mammaire (se trouve en profondeur sur le muscle de grand pectoral). (Moinfar,2007)

La glande mammaire est une glande exocrine. Comme la plupart des glandes composées, elle est formée d'un système canalaire, de lobes (de 15 à 20) eux-mêmes subdivisés en lobules. (Kirerzenbaum,2006)

Cette dernière comporte un système ramifié de canaux excréteurs intra-lobulaire et inter-lobulaires qui s'étendent dans le tissu fibro-adipeux du sein. Les canaux galactophores sont bordés par une double assise cellulaire : interne constitué de cellule cylindrique ou cubique, externe constitué par une couche discontinue de cellules myoépithéliales (qui se trouvent entre les cellules luminales et la membrane basale). Ces canaux sont entourés par un tissu conjonctif lâche contenant des vaisseaux sanguins et des lymphatiques. (Kirerzenbaum,2006)

4. Physiologie

Le développement des seins est un des signes de la puberté chez la jeune fille. Ce développement s'effectue grâce à l'action de nombreuses hormones. Ce sont les œstrogènes, la progestérone et les hormones hypophysaires (hormones folliculostimulines ou FSH, hormone lutéinisante, prolactine).

Pendant le cycle menstruel, la glande mammaire subit des modifications et notamment augmente de volume sous l'effet des œstrogènes (2 semaines après le dernier jour de règles environ). Au moment de ménopause, suit à une diminution de la fabrication hormonale (œstrogènes), le volume des seins diminue.

Le rôle principal du sein est de fabriquer le lait. La préparation à la sécrétion lactée se fait pendant la grossesse grâce à 2 hormones, les œstrogènes et la progestérone favorisant ainsi le développement des glandes mammaires mais également l'agrandissement des mamelons.

Dès que l'enfant est né, les seins fabriquent le colostrum (liquide blanc jaunâtre) qui va au bout de quelques jours (3environ), laisser sa place au lait véritable.

II. Le sein pathologie

1. Historique

Bien que le cancer de mot n'ait pas été employé, la description la plus ancienne de la maladie est l'Égypte et remonte environ à 3000 BC. Elle est appelée le pyrus d'Edwin Smith et est une copie d'une partie d'un manuel égyptien antique sur la chirurgie de traumatisme. Elle décrit 8 cas des tumeurs ou ulcères du sein qui ont été traités par cautérisation avec un outil appelé l'exercice contre l'incendie. La description ajoute qu'il n'y a pas demande de règlement pour la condition. (Mandal.2018)

La maladie sous le nom cancer était d'abord appelée par le médecin grec Hippocrate (460-370 BC). Il est considéré le « père du médicament. » Hippocrate avait l'habitude les carcinos et le carcinome de conditions pour décrire des tumeurs de formation et d'ulcère-formation de non-ulcère.

Dans le Grec ceci signifie un crabe. La description était des noms après le crabe parce que les projections de propagation comme un doigt d'un cancer appelé pour s'occuper de la forme d'un crabe. (Mandal.2018)

Partie théorique

Un plus défunt médecin romain, Celsus (28-50 BC) a traduit la condition grecque en cancer, le mot latin pour le crabe. C'était Galen (130-200 AD), un autre médecin romain, qui avait l'habitude les oncos de condition (grecs pour le gonflement) pour décrire des tumeurs. Oncos est le mot de fond pour l'oncologie ou l'étude des cancers. (Mandal.2018)

2. Définition

Un cancer signifie la présence de cellules anormales qui se multiplient de façon incontrôlée. Dans le cas du cancer du sein, les cellules peuvent rester dans le sein ou se répandre dans le corps par les vaisseaux sanguins ou lymphatiques. La plupart du temps, la progression d'un cancer du sein prend plusieurs mois et même quelques années.

Mentionnons que les hommes peuvent aussi en être touchés; ils représentent 1 % de l'ensemble des cas.

3. Types de cancer du sein (fig.2)

3.1. Cancer non invasif « Carcinome canalaire *in situ* » (CCIS)

Correspond à une prolifération de cellules tumorales à l'intérieur des canaux galactophoriques et des terminaisons ductolobulaires du sein, sans franchissement de la membrane basale ni du tissu conjonctif adjacent. (Moïse Namer, and, all.2005)

3.2. Cancer invasif « infiltrant »

Ces formes de cancer envahissent les tissus autour des canaux de lactation, mais demeurent à l'intérieur du sein. Par contre, si la tumeur n'est pas traitée, elle peut se disséminer à d'autres parties du corps (par exemple, les os, les poumons ou le foie) en générant des métastases. (https://www.passeportsante.net/fr/Maux/Problemes/Fiche.aspx?doc=cancer_sein_pm)

3.2.1. Carcinome canalaire

C'est le plus fréquent. Les cellules tumorales s'agencent en travées, en massif et en formation glandulaire. (Loriot et Mordant,2011)

3.2.2. Carcinome lobulaire

Le carcinome lobulaire représente de 4 à 15 % des carcinomes mammaires infiltrants. Qu'ils soient de type canalaire ou lobulaire, les carcinomes mammaires naissent au niveau de l'unité terminale ducto-lobulaire. Le cancer lobulaire représente une entité anatomopathologique particulière. Il s'agit d'un carcinome infiltrant formé de petites cellules régulières, rondes, uniformes et non cohésives, ressemblant à celles du carcinome lobulaire *in situ* et ayant en général un faible taux de mitoses. (Moïse Namer, et al.2005)

3.3. Autres carcinomes (médullaires, colloïdes ou mucineux, tubulaires, papillaires)

Ces types de cancer du sein sont plus rares. Les principales différences entre ces types de cancer reposent sur le type de cellules touchées. (Loriot et Mordant,2011)

3.4. Maladie de Paget

Un cancer rare qui se manifeste par une petite plaie au mamelon qui ne guérit pas. Il témoigne d'un carcinome intracanaire. (Loriot et Mordant,2011)

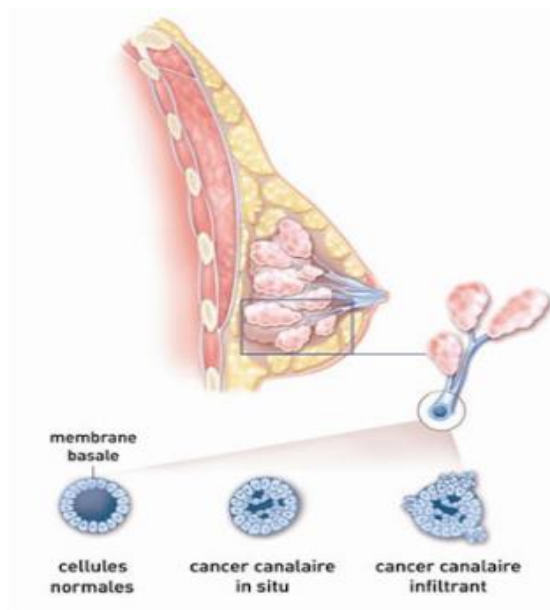


Figure 02 : répartition de la prolifération de cellulaire de cancer canalaire in situ et infiltrant.

Partie théorique

4. Les étapes des cancérogènes prédisposition de cancer du sein en génétique :

Différentes étapes ont été identifiées dans le développement d'un cancer :(fig.3)

4.1. Initiation

Atteinte de l'ADN par un cancérogène génotoxique dit "initiateur" c'est un phénomène irréversible. Cellules initiées : échappent au contrôle normal de division cellulaire. (Cour Intensif De Cancérologie Digestive.2009)

4.2. Promotion

Processus épigénétique (non génotoxique) induit par un promoteur entraînant la stimulation de la sélection des cellules initiées. C'est un phénomène réversible. (Cour Intensif De Cancérologie Digestive.2009)

4.3. Progression

Etape finale dans le développement du cancer .la cellule acquiert les caractéristiques d'une cellule cancéreuse : elle se multiplie de façon anarchique, en perdant en partie son caractère différencié. Survenue de métastases.

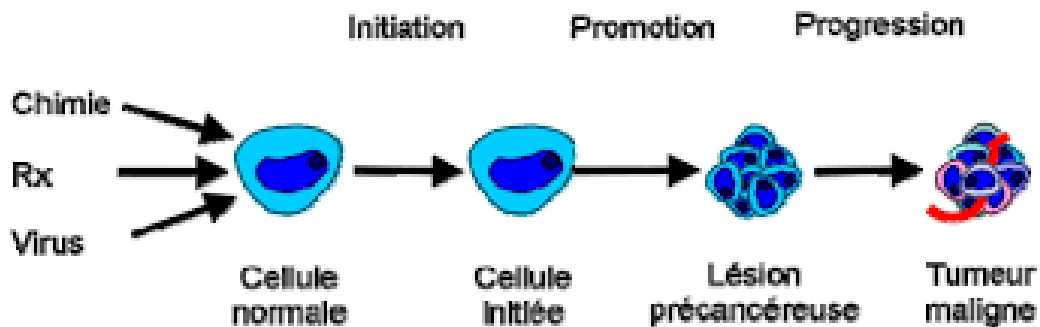


Figure 03 : Les étapes de cancérogenèse.

5. Les facteurs de risque

5.1. Facteurs génétiques

5 à 10% seulement des cancers du sein peuvent être liés directement à des facteurs génétiques et à peu près la moitié de ceux-ci serait attribuable à des gènes de susceptibilité au cancer du sein hérités de façon dominante. En outre, seule une petite proportion de femmes avec des antécédents familiaux est porteuse d'une mutation au niveau des gènes du cancer du sein. (Marina Puddu, Jean Tafforeau .2005)

5.1.1. Mutation des gènes BRCA1 et BRCA2

BRCA1 et BRCA2 : On les appelle gènes suppresseurs de tumeurs parce qu'ils semblent jouer un rôle dans le contrôle de la croissance des cellules cancéreuses, respectivement situés sur les chromosomes 17q21 et 13q12-13, de ces gènes. (Mathalien C. et al 1997)

La transmission des gènes BRCA se fait selon un mode autosomique dominant. Les mutations peuvent être transmises d'une génération à l'autre par le père ou la mère. Si la mutation est présente dans l'une des deux copies d'un gène BRCA du père ou de la mère, le risque d'un enfant d'hériter de cette mutation génétique est de 50 %. Cela signifie également que l'enfant a 50 % de chances de ne pas hériter de la mutation. (Le risque familial de cancer du sein et/ou de l'ovaire ,2002).

La présence du gène n'implique pas automatiquement l'apparition du cancer, il en augmente le risque de développer la maladie de 35 à 87 % avant l'âge de 80 ans. C'est pourquoi on parle de « prédisposition ». (Le risque familial de cancer du sein et/ou de l'ovaire ,2002).

5.1.2. Gène P 53

Le gène *p53* est situé en position 13.1 sur le bras court du chromosome 17. Est une phosphoprotéine de 393 acides aminés de poids moléculaire 53 kDa. On la trouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules transformées en culture ou dans les tumeurs humaine (Soussi *et al*, 2000).

La mutation du gène *P53* va augmenter le risque de carcinome mammaire dans un contexte de syndrome de Li-Fraumeni. Ce syndrome se transmet de façon autosomique

dominante et se caractérise principalement par la survenue de sarcomes, de carcinomes mammaires, de tumeurs cérébrales et de la surrenale (Lakhani *et al*, 2012). Lors d'un stress génotoxique ou non génotoxique, p53 est stabilisée et activée par des modifications post – traductionnelles. (Lane et al .2006)

5.2. Facteurs hormonaux :

Certaines hormones stéroïdes sexuelles sont impliquées dans le développement de la glande mammaire, mais sont parfois aussi considérées comme facteur de risque du cancer du sein. On distingue les hormones endogènes (œstrogènes, progestérone, prolactine et IGF1) et les hormones exogènes pouvant être apportées par les contraceptifs oraux, les traitements hormonaux substitutifs ou encore les xénoœstrogènes.

5.2.1. Hormones endogènes :

5.2.1.1. Âge précoce des premières menstruations

De nombreuses études montrent que la survenue des premières règles avant l'âge de 12 ans augmente le risque de cancer du sein. Le fondement biologique de cette association correspond à l'exposition précoce et prolongée à l'imprégnation hormonale qui existe durant la période d'activité des ovaires. (Nkondijock et al ,2005)

5.2.1.2. Ménopause tardive

Les femmes qui ont leur ménopause après 50 ans présentent un risque accru de cancer du sein, en comparaison avec celles dont les menstruations cessent précocement. Le risque de cancer du sein augmente d'environ 3 %, pour chaque année supplémentaire, à partir de l'âge présumé de la ménopause. Cette association entre l'âge et le risque de cancer du sein est similaire, que la ménopause soit survenue naturellement, ou qu'elle résulte d'une ovariectomie bilatérale. Le mécanisme par lequel la ménopause tardive augmente le risque de cancer du sein semble le fait d'une production prolongée des hormones ovariennes. (Nkondijock et al ,2005)

5.2.2. Hormones exogènes :

5.2.2.1. Contraceptifs oraux

Jusqu'à présent, il n'a jamais été établi de lien ferme entre la prise d'un contraceptif oral et la survenue de cancer du sein. Des chercheurs du Centre de recherche sur le cancer Fred Hutchinson, à Seattle, aux Etats-Unis, ont mis en évidence qu'une récente utilisation de contraceptifs oraux augmentait de près de 50% le risque d'apparition d'un cancer du sein. Leur étude, publiée dans *Cancer Research*, portant sur 1 102 femmes âgées de 20 à 49 ans et diagnostiquées avec un cancer du sein invasif, a également montré que le risque de cancer du sein variait selon la formulation de la contraception orale (Beaber et al ,2014)

Plus cette dernière est dosée en œstrogène, plus le risque de survenue de la maladie est élevé. Les pilules microdosées ne présenteraient ainsi pas de risque particulier de cancer du sein. (Latrakis et al ,2011)

5.2.2.2. Traitement hormonal substitutif (THS)

Plusieurs facteurs hormonaux modulent le risque de cancer du sein. Ce risque est notamment corrélé à l'imprégnation oestroprogestative, qui dépend de la durée de la période qui se situe entre la puberté et la ménopause. Les THS prolongent cette imprégnation naturelle et placent la femme traitée à un niveau de risque supérieur à celui d'une femme de même âge non traitée.

6. Les facteurs biologique et moléculaire

6.1. Les récepteurs hormonaux (RH)

Les récepteurs hormonaux (RE et RP) sont le plus souvent recherchés, à l'heure actuelle, par technique immunohistochimique sur des coupes histologiques de tumeur fixée et plus rarement par méthode biochimique sur des fragments congelés de tumeur (dosage par radio ligand ou par enzymo-immunométrie).

A l'inverse des méthodes biochimiques qui utilisent des broyats cellulaires, les méthodes immunohistochimiques permettent de localiser précisément les récepteurs hormonaux dans les différents contingents cellulaires (malin infiltrant, malin in situ, bénin)

Le seuil de positivité pour les RH est actuellement fixé à 10% de cellules positives quel que soit l'intensité du marquage. (GMG et al, 2012)

Remarque : lorsque le diagnostic de carcinome mammaire est fait sur une biopsie préopératoire, l'analyse de RH est généralement réalisée sur ce matériel initial. De nombreuses études ont montrés un très bon degré de concordance entre les résultats de l'analyse de RH sur les biopsies et les pièces opératoires. (Balaton et al, 1996)

Il n'en demeure pas moins que, vu l'existence possible mais rare d'une hétérogénéité intra-tumorale et vu l'importance de l'information pour la prise en charge des patients, la majorité des grosses équipes Européennes et Nord-américaines recommandent de refaire l'analyse des RH sur la pièce opératoire quand, et seulement quand, cette analyse était négative sur la biopsie préalable.(GMG et al, 2012)

Les récepteurs hormonaux ont une faible valeur pronostique mais sont des facteurs prédictifs importants de réponse à l'hormonothérapie (tamoxifène ou letrozole). (Allred et al, 1998)

6.1.1. Récepteur à l'oestrogène (RE)

Il existe deux récepteurs distincts de RE : RE α et RE β , de structure presque similaire mais codés par deux gènes différents : ESR1 et ESR2.

- RE α présente une positivité épithéliale nucléaire exclusive, c'est l'expression de ce gène qui est actuellement recherché par immunohistochimie. (Dontu G et al, 2004)
- RE β est retrouvé dans les cellules épithéliales et stromales, son expression est moins importante dans le tissu tumoral par rapport aux glandes normales. (Clarke RB et al, 2004)

L'expression de RE est retrouvée dans approximativement 70-80 % des carcinomes mammaires ; son expression est variable selon les différents types histologiques, plus importante dans les carcinomes lobulaires ; le taux d'expression chute en cas de tumeur peu différenciée. Son expression est retrouvée chez près de 65% des femmes de moins de 50 ans, alors que ce chiffre augmente à 80% chez les femmes de plus de 50 ans. (Murphy LC et al, 2000)

6.1.2. Récepteur à la progestérone (RP)

Les récepteurs à la progestérone jouent un rôle important dans le développement de l'arbre galactophorique. Les fonctions respectives des deux RP (A et B) ont été bien étudiées chez le rongeur. Dans le cancer du sein, lorsque les RP sont exprimés, la forme A

paraît en concentration supérieure à la forme B. La forme B est surtout retrouvée dans les grades 1 et 2, alors que la forme A est très majoritaire dans le grade 3 et serait associée à une survie moindre. (Clarke RB, 2003)

Une fois exprimée, RP est activé par l'hormone progestérone pour aider à réguler plusieurs fonctions cellulaires normales importantes, y compris la prolifération qui, bien sûr est préjudiciable dans les cancers du sein. RP est un facteur pronostique faible mais un facteur prédictif relativement fort pour la réponse au traitement hormonal. (Anderson E, 2010)

6.2. L'oncogène HER2 (HER2-neu ou c-erb2 ou neu)

Le gène Her2/neu encore appelé c-erbB-2 est un proto-oncogène identifié par son homologie de séquence avec le gène neu isolé au début des années 80 à partir d'un neuroblaste développé chez le rat. Ce gène est situé sur le bras long du chromosome 17, dans la bande q21.5 (Académie international de pathologie, 2000). Il code pour une glycoprotéine transmembranaire de 185 Kd à activité tyrosine kinase.

Cette protéine est un récepteur de facteurs de croissance cellulaire apparentée aux récepteurs d'EGF (epidermal growth factor). Elle intervient d'une part, dans la transduction des signaux de prolifération et de différenciation cellulaire, d'autre part dans l'embryogenèse et la motilité cellulaire. (Sauter G et al, 2009)

6.3. Ki 67 :

L'antigène Ki-67 fait partie des marqueurs de prolifération. Cet antigène est présent sur une protéine nucléaire de 360 kDa présent dans les cellules prolifératives. L'antigène Ki67 fut décrit par Gerdes en 1983(Gerdes J et al, 1984) après immunisation des souris par injection de noyaux de cellules de lymphome provenant d'un lymphome de Hodgkin (clone 67 de la plaque 96 puits, étude réalisée dans la ville de Kiel). (Brown D et al, 1990)

Il est présent au niveau du noyau des cellules prolifératives, en phase G1, S, G2 et M. (Cuyen Set al 2016)

7. Classification histologique de cancer du sein

7.1. Classification TNM (Tabl.1)

Le système de classification TNM est basé sur les caractéristiques de la tumeur primaire à savoir la taille tumorale (T), ganglions lymphatiques régionaux (N) et la présence des métastases (M). La principale fonction de cette classification TNM est d'évaluer le pronostic et ainsi déterminer un traitement adjuvant. (Singletary *et al*, 2006)

7.2. Classification OMS (Tabl.2)

La classification actuellement utilisée est celle de l'OMS 2003 (Tableau 2), les tumeurs épithéliales malignes ou carcinomes représentent la majeure totalité des tumeurs malignes du sein. Les cancers du sein de type canalaire sont les plus fréquemment rencontrés (70 à 80% des cas) (Bockeret *et al*, 2002).

7.3. Classification SBR

Au niveau anatomopathologique il faut prendre en considération le grade histopronostique SBR pour sa capacité d'évaluer le pléomorphisme nucléaire, l'index mitotique, formation ou différenciation des tubules (Bloom *et al*, 1957 ; Le Doussalet *et al.*, 1989).

À chaque élément un score de 1 à 3 lui est attribué, le grade SBR résulte de l'addition de ses trois scores. Tumeurs avec scores 3, 4 ou 5 sont considérées comme bas grade ou grade I, celles avec scores 6 ou 7 sont de grades intermédiaire ou grade II et les tumeurs à score 8 ou 9 sont de haut grade ou grade III. (Bloom *et al*, 1957)

Partie théorique

T	Tumeur primitive
	Détermination de la tumeur primitive impossible
	Pas de signe de la tumeur primitive
TX	Carcinome in situ
T0	Tumeur ≤ 2cm dans sa plus grande dimension
TIS	T1a ≥ 0,5 cm
T1	T1b >0,5 cm et ≥ 1cm
	T1c > 1cm et ≥ 2cm
	Tumeur > 2cm et ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension
	Tumeur >5 cm dans sa plus grande taille
T2	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau
T3	T4a extension à la paroi thoracique
T4	T4b œdème ou ulcération cutanée du sein
	T4c à la fois 4a et 4b
	T4d carcinome inflammatoire
N	Adénopathies régionales
NX	Appréciation impossible de l'atteindre ganglionnaire
N0	Absence de signes d'envahissement ganglionnaire régionale
N1	Ganglions axillaires cliniquement suspects homolatéraux mobiles
N2N3	Ganglions axillaire homolatéraux fixés entre eux ou à d'autres structures
	Ganglions mammaires internes homolatéraux
M	Métastases à distance
MX	Détermination impossible de l'extension métastatique
M0	Absence de métastases à distance
M1	Présence de métastases à distance

Tableau 01 : Classification TNM de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC).

Tumeurs épithéliales malignes
Carcinome non infiltrant (in situ) Carcinome intra-canaux sans autre indication Carcinome lobulaire in situ Carcinomes infiltrants Carcinome canalaire infiltrant sans forme commune Carcinome canalaire infiltrant avec composante intracanaux prédominante Carcinome lobulaire infiltrant Carcinome mucineux Carcinome médullaire Carcinome papillaire Carcinome tubuleux Carcinome adénoïde kystique Carcinome sécrétant Carcinome apocrine Carcinome métaplasique Carcinome riche en glycogène Carcinome à cellules en bague à chatons Carcinome à cellules riches en lipides Carcinome à différenciation neuro-endocrine Maladie de Paget du mamelon
Tumeurs malignes mixtes épithéliales et conjonctives
Sarcome phylloïde Carcinosarcome
Autres tumeurs malignes
Mélanome, Angiosarcome Autres sarcomes (sans autre indication) lymphomes
Métastases intra mammaires

Tableau 02 : Classification des tumeurs mammaires selon l'OMS

III. Classification moléculaire du cancer de sein

La classification anatomoclinique utilisée pour optimiser la thérapeutique des cancers du sein est prise en défaut dans un certain nombre de cas du fait de l'hétérogénéité de ce cancer, ce qui est source de sur traitement inappropriés.

L'étude des altérations génomiques des cancers du sein a permis de mieux classer les tumeurs et de les séparer en « sous type intrinsèques » ou en « sous type moléculaire » dans le but d'une personnalisation thérapeutique. En 2000, Perou et son équipe avaient identifiés quatre groupes de tumeurs ayant différentes caractéristiques moléculaires: (Tabl.04) luminal like, basal like, HER2 et normal like, ce dernier type fut ensuite écarté car il correspondait à un biais de sélection de certaines tumeurs contaminées par du tissu mammaire non cancéreux (Hu *et al.*, 2006), plus tard le groupe Luminal positif a été divisé en deux sous-groupes : Luminal A et Luminal B, chacun de ces deux sous-groupes a son propre profil moléculaire. (Sorlie *et al.*, 2001)

1. Luminal like

Il est connu que toutes les tumeurs RE+ ne répondent pas à l'hormonothérapie mais on ne savait pas très bien lesquelles sauf à considérer le taux des RP qui est un facteur discriminant (Lamy *et al.*, 2002). Les deux types luminaux A et B répondent à la question de l'hormonosensibilité : les tumeurs lumineuses A sont des tumeurs de bon pronostic, hormonosensibles pures et les tumeurs lumineuses B sont des tumeurs de mauvais pronostic chez qui le traitement antihormonal est insuffisant et qui pourrait relever de la chimiothérapie. (Lamy *et al.*, 2002)

1.1. Sous type luminal A

Représente 56 à 61% des cas, il exprime le plus fortement les RE et présente une forte expression du facteur nucléaire d'hépatocyte 3, de LIV-1 et des cytokératines lumineuses 7, 8, 18, 19 ainsi que des mutations de gènes en plus grande proportion le PIK3CA (45%) (Garcia closa *et al.*, 2007).

1.2. Sous type luminal B

Représente 9 à 16% des cas, il est de mauvais pronostic par rapport au type luminal A, il présente une expression faible ou modérée des gènes spécifiques du type luminal, mais

Partie théorique

d'avantage de mutations de la protéine p53 et PIK3CA (29% chacun) que le type A, il présente également une expression élevée des gènes reliés à la prolifération. Le type luminal B se caractérise aussi par l'expression, dans certains cas, de HER2 et de marqueurs de prolifération (Livasy *et al.*, 2006 ; Yersal *et al.*, 2014).

2. Basal like

Le type basal-like a la particularité de survenir chez des femmes jeunes et chez des femmes pré ménopausées d'origine africaine et américano africaine (Carey *et al.*, 2006). Il est associé aux cancers dit « triples négatifs » regroupe les tumeurs RE-, RP- et HER2-. Quatre-vingt-quinze pour cent des tumeurs basal-like sont RE négatives, 82 % d'entre elles présentent une mutation de p53 et incluent les tumeurs BRCA1 mutées. Elles surexpriment les cytokératines basales (5/6, 14, 17, la vimentine, l'EGFr et cKit) (Livasy *et al.*, 2006).

La CGH array a montré que le sous type basal est caractérisé par une instabilité du génome due à de fréquentes altérations des gènes de type gain-perte et par de moins fréquentes altérations de type amplifications-délétions (Adélaïde *et al.*, 2007 ; Korsching *et al.*, 2002) ainsi qu'à de fréquentes inactivations de la voie de signalisation RB (Herschkowitz *et al.*, 2008).

3. Normal like

L'expression génique est proche de celle du tissu mammaire normal. Le phénotype des tumeurs de ce sous type n'est pas décrit. Leur pronostic est intermédiaire. Il reste environ 10 à 15 % de tumeurs in classes n'appartenant pas aux groupes précédemment décrits. Certains sous-types sont eux-mêmes hétérogènes tels que les sous-types luminal A (hétérogénéité des tumeurs ER+), basal (p53 +/- ; BRCA1) et HER2 (ER +/-) et des analyses plus approfondies permettront d'améliorer cette classification. Ces sous-types moléculaires, ce qui permet de les prendre en compte en clinique (M.C. Mathieu . 2007).

4. Dit « HER2 »

Appartenant à la famille des récepteurs de facteurs de croissance épidermique (ERB), le HER2 est impliqué dans les voies de signalisation intracellulaire contrôlant notamment la prolifération cellulaire. Le gène codant pour la protéine HER2 est amplifié dans 18 à 20% des cancers du sein non métastatique (Slamon *et al.*, 1987, Ravdin *et al.*, 1995).

Partie théorique

Le type HER2+ correspond au type possédant une amplification du HER2 (80%), des mutations au niveau du gène TP53 (72%) et de PIK3CA (39%) sont également observées. La surexpression de HER2 est le facteur prédictif concernant le bénéfice clinique pouvant être apporté par l'administration d'un anticorps monoclonal anti-HER2 (trastuzumab) (Slamon *et al.*, 2001).

Sous type moléculaire	Critères utilisés
Luminal A	RE(+), RP(+), Her2(-), Ki 67 < 20 %
Luminal B	RE(-), RP(+), Her2(+) et Ki 67 élevé
Her2	RE(-), RP(-) et Her2(+)
Basal like	RE (-), RP(-), Her2(-)

Tableau 03 : Critères utilisés pour la classification moléculaire du cancer du sein.

Sous-type	Origine	phénotype	Type histologique du carcinome	pronostic
Basal	Cellule myoépithéliale	RE-HER- CK5/ 6 + EGFR+	-Canalaire de grade III - Médullaire -Métablasique	défavorable
HER2	Non connu	HER2+ CK8/ 18+ CK19+	- Apocrine -Canalaire de grades II-III	Défavorable
Luminal	Cellule luminale	RE+CK8/ 18+ CK19+	-Canalaire de grade I	favorable

Tableau 04 : Caractéristiques des principaux sous-types moléculaires.

Partie pratique

I. Matérielle

Notre stage a été réalisé de 22 Décembre 2019 à 19 Mars 2020 au niveau de l'hôpital de sœurs bedj (CHLEF) service d'oncologie avec Docteur (e) BADAOUI et dans laboratoire privé d'anatomopathologie du Docteur DJAIT (RELIZANE), Sous la direction de Dr GUEDOUAR Y, maitre de conférence à l'université de Mostaganem.

Notre étude est effectuée sur des patientes porteuses d'un nodule, recrutées pour une tumorectomie ou mastectomie avec curage axillaire, et c'est ainsi que nous avons sélectionné 50 patient pour lesquelles les diverses caractéristique tumorales sont précisées.

II. Méthodes

Pour la recherche de ce travail, nous avons réalisé la technique histologie et immunohistochimie pour l'analyse de différent prélèvement. Nous avons élaboré un questionnaire (tableau de stage) où avaient été consignées toutes les données en plusieurs étapes.

1. Histologique

Le microscope photonique en transmission ne peut fournir d'images que si la préparation à examiner est suffisamment fine pour se laisser traverser partiellement par la lumière. C'est pourquoi on a l'habitude de pratiquer une inclusion du tissu préalablement à la coupe

Il est réalisable après plusieurs étapes : fixation, inclusion, les coupes et la coloration.

1.1. le prélèvement

La première étape de ce processus est le prélèvement qui consiste à obtenir un échantillon de tissus soit une biopsie ou de pièce opératoire.

Les prélèvements reçus sont analysés macroscopiquement et si nécessaire, ils sont recoupés pour obtenir des pièces de petite taille, qui sont alors déposées dans des cassettes d'inclusion en plastique servant de contenant pour la suite de la manipulation.

1.2. Fixation

Afin de conserver les tissus prélevés dans un état proche du vivant, ils sont fixés tout de suite après le prélèvement dans du formol 10% (Substance chimique que l'on appelle le fixateur).

Les intérêts de la fixation sont multiples: immobilisation des constituants tissulaires et cellulaires et prévention de l'autolyse cellulaire.

1.3. Déshydratation

Qui est réalisée dans un automate (fig.04). La déshydratation se fait par des passages successifs dans 6 bacs d'alcool de concentration plus en plus concentré « jusqu'à alcool pure » pendant 1 heure pour chaque back.

Puis dans 3 bacs de xylènes pure dans les quelle la paraffine est miscible.



Figure 04 : appareil d'automate

1.4. Inclusion (fig.05)

Les Prélèvements sont plongés dans 2back de paraffine liquide à température de 45 à 70°C qui occupera tous les espaces vides dans le tissu.

A la sortie de l'automate, les prélèvements sont sortis de sa cassette d'inclusion et déposé dans un moule qui peut être rempli de paraffine chauffée. Laisser la paraffine en refroidissant, ce qui formera un bloc dans lequel l'échantillon de tissus est inclus.



Figure 05 : l'étape de l'inclusion.

1.5. Coupe (Fig.06)

Les blocs démoulés sont étiquetés afin de les référencer. Grâce à un microtome comportant un rasoir, des coupes de $3\ \mu\text{d}$ 'épaisseur sont obtenues.

Il est difficile d'observer correctement le prélèvement au microscope car les couches de tissus se superposent.

Les fines coupes réalisées sont ensuite copier dans des lames de verre « deux coupes sur la même lame » flottaison à la surface d'un bain chaud « Chauffé à 40°C » puis séchées afin d'adhérer parfaitement à la lame.

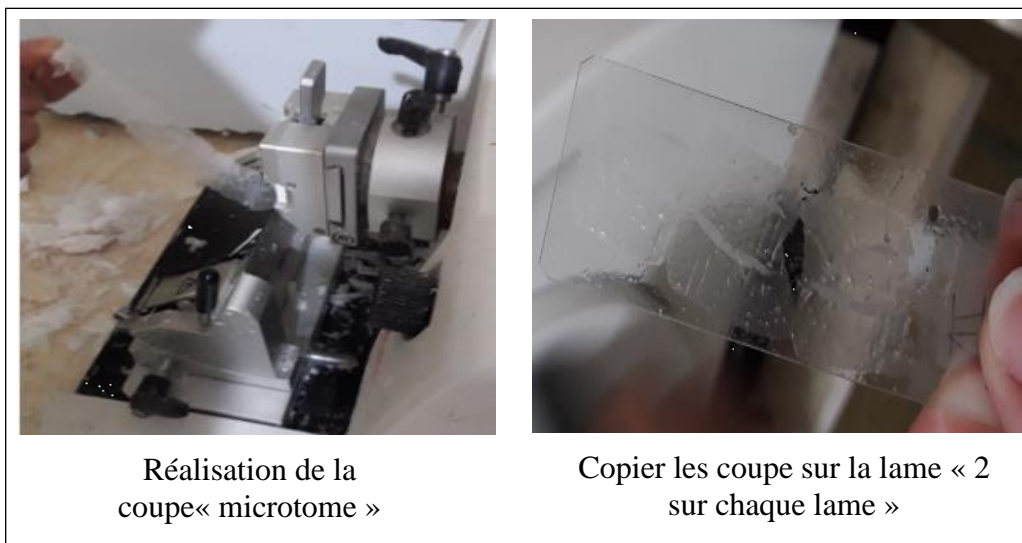


Figure 06 : l'étape de réalise des lames.

Partie pratique

1.6. Réhydratation

Se fait par passages successifs dans 2 bacs de xylène et 2 bacs d'alcools moins en moins concentré pendant 10 min pour chaque bain

En fin par passage dans un bain de l'eau pour pouvoir être colorées.

1.7. Coloration (tab.05)

La coloration utilisée est Hématoxyline-Eosine (HE) (Fig.07)

Elle consiste à plonger les coupes premièrement dans un bain de l'hématoxyline puis d'un lavage avec l'eau pendant 5 min pour les deux.

Les coupes sont ensuite immergées dans l'éosine pendant quelque seconde. L'excès d'éosine est éliminé par un lavage abondant à l'eau courante pendant 4 min pour éliminer l'excès de l'éosine.



Figure 07 : coloration par HE.

Colorant	Affinité	Coloration
Hématoxyline	Noyaux	Violet
L'éosine	Cytoplasme	Rose

Tableau 05 : la coloration.

1.8. Montage

C'est la dernière étape de la préparation des lames histologiques, consiste à mettre une goutte de l'Eukitt puis posée une lamelle avec petite pression pour l'élimination complète des bulles d'air. (Fig.08)



Figure 08 : les lames histologiques

1.9. L'observation

Utiliser un microscope de plus en plus fréquemment dans la pratique médicale, à différents grossissements afin de localiser les carcinomes infiltrants pour lesquels seront précisés les paramètres histopathologiques.

2. Immunohistochimie (IHC)

L'immunohistochimie est une méthode morphologique permettant de localiser des antigènes dans les tissus ou les cellules, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon spécifique contre ces antigènes, et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré.

Des coupes de 2 à 4 μ réalisées au microtome à partir des blocs qui réalisent dans la technique histologique et copient sur des lames spécifiques pour immunohistochimie. Les lames sont étiquetées (RE, RP, HER2 et CK5/6)

Dans cette méthode on utilise la technique LEIKA

Partie pratique

2.1. Déparaffinage

Mettre les lames d'immuno dans l'étuve pendant toute la nuit à 58°C « pour la fixation »

2.2. Réhydratation

Elle s'effectue à l'aide de 2 bains de xylène, suivis de 2 autres bains d'alcool pure pendant 10 min pour chaque bain. (Fig.09)

Puis dans un bain de l'eau distillée pendant 5 min.



Figure 09 : les bacs de réhydrations.

2.3. Démasquage

Préparer 2 bacs avec PH6 et PH9 (Fig.10), plonger la porte lames de RE et HER2 dans le bac de PH9, et de RP et Ki67 dans PH6.

Mettre lui dans le bain marie à 92-98°C pendant 42 min, déposer sur la pailleuse pour refroidie un peu pour éviter le choc thermique pendant 20 min. Déposants dans un bain d'eau courante quelques minutes. Rincer avec le TBS pendant 5 min et cercler le fragment avec le novo Pen.

Partie pratique



Figure 10 : préparation des bacs de l'étape démasquage.

2.4. Utilisation du kit

Déposer les lames dans une chambre (boîte) humide et sombre. Mettre sur chaque fragment une goutte de ces produits :

- Peroxydase Block « jeune » : pendant 10 min.
- Protéine Block « vert » : pendant 5 min.

Si le fragment d'une micro biopsie il se fait une seule goutte, mais si le fragment d'une mastectomie on fait deux gouttes. Toujours recouvrir après chaque manipulation.

Après chaque produit effectuer deux rinçages par TBS pendant 5 min.

- ❖ **Déposer les anticorps primaires** sur les fragments (chaque fragment à un anticorps spécifique) pendant 1 h. (Fig.11)



Figure 11 : les anticorps utilisés.

Partie pratique

- Post Primary « Ac secondaire-rouge » : La réaction durera 30minutes suivi de deux bains de TBS de 5 minutes chacun.
- Polymer « violet » : pendant 30 min, puis 2rincages TBS de 5 min.
- DAB « marron » :diluer50µl de , Dans 1ml de Déposé sur les lames pendant 3 min puis 3 rincages par TBS de 5 min.
- Hématoxyline « bleu » : pendant 5 min puis effectuer 2 rincages par eau du robinet, 1 rincage de 3min TBS, 1rincage de 3 min eau distillée. (Fig.12.13)



Figure 12 :
solution DAB.



Figure 13 : le kit Novolink de Leica.

2.5. Montage

Il réaliser comme le montage de technique histologique par l'utilisation de l'Eukitt.

2.6. L'observation microscopique:

L'observation est faite au faible grossissement en vue de repérer la structure d'ensemble puis au moyen et fort grossissement pour l'appréciation du marquage dans l'ordre suivant :

- Les lames traitées avec les anticorps anti-récepteurs nucléaires (RE et RP).
- Les lames traitées avec les anticorps anti-oncoprotéine membranaires HER2.
- Les lames traitées avec les anticorps anti-pan-cytokératines CK 5/6.

Résultats

et

discussions

1. Caractéristiques globale de carcinome infiltrant

Etude descriptive transversale prospective de 50 patients ayant un carcinome mammaire infiltrant, diagnostiquées au service de médical et d'oncologie.

Les résultats de notre étude sont exposés en deux parties :

- Etude des caractéristiques clinico-histopathologies et biologiques des 50 cas de carcinomes infiltrant.
- Détermination immunohistochimie des sous-types moléculaires.

1.1. Caractéristiques clinico-histopathologiques

Notre analyse de l'ensemble des tumeurs (50 cas) montre une répartition variable selon les paramètres cliniques, histopathologiques et biologiques.

1.1.1. Répartition selon Age des patientes

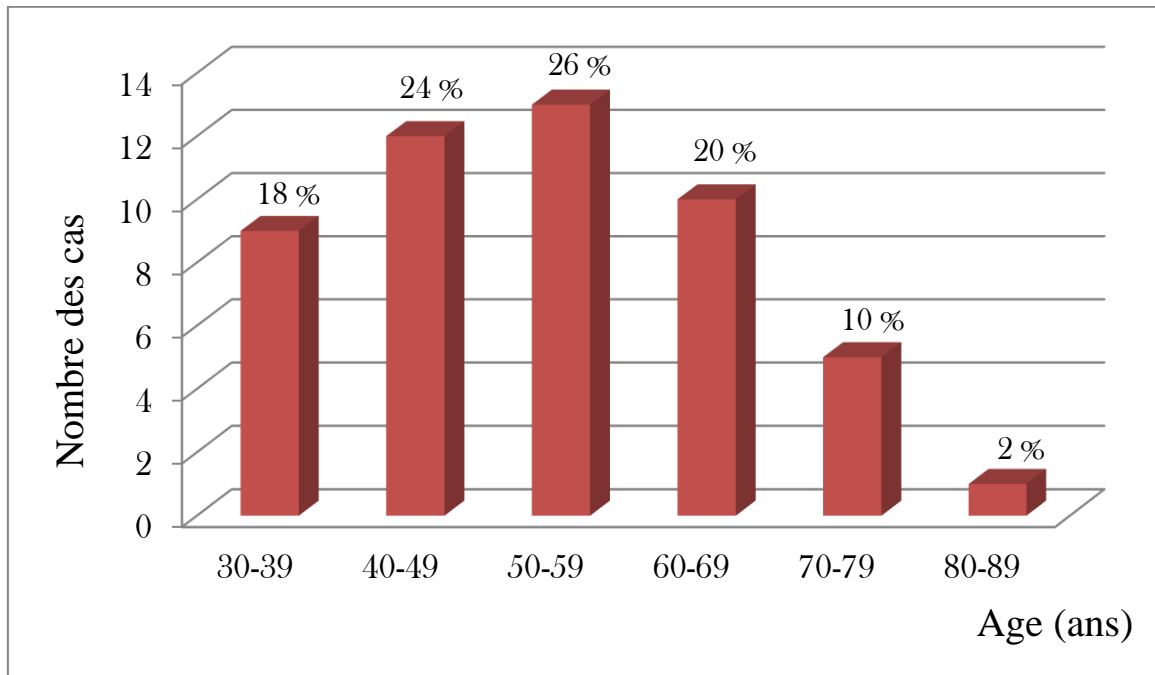


Figure 14 : Distribution de la population en fonction de l'âge.

Résultats et discussions

L'âge moyen était de 50 ans avec des extrêmes allant de 30 à 81 ans. L'étude de la distribution de la population en fonction de l'âge montre que la tranche d'âge la plus touchée se situe entre 50-59 ans avec un pourcentage de 26%. (fig.14)

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).

Nos résultats n'est pas similaire avec les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.1.2. Répartition selon la taille tumorale

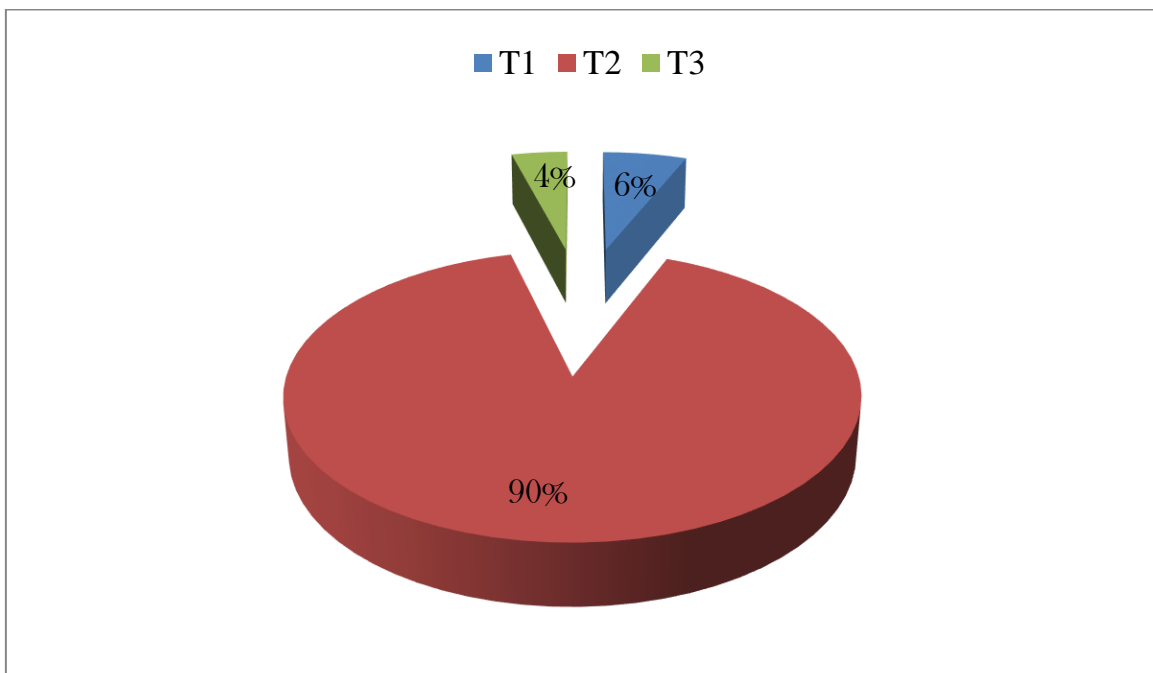


Figure 15 : répartition des tumeurs selon la taille.

Dans notre série la taille varie de T1 à T4 (0,1 à 5,5cm) avec une prédominance de T2 (90%), (fig.15). Il s'agit de la taille post chirurgicale (pT) des tumeurs déterminées par la classification TNM.

Ce qui concorde avec ceux de la littérature les travaux de GUEDOUAR (2011).

La taille de la tumeur est liée à l'évolution de la maladie ; plus une tumeur est volumineuse, plus son évolution est défavorable.

1.1.3. Répartition des tumeurs selon le type histologique

Il y a deux types de carcinomes infiltrant dans notre population : carcinome canalaire infiltrant et carcinome lobulaire infiltrant.

Dans notre série en marque la prédominance de carcinome lobulaire infiltrant avec un pourcentage de 76% par rapport aux carcinomes canalaire infiltrant 24%.

Nos résultats n'est pas similaire avec les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.1.4. Répartition selon le Grade SBR

La classification histopronostique de Scarff - Richardeon permet de distinguer 3 grades selon le degré de différenciation des structures glandulaire.

Les tumeurs de grade II de SBR se placent en première position avec un pourcentage à 68% des cas, suivies par les tumeurs de grade III à 32%, suivies par l'absence du grade I.

Notre résultat est similaire à ceux de la littérature qui soulignent le haut grade et le pronostic le plus défavorable pour la survie globale et pour la survie sans rechute des carcinomes infiltrants (GUEDOUAR et al, 2017)

Ce qui concorde avec ceux de la littérature les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.1.5. Répartition selon l'envahissement ganglionnaire (N)

L'étude anatomo-pathologique des ganglions a révélé que 37% des patientes étaient porteuses de ganglions sains classés N- contre 63% classées N+. Ce qui souligne une évolution défavorable.

Nos résultats n'est pas similaire avec les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.2. Caractéristiques Biologiques

Nos travaux portent sur les facteurs biologiques ou moléculaires utilisés en routine et ayant une utilité clinique prouvée tels qu'ils sont définis par le Consensus Américain de Pathologie (CAP).

Ces facteurs de catégorie sont représentés par les récepteurs hormonaux (RE et RP) et l'oncoprotéine.

1.2.1. Répartition des carcinomes selon les récepteurs nucléaires

La détermination de l'expression des récepteurs hormonaux nucléaires est réalisée par la technique immunohistochimie.

1.2.1.1. Expression des récepteurs d'œstrogène (RE)

L'analyse immunohistochimique des carcinomes infiltrants montre que les récepteurs d'œstrogène (RE) sont exprimés 33 cas soit (66%). L'absence d'expression des RE dans (34%) des carcinomes est un facteur défavorable.

Ce qui concorde avec ceux de la littérature les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.2.1.2. Expression des récepteurs progestérones (RP)

L'analyse immunohistochimique des carcinomes infiltrant montre que 31 cas sont avoir RE positive soit (62%). L'absence d'expression des RE dans 19 cas soit (38%) des carcinomes est un facteur défavorable.

Nos résultats n'est pas similaire avec les travaux de GUEDOUAR (2011).

1.2.2. Expression membranaire de l'oncoprotéine HER2

La recherche de l'expression de l'oncoprotéine HER2, réalisée par l'immunohistochimie, au niveau de la composante carcinomateuse infiltrante permet de visualiser le marquage membranaire des cellules tumorales.

On distingue trois groupes de l'oncoprotéine :

1. Le groupe HER2 - : score 0 et 1 soit 74% « 37 ». (Fig. 16)
2. Le groupe HER2 + : score 3 soit 20% « 10 ».
3. Le score 2 : soit 6% « 03 ».

Nos résultats indiquent que l'oncoprotéine HER2 score 1 est fortement exprimée dans 40%, alors une fortement exprime de HER2 + dans 74% et le moine exprimée c'est le HER2 score 2 dans 6% de tumeur. Ce qui concorde avec ceux de la littérature les travaux de GUEDOUAR (2011).

Les patientes ayant une tumeur HER2 ont une survie sans progression et une survie globale moins longues que celles HER2-. (Ross et al, 2004)

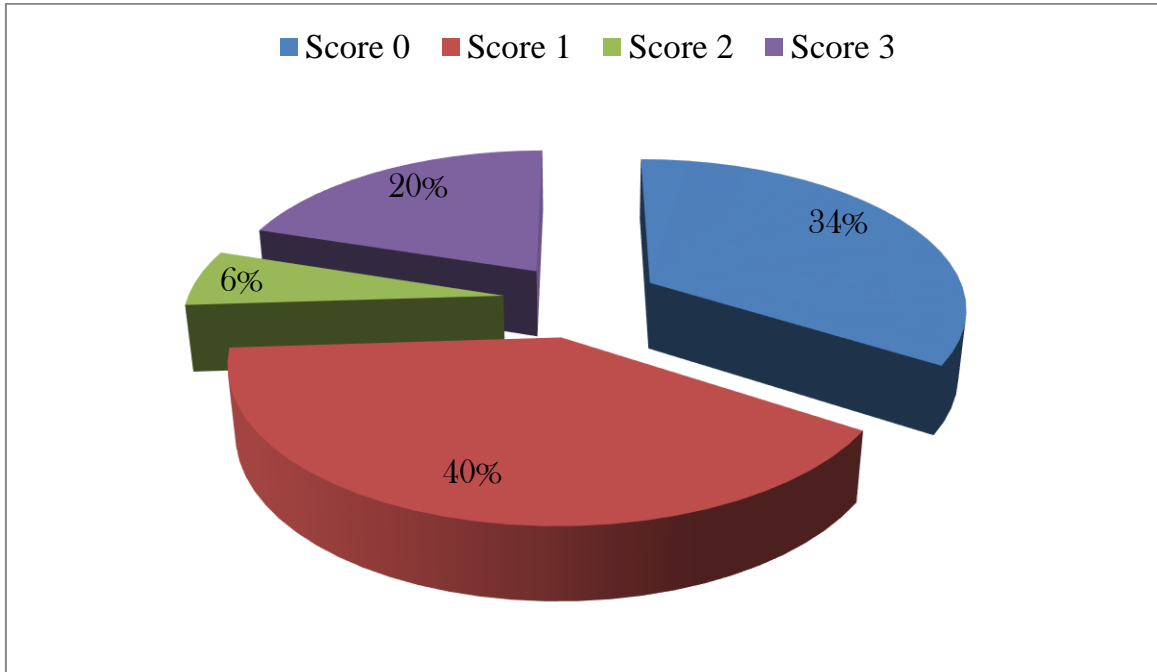


Figure 16 : répartition selon expression membranaire de HER2.

1.2.3. Expression de l'antigène Ki67 :

Le Ki67 est un antigène, recherché dans le cas de cancer du sein notamment, par le biais des anticorps Ki67 en immunohistochimie. Cet antigène, présent dans les noyaux des cellules tumorales, est un marqueur de la prolifération cancéreuse.

L'analyse des lames des 50 carcinomes par l'antigène Ki67 révèle la présence dominante des tumeurs $Ki \geq 14$ soit 58%, et 42% des tumeurs ont un $Ki67 \leq 14$.

1.3.Détermination imminohistochimique des sous –types moléculaires.

La classification moléculaire du cancer du sein a permis de répartir les carcinomes mammaires selon 4 groupes distincts : 51% des tumeurs appartiennent au groupe luminal A, 32% au groupe luminal B, 14% au groupe HER-2, 03% au groupe Basal. (Fig.17)

Résultats et discussions

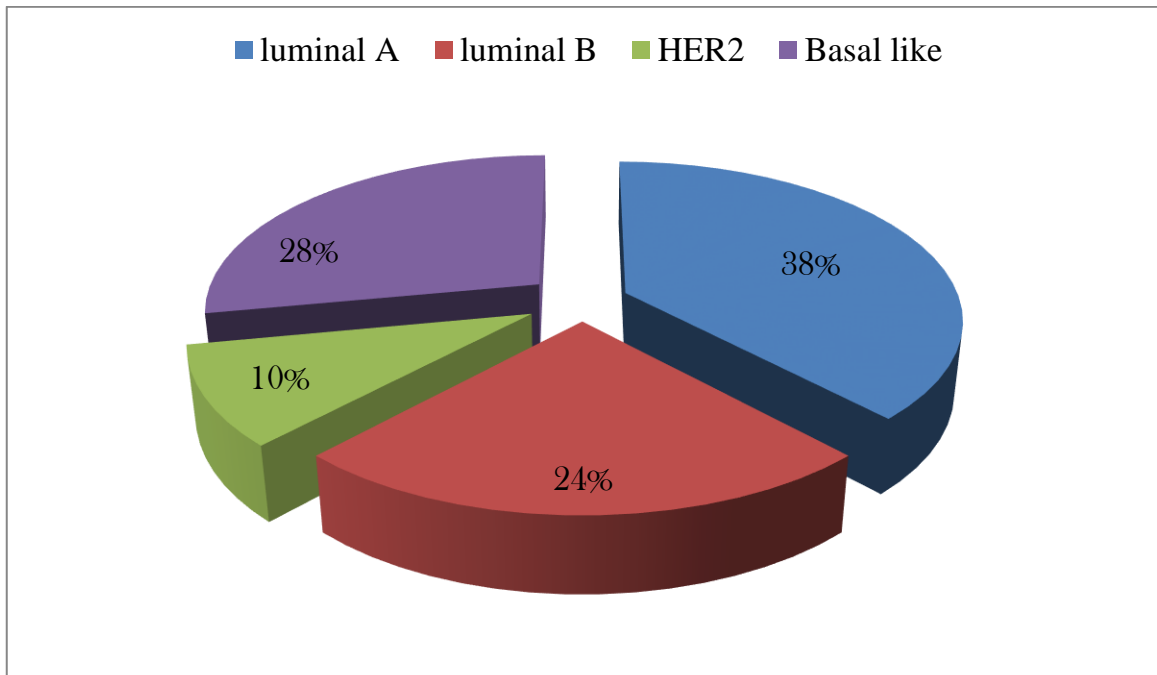


Figure 17 : Répartition des tumeurs selon la classification moléculaire.

	Récepteurs clinico-histopathologiques												
	Age moyen des patients	Sein atteint		Taille tumorale (pT)			Grade SBR			Type histologique		l'envahissement ganglionnaire (N)	
		G	D	T1	T2	T3	GI	GII	GIII	CCI	CCL	N-	N+
Carcinomes infiltrants 50 cas	50 ans	30%	20%	6%	90%	4%	0%	68%	32%	24%	76%	37%	63%

Tableau 06: résumé les résultats d'analyse des récepteurs clinico-histopathologiques des carcinomes infiltrants.

- Les femmes de plus de 50 ans sont plus touchées : 58% versus 42%.
- Le sein gauche plus touchées (30 cas) que le sein droit (20 cas).
- La taille tumorale T2 prédomine : 90% versus 10%.

Résultats et discussions

- Le grade histopronostique SBR II est majoritaire : 68% versus 32%.
- Le type histologique CCL prédomine : 76% versus 24%.

L'envahissement ganglionnaire N+ est augmenté : 63% versus 37%.

	Récepteur biologiques spécifiques							
	Récepteurs œstrogènes (RE)		Récepteurs progestérones (RP)		Récepteurs oncoprotéines (HER2)		Récepteurs antigènes (KI67)	
	RE-	RE+	RP-	RP+	HER2-	HER2+	Ki67 \leq 14	Ki67 \geq 14
carcinomes infiltrant 50 cas	34%	66%	38%	62%	74%	20%	42%	58%

Tableau 07: résumé les résultats d'analyse des récepteurs biologiques des carcinomes infiltrants.

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

- Récepteurs hormonaux: RE+ « 66% », RE- « 34% ».
RP+ « 62% », RP- « 38% ».
- Oncoprotéine HER2: HER2- « 74% », HER2+ « 20% ».
- Antigène Ki67: Ki67 \leq 14 « 58% », Ki67 \geq 14 « 38% ».

	Luminal A	Luminal B	HER2	Basal like
Profil moléculaire des patients (50 cas)	51%	32%	14%	3%

Tableau 08: résumé les résultats d'analyse immunohistochimique des sous types moléculaires des carcinomes infiltrants.

Résultats et discussions

L'identification du sous-type Luminal revêt une signification particulière, car la dégradation du marquage IHC des RE est retrouvée par les analyses génomiques au niveau de la classification moléculaire avec la distinction de deux entités selon l'expression du récepteur aux estrogènes : Luminal A (RE⁺⁺, RP⁺, HER2⁻, Ki67 faible) et Luminal B (RE⁺, RP^{+/-}, HER2⁻, Ki67 fort), (Guedouar et al. 2013).

- Luminal A: 51% (19 cas) sur 50 cas.
- Luminal B: 32% (12 cas) sur 50 cas.
- Basal like: 14% (14 cas) sur 50 cas.
- HER2: 3% (5 cas) sur 50 cas.

Conclusion

Le cancer du sein est une maladie très fréquente ayant des répercussions graves sur plusieurs volets. Il touche les quatre coins du monde à tous les âges de la puberté à la ménopause.

En effet, le cancer du sein reste la première cause de mortalité chez les femmes, chaque patientes atteints du cancer du sein subits un traitement précis et différent selon le stade, le type et le grade des tumeurs malignes.

Dans notre étude, nous nous sommes fixés comme objectif d'analysé les paramètres cliniques, histopathologie et pronostiques chez les 50 patientes.

- Caractéristiques cliniques :

La moyenne d'âge des patientes de notre population d'étude était de 50 ans avec des extrêmes de 30 ans et 81 ans. La tranche d'âge la plus touchée étant de 30 à 50 ans avec un taux de 47.84%.

- Caractéristiques histopathologies :

Le type histologique le plus observé et le Carcinome Lobulaire Infiltrant (76%)

- Caractéristiques biologique :

Récepteurs Estrogéniques (RE-) 66% Récepteurs Progestéronique (RP-) 62%,
expression de l'oncoprotéine (HER2) : HER2 - (74%), HER2 + (20%).

En conclusion, une femme de plus de 50 ans qui n'a jamais allaité, aura beaucoup plus de risques d'avoir un cancer du sein qu'une femme de moins de 30 ans qui a des enfants, qui fait du sport et qui se fait souvent contrôler chez un médecin traitant. Mais hélas cette dernière n'est pas à l'abri pour autant de développer un cancer tout au long de sa vie.

Ce n'est pas parce qu'aucun de ces facteurs nous touche de loin ou de près que nous sommes à l'abri de contracter un cancer du sein, d'où l'importance de faire régulièrement des contrôles soi-même ainsi que de consulter un médecin.

Référence bibliographique

A

- Andre F, Job B, Dessen P, Tordai A, Michiels S, Liedtke C, *et al*, Molecular characterization of breast cancer with high resolution oligonucleotide comparative genomic hybridization array. *Chemical cancer research: an official journal of the American Association for cancer Research*. 2009,15(2):441-51.
- Adélande J, Huang HE, Murati A, Alsop AE, Orsetti B, *et al*. A recurrent chromosome translocation breakpoint in breast and pancreatic cancer cell lines targets the neuregulin / NRGI gene. *Gene Chromosomes Cancer*. 2003;37(4):335-45.
- Adélande J, Huang HE, Murati A, Alsop AE, Orsetti B, *et al*. A recurrent chromosome translocation breakpoint in breast and pancreatic cancer cell lines targets the neuregulin / NRGI gene. *Gene Chromosomes Cancer*. 2003;37(4):335-45.
- Abbass F, Akasbi Y, Znati K, El Mesbahi O, Amarti A, Bennis S, 2012, classification moléculaire du cancer du sein au Maroc, *The Pan African Medical Journal*, V 13: 91, [NCBI].

B

- Bocker W. [WHO classification of breast tumors of the female genital organs: pathology and genetics]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*. 2002;86:116-90.
- Bloom HJ, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer, a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *BR J Cancer*. 1957;11(3):359-77.
- Bakkouche Z, Kahia-Tani S, Ben Ali F. Evaluation du statut HER2 dans les carcinomes mammaires. *Forum de Cancérologie de la Société Française du Cancer*. 2007. *Eurocancer*.
- Bakkouche Z, Kahia-Tani S, Bendib A. Etude immunohistochimique des récepteurs hormonaux dans les carcinomes mammaires. 2000, X (5) : 242-247.

C

- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Galt L, Morre DT, Collichio F, *et al.* The triple negative parafox:primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *clinical cancee research: au of ficial Journal of the American Anociation foe cancer Research.*

2007;13(8):2329.34

- Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Galt L, Morre DT, Collichio F, *et al.* The triple negative parafox:primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *clinical cancee research: au of ficial Journal of the American Anociation foe cancer Research.*

2007;13(8):2329.34.

- Carey IA, Pernou CM, livasy CA, Dressler LG, Cowan D, CONway K, *et al.* Race, breast cancer subtypes; and surnival in the carolina breast cancer study. *Jama.*

2006;295(21):2492-502.

- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz J-M, De Anglis R, Capocaccia R, *et al.* cancer survivalin five continents; a worldwide population. based study (CONCORD) . *The Iancet Oncology* : 2008; 9(8): 730-56

F

- Fédération Nationale des Centres de Lutte Contre le Cancer (FNCLCC) et La Ligue Nationale Contre le Cancer, 2009, Paris.

G

- Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Gonzalez R, Navarro A, *et al.* ALlelic loss of the pten region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast cancer Restreat.* 1999;57:237.243.

- Garcia JM, Silva JM, Dominguez G, Gonzalez R, Navarro A, *et al.* ALlelic loss of the pten region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype. *Breast cancer Restreat.* 1999;57:237.243.

H

- Herschkowiz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usay J, Hu Z, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology.* 2007;8(5):R76.
- Herschkowiz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usay J, Hu Z, *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology.* 2007;8(5):R76.
- Herch Kowiz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaeli I, Hu Z, *et al.* Identification of conserved gene expression Features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology.* 2007;8(5):R76.
- Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, *et al.* The molecular portraits of Breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC genomics.* 2006;7:96

K

- Korsching E, Packerisen J, Agelopoulos K, Eusenacher M, voss R, Isola J, *et al.* Cytogenic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer : integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Laboratory investigation : a journal of technical methods and pathology.* 2002;82(11):1525-33.
- Korsching E, Packerisen J, Agelopoulos K, Eusenacher M, voss R, Isola J, *et al.* Cytogenic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer : integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Laboratory investigation : a journal of technical methods and pathology.* 2002;82(11):1525-33.

L

- Le risque familial de cancer du sein et/ou de l'ovaire. Livret d'information et de dialogue à l'usage des personnes consultant pour un risque familial .Validation juin 2002 de cancer du sein et/ou de l'ovaire.

- Le risque familial de cancer du sein et/ou de l'ovaire Livret d'information et de dialogue à l'usage des personnes consultant pour un risque familial .Juin 2002. Le cancer du sein et/ou de l'ovaire.p8-11.

- Lorient Y., Mordant P.2011 .Cancérologie, cahiers des ECN, conférences de consensus. Elsevier Masson, Paris.

- Lamy PJ, Pujol P, Thezeras S, kramar A, Rouaner P, Guilleux F, *et al.* progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. Breast cancer research and treatment. 2002; 76(1):65-71.

- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakora MS, Olopade OI, Moore DT, *et al.* phenotypic evaluation of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. Modern pathology: an official journal of the United states and canadian Academy of pathology, Inc. 2006;19(2):264-71.

- Lamy PJ, Pujol P, Thezeras S, kramar A, Rouaner P, Guilleux F, *et al.* progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. Breast cancer research and treatment. 2002; 76(1):65-71.

- Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakora MS, Olopade OI, Moore DT, *et al.* phenotypic evaluation of the basal like subtype of invasive breast carcinoma. Modern pathology: an official journal of the United states and canadian Academy of pathology, Inc. 2006;19(2):264-71.

M

-Marina Puddu et Jean Tafforeau, 2005, Opportunité de dépistage du cancer du sein chez les femmes de 40 à 49 ans, institut scientifique de la santé publique,P(1_282).

-M .C .Mathieu. Les sous types moléculaires des cancers du sein « Molecul subtype of breast cancer ».33_34. la lettre du sénologue_ n0 38_octobre_novembre_décembre 2007.

-Mathalieu C., *et al.* Examen clinique du cancer du sein EMC, gynécologie 1997 : 1, 4, 5,7 et 8.

P

-Perrou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular Portraits of human breast tumours Nature. 2000;406(6797):747-52.

- Preat A, Parker JS, Karginova O, Fanc, Livasy C, Herch kowiz JIb, *et, al,* phenotypic and molecular charaterization of the claudin. low intrinsic subtype of breast cancer. Breast cancer research : BCR. 2010;12(5):R 68.

R

- Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanili M, Andersonk K, *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. chiminal cancee research: an official journal of the American Association for cancer Research 2005;11(6):5678.85.

-Ravdin PM, Chamness GC, The C - erb B-2 proto -oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a larding for the developement of other macromoleculae markers. a review. Gene. 1995;159(1):19-27.

S

- Sorlie T, Perrou CM, Tibslirani R, Aas T, Geisler S, *et al.* Géne expression patteins of breast carcinomes distinguish tumour subclasses with clonical implication. P roc Natl Acad sci USA. 2000; 98(19): 10869-74.

- Slamon Dj ,Clark GM,Wong SG, Levin WJ, Ultrich A, Meguire WL. Human breast cancer : correlation of relapse and survibmval with amplifiacion of the HER -2/ neuoncogene. science. 1987;235(4785);177-82.

- Slamon Dj, Aleyland jones B, Shak S, Fuch H, Paton V, Bajamonde A, *et al.* Use of chemotherapy plus o monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that over expresses HER2.The New Englond Jouranl of medicine. 2001;344(11):783-92

- Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ultrich A, McGuire WL. Human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER -2/neu oncogene. *science*. 1987;235(4785):177-82.

- Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC cancer staging Manual. *CA: a cancer Journal for clinicians*. 2006;56(1):37-47;quiz 50-1.

T

- Tavassoli FA, *et al* EDS: world Health organization classification of Tumours. pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital organs ; Lyon: IARC press; 2004.

Y

- Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: prognostic and therapeutic implications- *world J clin Oncol*. 2014;15(3):412-24.

Z

- Zaki H. M, Garba-Bouda O, Garba S. M, Nouhou H. (2013). profil épidémiologique et anatomopathologique du cancer du sein au Niger. *J. AFR. Cancer*, DOI 10.1007/S12558013-0274

