



ROYAUME DU MAROC
Université Mohammed V - Rabat
Faculté de Médecine et de Pharmacie
RABAT



Année 2021

N° : MM0402021

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »

OPTION : « BIOMEDICALE »

Intitulé

Etude du profil moléculaire des patients marocains atteints de cancer bronchique non à petites cellules : mutation EGFR, réarrangement ALK et l'expression de PD-L1

Soutenu par :

MOUFTAH REDOUAN

Devant le jury composé de :

Pr. OUADGHIRI Mouna, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, Présidente
Pr. EL KHANNOUSSI Basma, Institut national d'oncologie, Rabat, Encadrante
Pr. ATOUF Ouafa, Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat, Examinatrice

REMERCIEMENTS

JE TIENS TOUT D'ABORD À REMERCIER MES CHERS PARENTS POUR TOUS LES SACRIFICES QU'ILS ONT FAITS ET LA SOUFFRANCE QU'ILS ONT ENDURÉE AFIN DE NOUS PERMETTRE DE RÉALISER NOS ÉTUDES.

A MON ENCADRANTE **Pr. BASMA EL KHANNOUSSI** CHEF DE SERVICE AU LABORATOIRE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE INO RABAT, POUR M'AVOIR ACCUEILLI AU SEIN DE VOTRE LABORATOIRE, DE VOTRE ENCADREMENT, VOTRE SOUTIEN ET VOTRE ENCOURAGEMENT. PERMETTEZ-MOI DE VOUS PRÉSENTER DANS CE TRAVAIL LE TÉMOIGNAGE DE MA RECONNAISSANCE ET RESPECT.

A **MME MOUNJID CHAIMAA**, DOCTORANTE À LA FACULTÉ DES SCIENCES. RABAT, POUR M'AVOIR AIDÉ PENDANT TOUT LE TRAVAIL, POUR VOS CONSEILS PERTINENTS ET VOTRE PROFONDE GENTILLESSE, C'ÉTAIT UN RÉEL PLAISIR DE TRAVAILLER AVEC VOUS.

A **Mr. NACER CHTATI s, Mr. YASSARA SOUFIANE, Mlle RAHOU SOUAD** SE SONT TOUJOURS MONTRÉS À L'ÉCOUTE ET TRÈS DISPONIBLE TOUT AU LONG DE LA RÉALISATION DE CE TRAVAIL

A TOUT LE PERSONNEL DU LABORATOIRE D'ANATOMIE PATHOLOGIQUE INO RABAT

JE REMERCIE INFINIMENT LES MEMBRES DE JURY. VEUILLEZ ACCEPTER MA PROFONDE RECONNAISSANCE ET ADMIRATION ET MES REMERCIEMENTS LES PLUS SINCÈRES D'AVOIR ACCEPTÉ DE JUGER CE TRAVAIL.

UN GRAND MERCI COLLECTIF À TOUS LES ENSEIGNANTS DU MASTER BIOTECH, JE LEUR ADRESSE MES SINCÈRES REMERCIEMENTS POUR TOUT CE QU'ILS ONT NOUS OFFERT COMME ENSEIGNEMENTS, ET LEURS CONSEILS DURANT CETTE FORMATION.

Résumé

Le cancer broncho-pulmonaire est au premier rang de décès liés au cancer et le deuxième le plus répandu au monde. Le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBPNPC) est une classe hétérogène de tumeurs, représente environ 85 % de nouveaux cas diagnostiqués au cancer du poumon. Le but de notre travail était d'étudier le profil moléculaire des patients marocains atteints un CBPNPC afin de prescrire le traitement le mieux adapté pour ces patients.

Nous avons réalisé une étude prospective sur des patients marocains étalée sur 6 mois allant de 15 Mars au 15 Septembre 2021 au laboratoire d'anatomo-pathologie à l'Institut National d'Oncologie de Rabat. Les biopsies ont été analysé histologiquement puis nous avons déterminé le profil moléculaire en analysant le statut mutationnel du gène EGFR par la plateforme Idylla™, et les niveaux d'expression des protéines ALK et PD-L1 par immunohistochimie.

Au total, 27 patients ont été inclus dans cette étude. Le type histologique le plus répandu dans notre série était l'adénocarcinome (96,2%) suivi de carcinome sarcomatoïde (3,8%).

Pour les analyses de mutations au niveau du gène EGFR, 3/27 cas ont été positive pour les mutations **L858R**, **G719A/C/S**, **L861Q** et **suppression d'exon 19** et avaient un profil moléculaire (ALK-, PD-L1-).

L'analyse d'expression de la protéine ALK par immunohistochimie a rapportée 2 cas qui avaient un réarrangement de l'ALK avec une expression modérée de PD-L1, Alors que 6 cas (22,2%) des patients avaient un score TPS<50% et 9 cas (33,3%) ont présenté un TPS>50% au PD-L1.

L'analyse du statut mutationnel des gènes EGFR et ALK ainsi les niveaux de l'expression de PD-L1 sont des tests nécessaires pour le diagnostic et la prise en charge des CBPNPC, pendant cette étude le nombre des cas recrutés est minime, une étude plus large est recommandée.

Les mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, patients marocains, EGFR, ALK, PD-L1, Idylla™, immunohistochimie.

Abstract

The Bronchopulmonary cancer is the number one cancer-related death and the second most common in the world. Bronchopulmonary cancer, non-small cell (NSCLC) is a heterogeneous class of tumors, represents about 85% of new cases diagnosed with lung cancer. The aim of our work was to study the molecular profile of Moroccan patients with NSCLC in order to prescribe the most suitable treatment for these patients.

We carried out a prospective study on 27 patients spread over 6 months from March 15 to September 15, 2021 at the Anatomical Pathology Laboratory at the National Oncology Institute in Rabat. The biopsies were analysed histologically and then had to determine the molecular profile by analysing the mutational status of the EGFR gene by the Idylla™ platform, and the levels of expression of the ALK and PD-L1 proteins by immunohistochemistry.

The most common histologic type in our series was adenocarcinoma with 96,2% versus 3,8% for sarcomatoid carcinoma.

Out of 27 patients, 3 cases were reported by Idylla™ to have mutations in the EGFR gene whose types were **L858R, G719A / C / S, L861Q and deletion of exon 19** and a molecular profile (ALK-, PD-L1-).

Analysis of anti-ALK antibody expression by immunohistochemistry reported 2 cases that had an ALK rearrangement with moderate PD-L1 expression, while 6 cases (22.2%) of patients had a TPS score <50% and 9 cases (33.3%) presented a TPS> 50% at PD-L1.

Analysis of the mutational status of the EGFR and ALK genes as well as PD-L1 expression levels are necessary tests for the diagnosis and management of CBPNPC, during this study the number of cases recruited is minimal, a larger study is recommended.

Keywords: The bronchopulmonary cancer, Moroccan's patients, EGFR, PD-L1, ALK, Idylla™, Immunohistochemistry.

ملخص

سرطان الرئة هو المسبب الأول للوفاة المرتبطة بالسرطانات، والثاني الأكثر شيوعا في العالم. سرطان الرئة ذو الخلايا الغير صغيرة هو فئة من الأورام الغير متجانسة، يمثل حوالي 85% من الحالات الجديدة التي يتم تشخيصها ب سرطان الرئة. كان الغرض من عملنا هو دراسة الملف الجزيئي للمرضى المغاربة الذين يعانون من سرطان الرئة ذو الخلايا الغير صغيرة.

أجرينا دراسة على مدار ستة أشهر من 15 مارس إلى 15 شتنبر في المعهد الوطني للأنكولوجيا بالرباط. لقد تم تحليل الخزعات تشريحيًا ثم حدد الملف الجزيئي للمرضى من خلال تحليل LE STATUT MUTATIONNEL للجين EGFR عبر منصة IDYLLA ومستويات التعبير للبروتينات ALK و PD-L1 عبر تقنية .IMMUNOHISTOCHIMIE

في المجموع تم ضم 27 مريض في هاته الدراسة، وكان النوع النسيجي الأكثر شيوعا في سلسلتنا هو ADENOCARCINOMES (96,2%) يليه LES CARCINOMES SARCOMATOÏDES (3,8%). بالنسبة لتحليل الطفرات التي تصيب جين EGFR، 3 حالات كانت إيجابية حاملة لطفرات من نوع L858R، EGFR مع ملف جزيئي (-ALK، -PD-L1).

تم رصد حالتين كان عندهم REARRANGEMENT ALK مع تعبير معتدل للبروتين PD-L1 في حين ان 6 حالات (22,2%) من المرضى كان لديهم TPS < 50 و 9 حالات (33,3%) كان لديهم TPS > 50.

يعتبر تحليل LE STATUT MUTATIONNEL للجين EGFR و ALK كذا مستويات تعبير PD-L1 من الاختبارات الضرورية لتشخيص وعلاج سرطان الرئة ذو الخلايا الغير صغيرة، خلال هاته الدراسة كان عدد الحالات صغيرا لذلك يوصى بزيادة العدد.

الكلمات المفتاحية: سرطان الرئة، مرضى مغاربة، EGFR، ALK، PD-L1، IDYLLA،
IMMUNOHISTOCHIMIE

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ALK : Anaplastic Lymphoma Kinase

AMM : Autorisation de Mise sur le Marché

ATP : Adénosine triphosphate

°C : Degré Celsius

CBPNPC : Cancers Broncho-pulmonaires Non à Petites Cellules

CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire

CBPPC : Cancers Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules

Ct : cycle seuil optique

Cq : cycle de quantification

dNTP : désoxyribonucléotides

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

EML4 : Echinoderm Microtubule associated protein Like 4

FISH : Hybridation in Situ en Fluorescence

FRET : Fluorescence Resonance Energy Transfer

Gb : Gigabase

HE : Hématoxyline-Eosine

IHC : Immunohistochimie

ITK : Inhibiteur de Tyrosine Kinase

kDa : kilodalton

MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase

RAF : rapidly accelerated fibrosarcoma kinase

PI3K : Phosphoinositide 3-kinases PI3K

Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2

mTOR : The mammalian target of rapamycin

AKT : protein kinase B

SOS : Son of Sevenless

Mb : Mégabase

NGS : Séquençage Nouvelle Génération

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne

PD1 : Programmed Death-1

PDL-1 : Programmed Death-ligand 1

QPCR : Réaction de polymérisation en chaîne en temps réel

RCP : Réunion de Concertation Pluridisciplinaire

RTK : Récepteur à activité Tyrosine Kinase

Th : Température d'hybridation

Tm : Température de fusion

TPS : Score de Proportion Tumorale

Liste des figures

Figure 1: Localisation anatomique des poumons humains	2
Figure 2: Anatomie de l'arbre bronchique	3
Figure 3: Représentation schématique des cellules alvéolaires	5
Figure 4: Taux de mortalité due aux cancers en 2020 dans le monde	6
Figure 5: Classification histologique du cancer broncho-pulmonaire	10
Figure 6: Classification moléculaire des cancers bronchiques non à petites cellules	12
Figure 7: Les différentes voies de signalisation du récepteur à l'EGF (EGFR)	13
Figure 8: Les différentes mutations recensées au niveau du gène du récepteur de l'EGFR détectées dans le cancer bronchique.....	16
Figure 9: Illustration du mécanisme du réarrangement intrachromosomique établi entre le gène ALK et le gène EML4, rencontré dans les cancers bronchopulmonaire non à petites cellules.....	17
Figure 10: Liste des différents variantes recensés suite aux réarrangements du gène ALK avec et les gènes EML4, KLC1et TGF	18
Figure 11: Centromères de chromosomes humains en métaphase marqués par FISH.	19
Figure 12: Les étapes clés de la technique FISH.	21
Figure 13: Thermocycleur de pcr en temps réel.....	23
Figure 14: Représentation schématique du principe de la méthode Taqman®.....	24
Figure 15: Cinétique d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	25
Figure 16: Modèle de représentation du mécanisme d'action des ITK	29
Figure 17: Mécanismes de l'axe PD1/PDL1 dans la résistance immunitaire	31
Figure 18 : Mécanismes d'action des anticorps anti PDL/PDL1	32
Figure 19: Photo illustrant l'hôte de la salle de macroscopie au laboratoire d'anatomie-pathologique	34
Figure 20: L'appareil de circulation.....	35
Figure 21: Station d'enrobage	36
Figure 22: Matériels utilisés pour la réalisation des coupes	37

Figure 23: L'appareil de coloration HE	38
Figure 24: L'appareil d'immunohistochimie (Autostainer Link48 Dako®).....	39
Figure 25: La plateforme Idylla™	41
Figure 26: Les étapes d'un test Idylla™	42
Figure 27: Les différentes mutations détectées par la plateforme Idylla™ du gène EGFR .	43
Figure 28: Exemple d'un marquage de la protéine ALK par l'IHC	45
Figure 29: Exemple d'un calcul du score TPS	46
Figure 30: Interprétation de l'expression de PD-L1 par l'IHC	47
Figure 31: Répartition des patients atteints de CBNPC selon le sexe.....	48
Figure 32: Répartition des patients atteints de CBNPC selon l'âge.....	49
Figure 33: Statut du tabagisme des 27 patients	49
Figure 34: Graphe qui représente la répartition des cas selon le degré de différenciation des adénocarcinomes	50
Figure 35: Exemple d'un résultats affiché par le système Idylla	51

Liste des tableaux

Tableau I: Les principales avantages et limites de la FISH.....	22
Tableau II: Tableau regroupant les molécules disponibles en immunothérapie dans le CBNPC.....	32
Tableau III: Protocole de révélation de l'expression de la protéine ALK par l'IHC	44
Tableau IV: Protocole de révélation de l'expression de la protéine PD-L1 par l'IHC.....	46
Tableau V: Répartition de l'expression de la protéine ALK dans notre série	51
Tableau VI: Répartition des cas selon le score TPS	52
Tableau VII: Corrélation entre l'expression de PD-L1 et les cas avec un statut ALK réarrangé.....	52

Sommaire

Introduction	1
Revue bibliographique	2
Chapitre I : Une présentation succincte du cancer du poumon	2
1. L'anatomie et histologie du poumon normal	2
1.1. L'anatomie du poumon.....	2
1.2. L'Histologie du tissu pulmonaire	4
2. Les données épidémiologiques	5
3. Les facteurs de risques	6
3.1. La consommation du tabac	7
3.2. La consommation du cannabis	7
3.3. Les expositions professionnelles	7
3.4. Les facteurs environnementaux	8
3.5. Les antécédents familiaux	8
3.6. Les pathologies respiratoires	8
4. La classification histologique du cancer du poumon selon l'OMS 2018.....	8
4.1. Le carcinome à petites cellules.....	9
4.2. Les cancers broncho-pulmonaire non à petites cellules	9
4.2.1. Les adénocarcinomes	9
4.2.2. Les carcinomes épidermoïdes	10
4.2.3. Les carcinomes à grandes cellules	10
5. La classification moléculaire du cancer pulmonaire non-à petite cellules.....	11
5.1. Le gène du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor)	12
5.2. Le gène Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK).....	16
Chapitre II : Les différentes techniques de dépistage des anomalies génétiques	19
1. L'hybridation in situ en fluorescence (FISH).....	19
1.1. Les principales étapes de la technique.....	20
1.2. Les principales applications de l'hybridation in situ.....	21
1.3. Les principales avantages et limites de la FISH	22
2.L'immunohistochimie.....	22

3. La QPCR ou PCR en temps réel.....	23
3.1 Les étapes de la QPCR.....	23
3.2 Cinétique d'amplification.....	24
Chapitre III : Modalités thérapeutiques	25
1. La chirurgie.....	26
2. La radiothérapie.....	26
3. La chimiothérapie.....	27
4. Les thérapies ciblées.....	28
4.1. Les thérapies ciblées en cas de réarrangement d'ALK.....	28
4.1.1. Mécanisme d'action.....	28
4.1.2. Molécules en cas de réarrangement d'ALK.....	29
4.2. Les Thérapies ciblées en cas de mutation d'EGFR.....	29
5. L'immunothérapie.....	30
5.1. Immunothérapie anti-PD1/ PD-L1.....	30
Partie pratique	33
1. Présentation du cadre de travail.....	33
2. Matériels et méthodes.....	40
Résultats	48
Discussion	53
Conclusion	56
Références bibliographiques	57
Annexe	62

Introduction

Les cancers broncho-pulmonaires sont définis comme l'ensemble des proliférations tumorales malignes primitives ou secondaires développées au dépend du poumon.

En 2020, selon **Sung H et al** l'incidence mondiale du CBP était estimée à 2.093.876 cas (11,6 % de tous les cancers) pour un nombre de décès estimé à 1.796.144 cas (18 % des cas de décès par cancer).

Au Maroc, le cancer broncho-pulmonaire est au premier grade des cancers chez l'homme et constitue un véritable problème de santé publique. Le tabagisme est le principal facteur de risque, responsable d'environ 85% des cas. (**Doll R et al., 2010**)

Sur le plan histologique, on distingue de façon très simplifiée 2 types : les Cancers Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules et les Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules. Ces derniers sont les plus fréquents, présentent environ 85% de tous les cancers broncho-pulmonaires. (**Antoine, M et al, 2018**)

Le diagnostic des cancers bronchiques non à petites cellules se fait le plus souvent à un stade tardif, localement avancé ou métastatique, cela explique que le matériel d'étude reçu au laboratoire d'Anatomie et cytologie pathologique est souvent sous forme de biopsies.

Le diagnostic anatomopathologique du CBNPC repose sur l'étude morphologique, complétée par une étude immunohistochimique pour étayer le diagnostic et fournir les éléments à but pronostique et théranostique par la mise en évidence de l'expression des anticorps anti-PD-L1, anti-ALK ainsi que par une étude moléculaire basée sur la recherche de mutations du gène EGFR (**Cree Ia et al, 2016**)

Le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier différentes altérations moléculaires, qui sont des cibles thérapeutiques potentielles, mais aussi potentiellement des outils pour mieux diagnostiquer les cancers bronchiques non à petites cellules ouvrant ainsi la porte à un traitement à la carte des patients.

L'objectif de notre travail est d'étudier le profil moléculaire des patients marocains atteints un cancer bronchique non à petites cellules, précisément le statut mutationnel des gènes EGFR, ALK et l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales afin d'administrer un traitement bien adapté aux patients.

Revue bibliographique

Chapitre I : Une présentation succincte du cancer du poumon

Le cancer broncho-pulmonaire est une tumeur maligne qui se développe à partir d'une cellule initialement **normale**, **subit des modifications** sous l'effet de différents facteurs qui induisent entre autres sa multiplication de façon anarchique.

Le site de développement des cancers broncho-pulmonaires est très diversifié, en effet il peut être localisé dans les alvéoles pulmonaires, dans une des bronches, à la jonction entre les bronches principales ou à la périphérie.

1 L'anatomie et histologie du poumon normal :

1.1 L'anatomie du poumon :

Les poumons sont des organes pairs et symétriques : le poumon droit et le poumon gauche. Le poumon droit comporte trois lobes et le poumon gauche que deux lobes. Les deux poumons sont séparés par la région du médiastin qui contient le cœur, la trachée, l'œsophage, de grosses artères, des veines et des ganglions lymphatiques. **Voir la figure 1.**

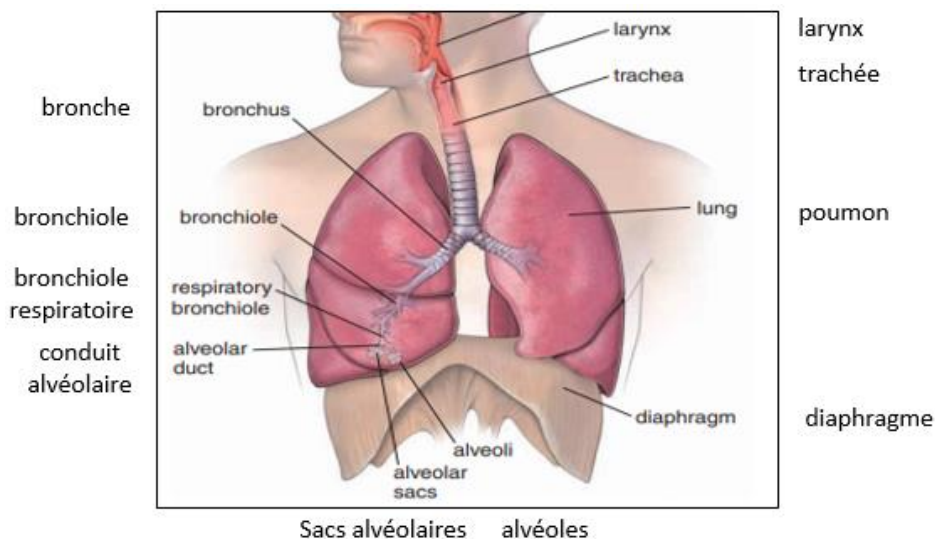


Figure 1: Localisation anatomique des poumons humains ([human respiratory system | Description, Parts, Function, & Facts | Britannica](#))

Dans chaque lobe pulmonaire, la trachée donne naissance à deux bronches qui se divisent à l'intérieur du parenchyme pulmonaire. Les divisions successives des bronches en calibre de plus en plus petit conduisent à la formation de l'arbre bronchique intra-parenchymateux. Les dernières ramifications sont appelées les bronchioles terminales. Ces dernières s'ouvrent sur les alvéoles richement vascularisées, les alvéoles sont le siège des échanges gazeux comme l'illustre la figure 2. (Lacour B and Belo JB, 2015).

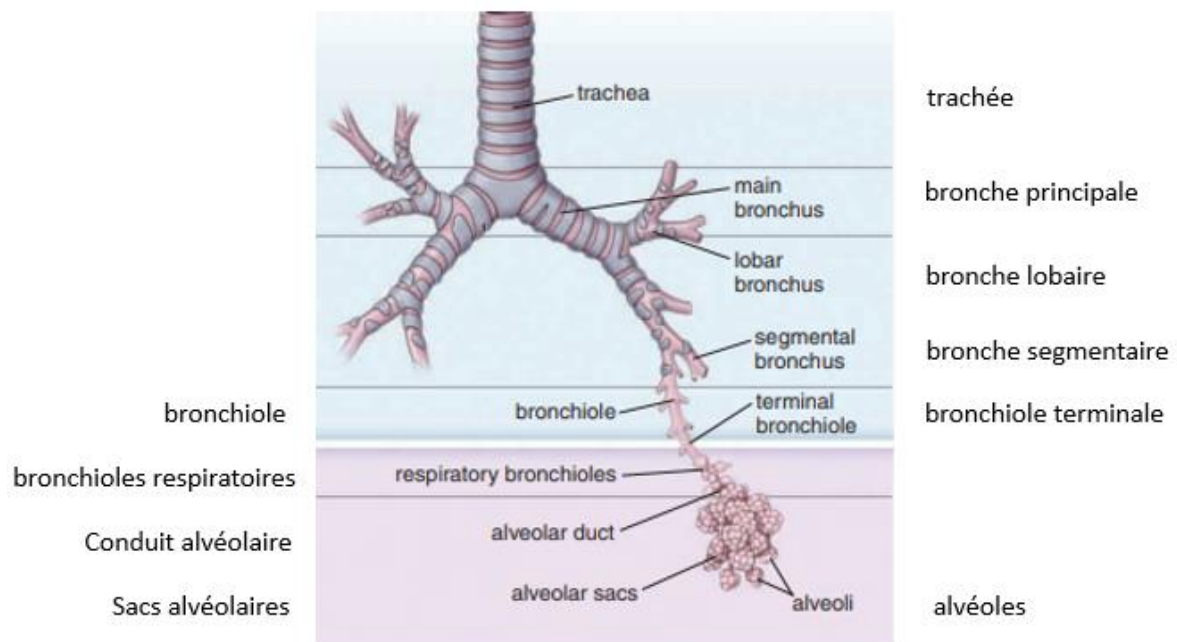


Figure 2: Anatomie de l'arbre bronchique [human respiratory system | Description, Parts, Function, & Facts | Britannica](#)

Chaque poumon est enveloppé par la plèvre, qui correspond à deux feuillets d'une membrane séreuse séparée par la cavité pleurale. Le feuillet interne ou viscéral se colle directement aux poumons. Par contre, le feuillet externe ou pariétal, il se lie à la cage thoracique et au diaphragme. Entre les deux feuillets, il existe la cavité pleurale qui contient un liquide qui permet le glissement des feuillets et les mouvements pulmonaires lors de la ventilation.

1.2 L'Histologie du tissu pulmonaire :

Le poumon apparait spongieux, habituellement de couleur rose mais cette couleur est affectée suite à l'exposition aux agents polluants.

Le revêtement respiratoire pseudostratifié cilié renferme trois principaux types cellulaires à savoir des cellules épithéliales ciliées, des cellules muco-sécrétantes et des cellules basales. Néanmoins la muqueuse bronchique est composée aussi de rares cellules neuroendocrines où on retrouve de granules de type neuro-sécrétoire.

Au niveau du bronchiole terminale on retrouve de rares cellules non ciliées appelées cellules de Clara, au sein d'un revêtement cylindrique. Ces dernières constituent le type cellulaire capitale de l'épithélium des bronchioles respiratoires.

L'épithélium alvéolaire est formé d'une couche continue de cellules, refermant de deux principaux types :

Les pneumocytes de type I

Sont majoritaires et tapissent **95%** de la surface alvéolaire, ils sont nommés pneumocytes membraneux ou cellules de Clara. Ils sont très aplatis et non ciliés.

Les cellules de Clara interviennent dans les échanges gazeux entre l'air intra-alvéolaire et les compartiments sanguins du poumon.

Les pneumocytes de type II

Ne couvrent que **5 %** environ de la surface épithéliale, sont de forme cubique à arrondie, plus volumineux et ne présentant pas d'extension cytoplasmique. Ces cellules sont synthétisées le surfactant pulmonaire qui fluidifie le mucus et facilite les échanges gazeux **(Witherden IR et al, 2001). (Figure 3)**

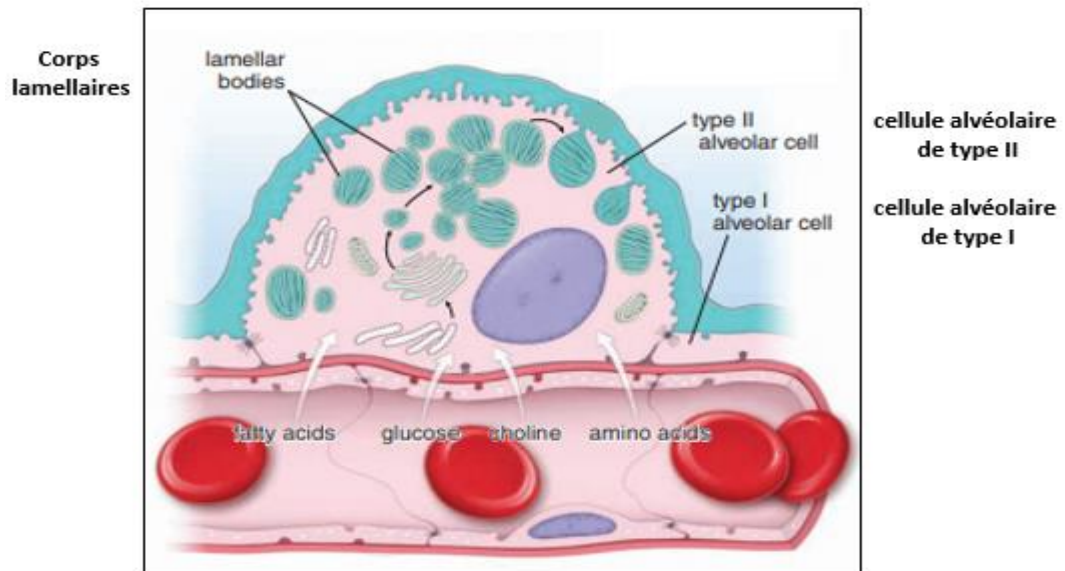


Figure 3: Représentation schématisique des cellules alvéolaires [human respiratory system / Description, Parts, Function, & Facts | Britannica](#)

Le poumon avec ces différentes cellules constitue un organe vital car il assure les échanges gazeux en libérant le corps humain du gaz carbonique (CO₂) produit par le métabolisme et l'apport de l'oxygène nécessaire au bon fonctionnement de tous les organes.

En plus par la présence de son tissu lymphoïde associé aux muqueuses, le poumon contribue dans la protection immunitaire.

2 Les données épidémiologiques :

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé en 2020, parmi les cancers diagnostiqués, le cancer du poumon chez l'homme et la femme représente respectivement **14,5 % et 8,4 %**.

Il constitue une cause principale de décès mondial, représentant approximativement **18%** de l'ensemble des décès par cancer et correspond environ 1,8 million de décès couverts par GLOBOCAN 2020. **(Figure 4)**

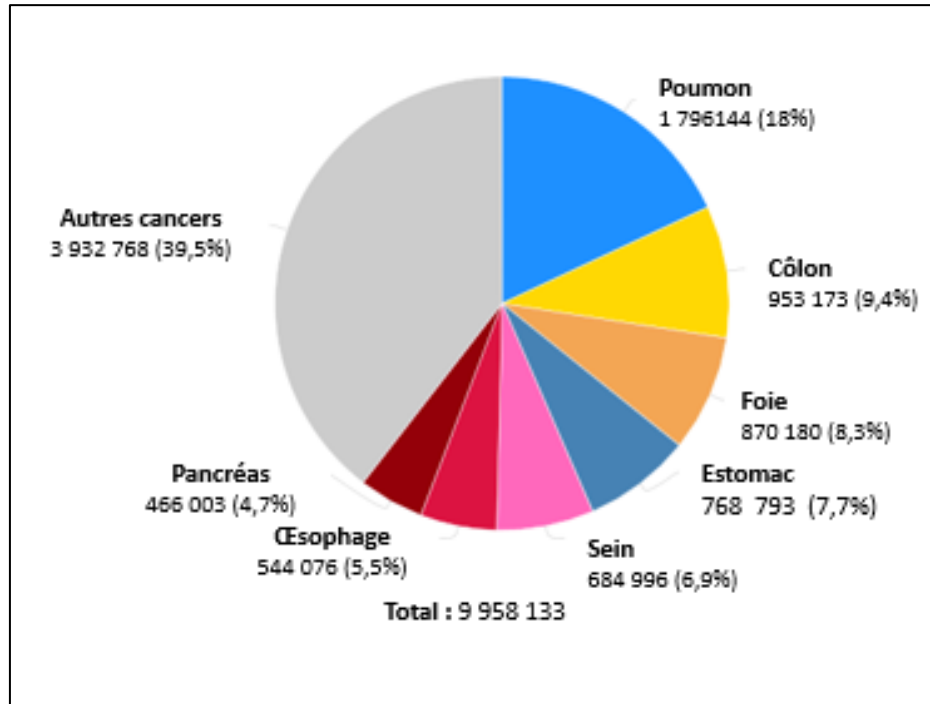


Figure 4: Taux de mortalité due aux cancers en 2020 dans le monde. (Sung H et al, 2020)

Au Maroc, pour la période 2008–2012, édité en 2016 du Registre des Cancers de la Région du Grand Casablanca, la proportion du cancer pulmonaire parmi les cas enregistrés était de 11,4% des cas ce si pour les deux sexes confondus.

Selon ce registre, les hommes sont les plus touchés et représentaient **89,6%** contre **10,4%** de femmes. Chez le sexe masculin, le taux spécifique de l'incidence du cancer pulmonaire, augmentait avec l'âge pour atteindre son pic (188,4 pour 100 000) pour la classe d'âge comprise entre 60 et 64 ans. (**Registre Des Cancers du Grand Casablanca, 2016**)

Par ailleurs, dans la majorité des régions du Maroc, le cancer du poumon est le type de cancer le plus fréquent chez les hommes. (**Elidrissi Errahhali, et al 2016**)

3 Les facteurs de risques :

Selon la littérature **Barta, J. A et al, 2019**, les facteurs de risques sont nombreux et de ce fait cette pathologie est multifactorielle. Certains facteurs de risque interagissent entre

eux et augmentent ainsi la probabilité d'apparition de cancer de poumon. En effet, chez un même individu il peut y avoir l'association de plusieurs facteurs de risque.

3.1 La consommation du tabac :

Dans le monde entier, le tabac est impliqué à 85% dans l'induction des cancers bronchiques. A noter que le tabac renferme des composés cancérogènes comme le goudron, les phénols et autres composés cytotoxiques. Par ailleurs, le risque relatif chez un fumeur de développer un cancer bronchique est de 20% supérieur à celui d'un sujet non-fumeur. (**Doll R et al., 2010**)

Selon la littérature **Doll R et al., 2010**, le tabac renferme également des composants mutagènes comme le Formaldéhyde qui induisent des changements génétiques dans les cellules pulmonaires conduisant ainsi au développement du cancer.

Chez les fumeurs, ce risque, augmente d'une part avec la durée de consommation du tabac et d'autre part avec le nombre de cigarettes fumées par jour (**Schabath, M. B et Cote, M. L 2019**)

3.2 La consommation du cannabis :

La cigarette de cannabis dépose 5 fois plus de goudron, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (PAHs) et les phénols dans le tractus respiratoire qu'une cigarette avec filtre de taille équivalente.

3.3 Les expositions professionnelles :

Certaines professions sont exposées à des risques d'usages de certains produits potentiellement carcinogènes qui augmentent le risque de cancer bronchique comme la silice, l'uranium, le nickel, le chrome, les radiations ionisantes, des solvants organiques comme le méthanol, toluènes et l'amiante.

A titre indicatif, l'exposition professionnelle la plus étudiée et celle à l'amiante. En effet le lien de cause à effet a été bien établi entre l'augmentation de décès par cancer de poumon et l'exposition continue à l'amiante que ça soit dans le secteur industriel de transformations de l'amiante (amiante textile, amiante ciment,) ou dans des secteurs

d'utilisation secondaire de ce produit dans les chantiers navals, la production d'électricité, la maintenance industrielle, l'isolation et la métallurgie. (Dela Cruz et al., 2009)

3.4 Les facteurs environnementaux :

Suite à libération prolongée des polluants émis d'une part par les moteurs diesel des véhicules sous forme de vapeurs de gasoil chargés de fines particules et d'autre part les échappements de fumées des unités industrielles, l'atmosphère se trouve en permanente polluée. Selon Schabath, M. B et Cote, M. L 2019, les personnes qui respirent un air pollué se trouvent plus exposés à développent fréquemment des cancers du poumon.

3.5 Les antécédents familiaux

Des études épidémiologiques ont montré que l'historique familial contribue de manière prédictive dans l'augmentation du risque de survenue du cancer bronchique. (Lissowska J et al 2010)

3.6 Les pathologies respiratoires

Plusieurs maladies pulmonaires malignes préexistantes ont été associées avec un risque accru de cancer du poumon. Ces maladies incluent les bronchopneumopathies chroniques obstructives, la fibrose pulmonaire idiopathique, la pneumoconiose et la tuberculose. Les bronchopneumopathies chroniques obstructives présentent le plus fort risque de cancer bronchique associé. (Schabath, M. B et Cote, M. L 2019)

4 La classification histologique du cancer du poumon selon l'OMS 2018

Lors des anciennes classifications histologiques, les cancers primitifs du poumon ou les cancers broncho-pulmonaires étaient divisés en deux catégories :

Un cancer à petites cellules désigné par les Cancers Broncho-Pulmonaires à Petites Cellules (CBPPC).

Un cancer non à petites cellules désigné par les Cancers Broncho-Pulmonaires Non Petites Cellules (CBPNPC)

4.1 Le carcinome à petites cellules :

Il se caractérise par des cellules de petite taille avec un rapport cytoplasme / noyau faible. C'est une tumeur dite neuroendocrine, car elle se développe à partir des cellules neuroendocrines qui tapissent l'épithélium des poumons. Elle s'installe au premier lieu dans les bronches retrouvées près du centre du thorax. Le CBPC constitue **15%** de l'ensemble des cancers bronchiques. (**Antoine M et al, 2018**)

Ce type de cancer est lié à 95% à la consommation du **tabac**. C'est le plus agressif et il métastase rapidement vers les os et la moelle osseuse, le foie, les glandes surrénales et le cerveau. Il est très sensible à la chimiothérapie et à la radiothérapie mais malheureusement il est souvent diagnostiqué à un stade tardif. (**Rudin CM et al, 2021**)

4.2 Les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules :

Selon la littérature **Antoine, M et al, 2018**, les CBPNPC représentent environ **85 %** de l'ensemble des cancers bronchiques.

Selon l'OMS et depuis 2018, la famille des CBNPC regroupe plusieurs sous types de tumeurs selon le type de cellules concernées. La nouvelle classification a intégré des données cliniques, radiologiques et surtout génétiques. En effet l'intégration des données à l'échelle moléculaire a permis un diagnostic précis et une médecine personnalisée.

Les CBPNPC ont été classé histologiquement en plusieurs catégories dont les principaux sont les suivants : **les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes et les carcinomes à grandes cellules**. D'autres sous-types histologiques moins courants comprennent les carcinomes adénosquameux et les carcinomes sarcomatoïdes. (**Figure 5**)

4.2.1 Les adénocarcinomes

Les adénocarcinomes sont des tumeurs épithéliales avec différenciation glandulaire. La présence de glandes et une mucosécrétion sont les principaux marqueurs morphologiques de cette différenciation. Ils sont caractérisés par un aspect blanchâtre, brillant et se déclarent en périphérie du poumon sous forme de mires émergeant des glandes bronchiques et des cellules alvéolaires.

Ils représentent environ 50% des CBPNPC. Etant donné l'hétérogénéité histologique rencontrée, les adénocarcinomes sont divisés en plusieurs groupes en fonction des éléments prédominants. Actuellement, ils sont les plus fréquemment diagnostiqués chez les non-fumeurs ainsi que chez les femmes. (Antoine M et al, 2018)

4.2.2 Les carcinomes épidermoïdes :

Ils représentent 20-30 % des CBPNPC, c'est un cancer bien différencié qui se développe dans les parties proximales du poumon, notamment à partir d'un épithélium malpighien bronchique métaplastique. Il est caractérisé par la synthèse de kératine par les cellules tumorales et l'établissement des ponts intercellulaires. C'est un cancer fortement lié au tabac. (Antoine, M et al, 2018)

4.2.3 Les carcinomes à grandes cellules

Les carcinomes à grandes cellules représentent quant à lui environ 15% des CBPNPC, et regroupent les carcinomes à grandes cellules indifférenciés et les carcinomes neuroendocrines à grandes cellules. La croissance (c'est à dire le temps de doublement des cellules tumorales) des carcinomes à grandes cellules est plus rapide que pour les autres formes de CBPNPC. C'est un cancer agressif et de mauvais pronostic lié au tabac dans 90 % des cas.

Les types histologiques du cancer broncho-pulmonaire Les sous-types de Cancers Broncho-Pulmonaires Non à Petites Cellules

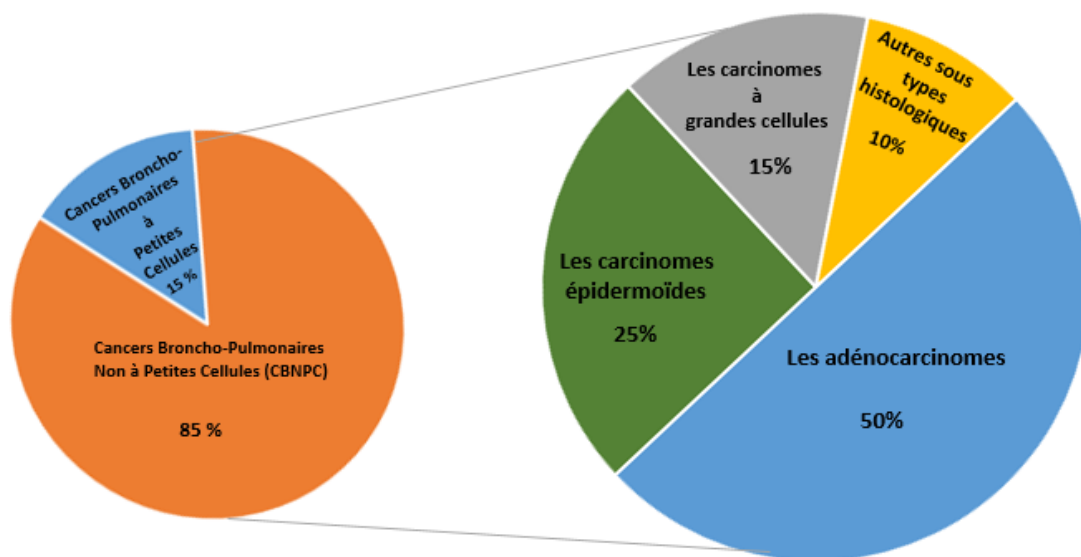


Figure 5: Classification histologique du cancer broncho-pulmonaire (Schabath, M. B et Cote, M. L 2019)

5 La classification moléculaire du cancer pulmonaire non-à petite cellules

Les CBNPC représentent 85 % des cancers du poumon et la majorité est diagnostiquée à un stade localement avancé ou métastatique. Pendant ces dernières années, la découverte de mutations dans des gènes dites oncogènes dans les cancers broncho-pulmonaires a permis l'établissement d'une classification moléculaire pour ces types de cancers. **(Gridelli C et al, 2015)**

Cette classification moléculaire a permis le dénombrement moléculaire des CBNPC avec l'identification de différentes mutations somatiques oncogéniques, les gènes responsables de l'initiation et de la progression tumorale.

Les mutations génétiques ou les drivers correspondent à des mutations somatiques ou des translocations de gènes qui seront la cible des thérapies ciblées qui correspondent aux fondements de base de la médecine de précision ou médecine personnalisée. **(Figure 6)**

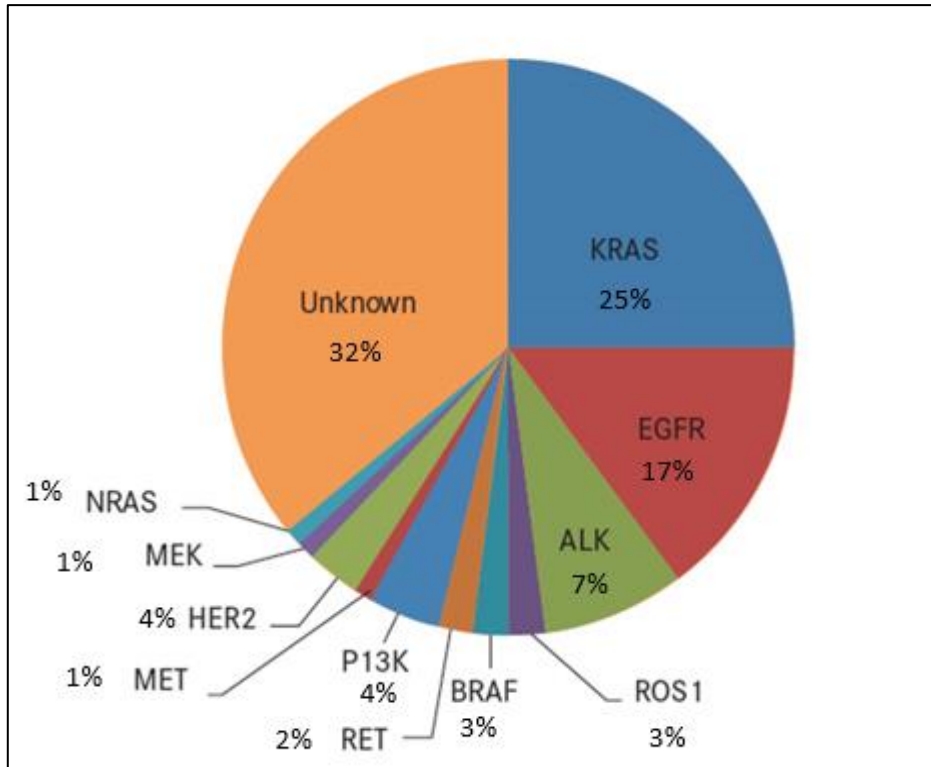


Figure 6: Classification moléculaire des cancers bronchiques non à petites cellules
(Borghaei H et al, 2017)

5.1 Le gène du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor)

Le gène du récepteur de l'EGFR est situé au niveau du bras court du **chromosome 7 (7p12-13)** et constitué de 28 exons (200kb) et 27 introns.

Ce gène code pour une protéine qui possède un poids moléculaire de **170 kilo Dalton**, comporte 53 acides aminés et trois ponts disulfures. Cette protéine transmembranaire possède trois domaines à savoir un domaine extracellulaire capable de fixer certains ligands comme l'EGF, un domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire. (**National Center for Biotechnology Information, 2021**)

Cette protéine joue le rôle de récepteur de l'EGF du type tyrosine kinase, en effet la fixation du ligand entraîne une homo ou hétéro dimérisation du récepteur entraînant la transphosphorylation des résidus tyrosines.

Selon la littérature (**Brambilla E et Gazdar A. 2009**), l'EGFR est impliqué dans plusieurs voies de signalisation de différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'invasion, l'angiogenèse, la métastase et la résistance à l'apoptose. (**Figure 7**)

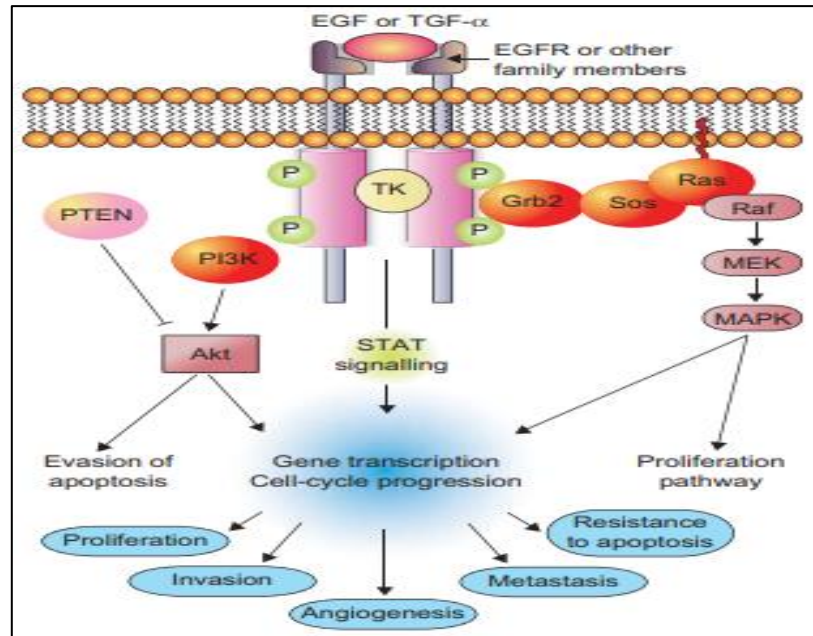


Figure 7: Les différentes voies de signalisation du récepteur à l'EGF (EGFR)
(*Brambilla et Gazdar, 2009*)

❖ **La voie de signalisation Ras/ERK**

La voie de signalisation Ras/ERK est déclenché par l'activation des récepteurs de tyrosine kinase (RTK), des récepteurs couplés aux protéines G (GCPR) et des intégrines.

La liaison du ligand fait activer les RTK par la dimérisation suivis d'une phosphorylation des résidus tyrosines cytoplasmiques pour fournir des sites d'amarrage pour la protéine Grb2 (growth factor receptor-bound protein 2) adaptatrice qui recrute des protéines transformatrices tels que Shc et SOS près de la membrane plasmique. SOS active l'activité GTPase de Ras, à son tour elle recrute et active la Raf kinase. Raf kinase active MEK par la phosphorylation sur deux résidus de sérines par la suite MEK active ERK. ERK activé se

translocalise dans le noyau pour moduler l'expression des gènes par la phosphorylation de plus de 250 substrats cellulaires impliqués dans la migration, la prolifération et la survie cellulaire.

Un dysfonctionnement de cette voie de signalisation conduit à l'apparition et à la progression des cancers, principalement par des mutations somatiques. En effet, Ras a été reconnu comme un oncogène largement activé par des mutations dans tous les cancers. (**Gonzalez-Hormazabal P et al, 2018**)

❖ La voie PI3K/AKT

La voie de signalisation PI3K/AKT est un régulateur clés des processus cellulaires tels que la croissance cellulaire, la prolifération, le métabolisme, la survie et l'apoptose.

PI3K est une kinase lipidique activée par les RTK comme EGFR et ALK. Son activation génère un deuxième messager le phosphatidylinositol (3,4,5) -triphosphates (PIP3) qui recrute des protéines tels que AKT à la membrane plasmique. AKT est une sérine/thréonine kinase qui constitue le nœud central de la voie, son activation par PIP3 permet la phosphorylation de nombreux substrats tels que mTOR. (**Porta C et al, 2014**)

mTOR est une protéine clé de la voie qui agit à la fois en amont et en aval de l'AKT dans la régulation de la synthèse des protéines nécessaire à la croissance et la prolifération cellulaire. L'activation atypique de la voie PI3K/AKT favorise la survie et la prolifération des cellules cancéreuses dans de nombreux cancers humains.

❖ La voie JAK/STAT

Les protéines STATs (Signal Transducers and Activator of Transcription) constituent une famille de facteurs de transcriptions cytoplasmiques activés fréquemment par des récepteurs de facteurs de croissances. La famille des tyrosines kinases JAKs (Janus Kinas) activent les STATs en réponse aux facteurs de croissances par la phosphorylation des résidus tyrosines conservés, ce qui entraîne la dimérisation et la translocation des STATs vers le noyau, où ces derniers vont moduler l'expression des gènes impliqués dans la prolifération et la survie cellulaire. (**García-Regalado A et al, 2014**)

Dans la bibliographie (**Carlson JJ et al. 2009**), il est rapporté que l'expression de l'EGFR est variable au niveau de l'appareil respiratoire, au niveau des cellules épithéliales bronchiques est forte alors qu'elle est modérée dans les cellules épithéliales alvéolaires.

Les mutations du gène du récepteur (EGFR) ont été retrouvées chez **30%** des cas à **adénocarcinomes** contre **2 %** des cas présentant d'autres types histologiques. Par ailleurs, d'autres études ont montré également que le taux des mutations est variable selon si le sujet est **un fumeur ou non**, les valeurs sont respectivement **7%** et **47%** pour les non-fumeurs et les **fumeurs** ainsi ces mutations sont plus fréquentes chez **les femmes** (**Sun Y et al, 2010**)

Des investigations plus approfondies ont identifié que les mutations sont majoritairement localisées au niveau des **exons 18, 19, 20 et 21**. Cette partie du gène code pour le domaine tyrosine kinase du récepteur. Ces mutations se situent au niveau du site de fixation de l'ATP, qui est aussi le site de fixation des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). (**Figure 8**)

Il faut souligner que certaines mutations sont fréquentes et d'autres rares. Parmi les plus fréquentes nous citons celles qui se trouvent dans l'exon 19 et l'exon 21. Ces mutations sont retrouvées respectivement à **45%** et **40-45%** voir figure 8. (**He M et al, 2012**)

En ce qui concerne les mutations très rares et isolées nous mentionnons des mutations au niveau des exons 18 et 20. (**Figure 8**)

Les mutations signalées de l'EGFR confèrent une grande sensibilité des cellules aux ITK. (**Rangachari et al., 2017**).

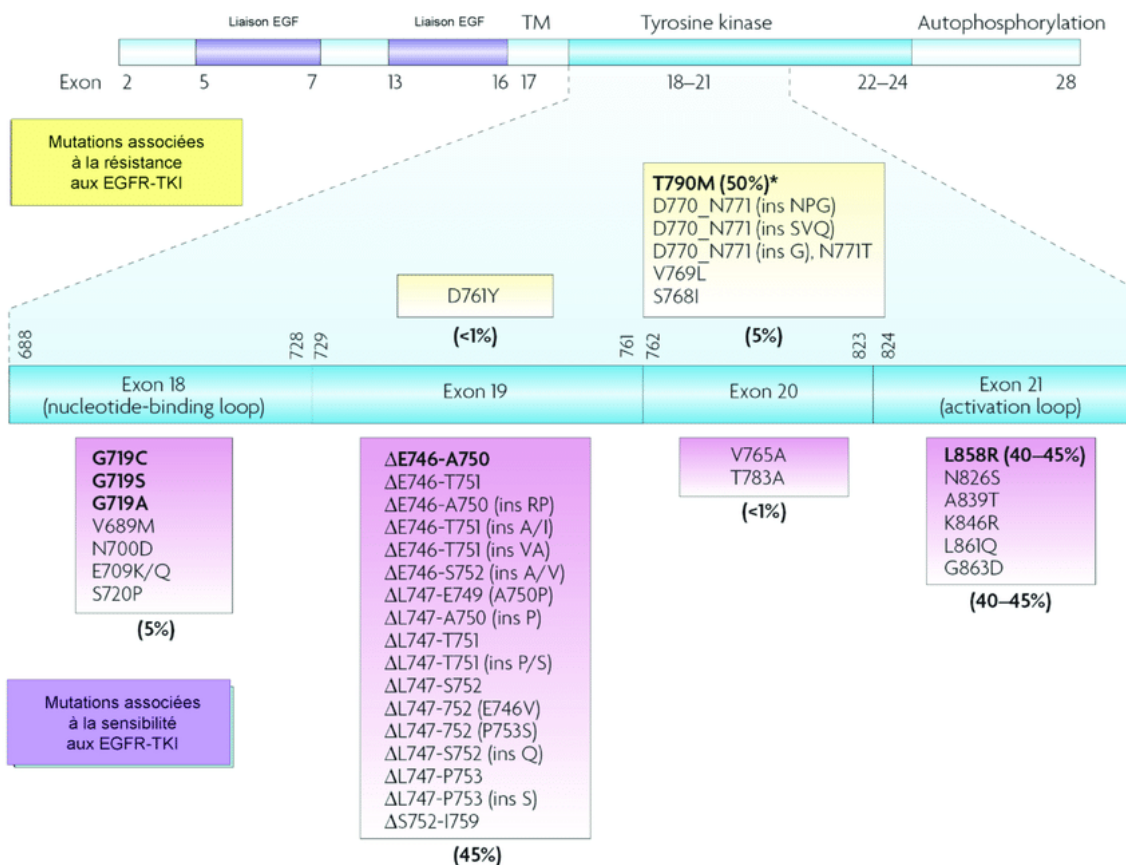


Figure 8: Les différentes mutations recensées au niveau du gène du récepteur de l'EGFR détectées dans le cancer bronchique (Tanner NT et al. 2011)

5.2 Le gène Anaplastic Lymphoma Kinase (ALK)

Le gène ALK est situé sur le bras court du chromosome **2p23**, il comprend 29 exons et 28 introns et code pour un récepteur membranaire. Ce dernier a une masse moléculaire de **180 kDa** et possède une activité tyrosine kinase à l'origine de la prolifération cellulaire (Hallberg B, and Palmer R, 2013)

Selon la littérature Frankel, D et al 2019, dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules (CBPNPC), des réarrangements intrachromosomiques se produisent plus particulièrement entre le gène ALK et d'autres gènes, mais le plus souvent le réarrangement se produit avec le gène Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4 (EML4).

Ces deux gènes à savoir ALK et EML4 sont situés sur le même chromosome et plus précisément sur le bras court du chromosome 2 mais en sens opposé de lecture.

Le réarrangement appelé variant 1 rencontré dans les cancers du poumon présentent les caractéristiques suivantes :

Pour le gène EML4, l'interruption est localisée à 3,6 kb en aval de l'exon 13.

Pour le gène ALK, au niveau de la 297ème base en amont de l'exon 21, aura lieu la fusion entre les deux gènes qui donnera un EML4-ALK (variant 1). Voir l'illustration dans la figure ci-dessous. **(Figure 9).**

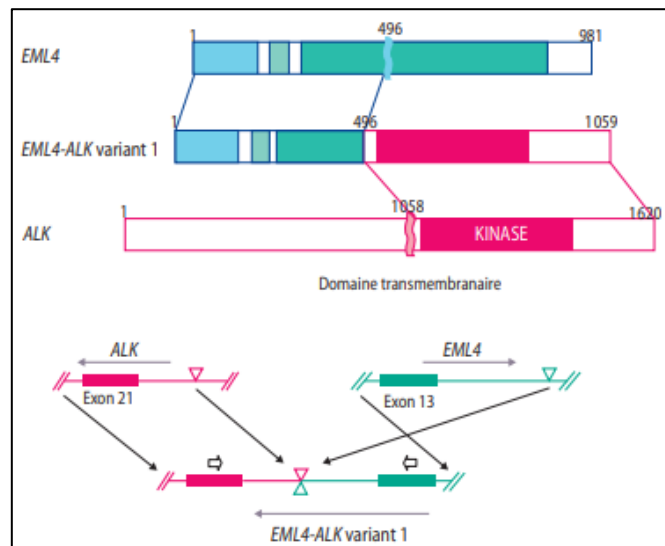


Figure 9: Illustration du mécanisme du réarrangement intrachromosomique établi entre le gène ALK et le gène EML4, rencontré dans les cancers bronchopulmonaire non à petites cellules (Soda M et al 2007)

Ce réarrangement aboutit à l'expression d'une protéine chimérique, composée au niveau N-terminal de la protéine EML4 et en C-terminal du domaine intracellulaire de la kinase ALK, qui présente une activation constitutive de la kinase ALK qui intervient dans différentes voies de signalisation conduisant à la prolifération des cellules tumorales, de changements dans leur cytosquelette, de leur migration et de leur survie **(Horn L et Pao W, 2009).**

Selon la littérature, le gène ALK possède un point de cassure dit stable, invariable ou constant mais le gène EML4 a un point de cassure variable. Cette variabilité de site de cassure donne lieu à différentes variantes. Voir la figure ci-dessous.

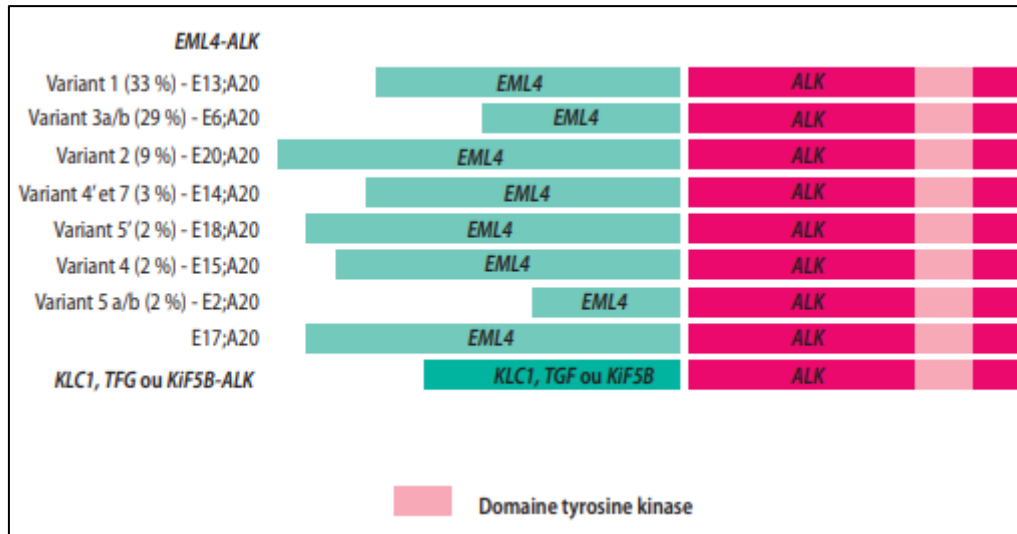


Figure 10: Liste des différents variantes recensés suite aux réarrangements du gène ALK avec et les gènes EML4, KLC1 et TGF. (Soda M et al. 2007)

A noter que les variantes les plus fréquentes dans les cas de CBPNPC sont : le variant 1 qui est symbolisé par (E13; A20) et présent à **33%**, suivi du variant 3a/b présent à **29%** et symbolisé par E6;A20...

Selon cet auteur (Soda M et al. 2007), le gène EML4 effectue également des réarrangements avec d'autres gènes comme le gène TRK-fused gene (TFG) localisé au niveau de chromosome 3q21, kinesin family member 5B (KIF5B) porté par le chromosome 10p11.22 et, plus récemment kinesin light chain 1 (KLC1) situé sur le chromosome 14q32.

Ces différents réarrangements seraient également responsables d'une l'activation similaire à celle issue des variantes EML4-ALK, avec une sensibilité potentielle aux inhibiteurs d'ALK. (Figure 10)

(Frankel, D et al 2019) a souligné que les réarrangements de ce gène ont été décrits dans **4 à 7 % des CBPNPC et de manière exclusive dans les adénocarcinomes**. Ceci a été

décelé chez **des patients jeunes et non-fumeurs avec souvent une diffusion métastatique multiple (pleurales et cérébrales) et parfois calcifiées.**

Chapitre II : Les différentes techniques de dépistage des anomalies génétiques

1. L'hybridation in situ en fluorescence (FISH)

L'hybridation in situ en fluorescence est une technique de cytogénétique moléculaire ciblée. En effet cette technique utilise comme support une lame de verre sur laquelle des préparations cellulaires sont fixés et par conséquent des gènes, ces derniers seront hybridés de façon spécifique avec l'usage des sondes marquées par des fluorochromes.

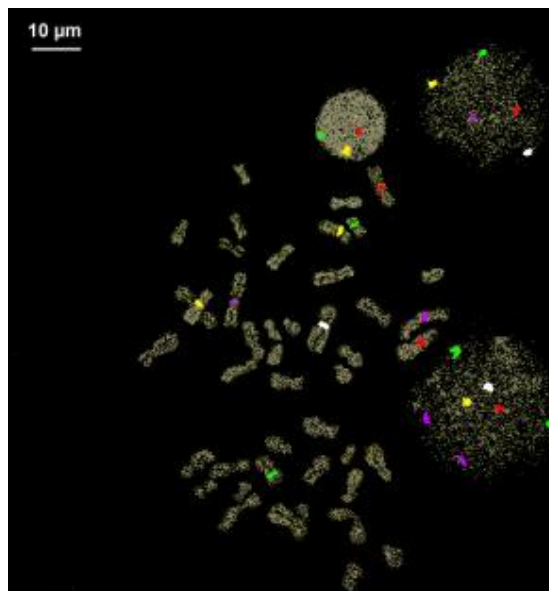


Figure 11 : Centromères de chromosomes humains en métaphase marqués par FISH.

Chaque couleur correspond à un chromosome différent. (König K et al, 2015)

Les sondes d'ADN peuvent être de trois types : sonde de séparation (break-apart), sonde de fusion (Kreatech), sonde combinant les 2 approches (TriCheck™).

Les sondes de séparation sont des sondes marquées de deux couleurs différentes qui encadrent la région de cassure des gènes d'intérêt en s'hybridant de part et d'autre. Lors de translocation chromosomique du gène d'intérêt, elles se séparent.

Les sondes de fusion sont également des sondes marquées de deux couleurs différentes s'hybridant à leur locus respectif sur deux chromosomes différents. Lors de la translocation chromosomique, elles fusionnent. Ces sondes permettent d'identifier le partenaire de fusion. **(Hamard C et al, 2018)**

Cette technique est réalisable quelle que soit l'état du matériel génétique durant le cycle cellulaire, condensé pendant la métaphase ou décondensé pendant l'interphase. De plus cette technique permet la recherche de plusieurs gènes cibles à la fois.

1.1 Les principales étapes de la technique :

La technique FISH est réalisée sur des lames préalablement préparées pour l'étude cytogénétique. Ces lames vont subir dans l'ordre la dénaturation, l'hybridation et la détection de signal.

- La technique de dénaturation est précédée un prétraitement par l'ARNase et la protéinase K qui ont pour but de faciliter l'accès de la sonde aux gènes.

- Une étape de dénaturation par la chaleur qui consiste à séparer les deux brins l'ADN cible et de la sonde par rupture des liaisons hydrogènes.

- Une étape d'hybridation durant laquelle l'ADN cible se lie de façon spécifique aux sondes marquées.

- Une étape de lavage pour éliminer les hybrides non spécifiques et les sondes non hybridées

- L'étape de lecture et d'interprétation des résultats

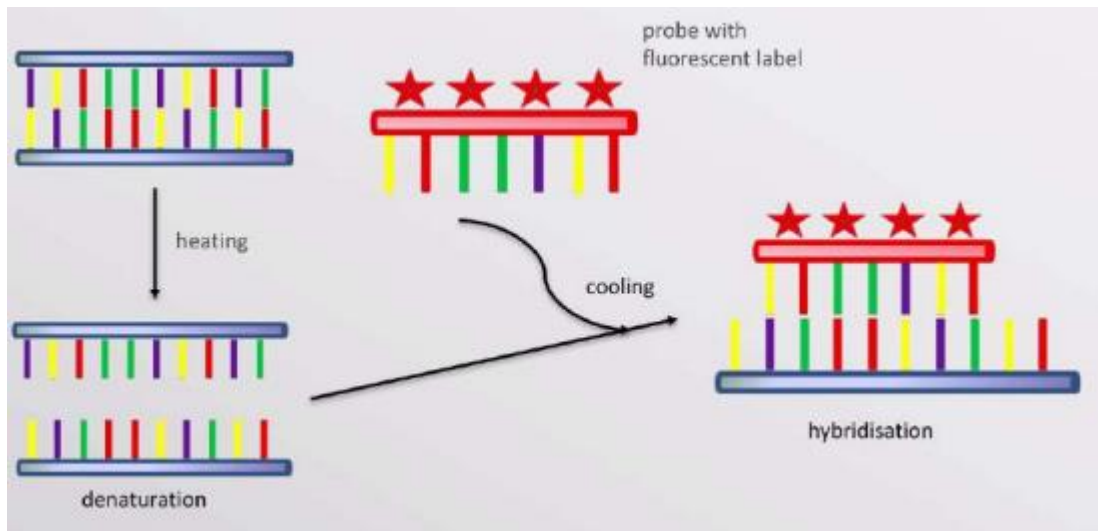


Figure 12 : Les étapes clés de la technique FISH. D'après (Hamard C et al, 2018)

1.2 Les principales applications de l'hybridation in situ :

FISH est une technique qui à plusieurs applications parmi celles-ci nous citons :

- La mise en évidence d'anomalies chromosomiques

De nombre des chromosomes,

Microdélétions,

Microremaniements intra chromosomiques,

Microremaniements inter- chromosomiques

-L'identification de matériel supplémentaire d'origine inconnue

Dans les pathologies comme les cancers du poumon, la technique de FISH sert à la détection des réarrangements du gène ALK dans les adénocarcinomes bronchiques.

(Camidge DR et al, 2012)

1.3 Les principales avantages et limites de la FISH :

Avantages	Limites
<ul style="list-style-type: none">- spécificité- sensibilité- rapidité- Elle peut utiliser des tissus archivés et des cellules quel que soit leur stade du cycle cellulaire.	<ul style="list-style-type: none">- Ne visualise que la région du génome complémentaire à la sonde utilisée.- Nécessite un équipement coûteux pour la détection et la reconnaissance des signaux

Tableau I : Les principales avantages et limites de la FISH

2. L'immunohistochimie

❖ ALK comme exemple

L'IHC repose sur la propriété d'un anticorps monoclonal de se lier d'une façon spécifique à son antigène, cette liaison permet de détecter la protéine ALK dans les tissus biologiques à l'aide d'un chromogène. Dans le cas du cancer pulmonaire, IHC est utilisée comme une technique de référence sur la base que la protéine ALK n'est pas exprimée dans les tissus pulmonaires normale.

La présence d'un réarrangement ALK s'accompagne d'une surexpression de la partie catalytique du domaine kinase de l'ALK, pour cela la positivité et la négativité dans cette technique est basé sur le nombre de cellules marquées ainsi à l'intensité du marquage (0 : absence de marquage, +1 : expression faible, 2+ : expression modérée, 3 : expression forte).

L'IHC est une méthode de routine pour la détection du réarrangement d'ALK dans les laboratoires d'anatomopathologies, c'est une technique peu coûteuse, rapide et très sensible ce qui permet d'obtenir des résultats très fiables.

3. La QPCR ou PCR en temps réel

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique d'amplification d'un fragment d'ADN spécifique après un certain nombre de cycles.

Par contre la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel est désignée par (QPCR) utilise une sonde fluorescente ou un agent intercalant qui permet la détection et la quantification du signal fluorescent émis au cours de chaque cycle d'amplification. A souligner que l'intensité du signal fluorescent augmente de manière proportionnelle avec la quantité d'amplicon présents dans le milieu. **(Bustin, S. A. et al 2013)**

3.1 Les étapes de la QPCR :

Cette technique se produit en trois grandes étapes à savoir la dénaturation, l'hybridation et l'amplification. Ces trois étapes sont formées un cycle, ce cycle va être répétés un certain nombre de fois. Ces étapes se font dans un appareil nommé thermocycleur, qui permet la régulation de la température de façon précise et rapide de chaque étape du cycle.

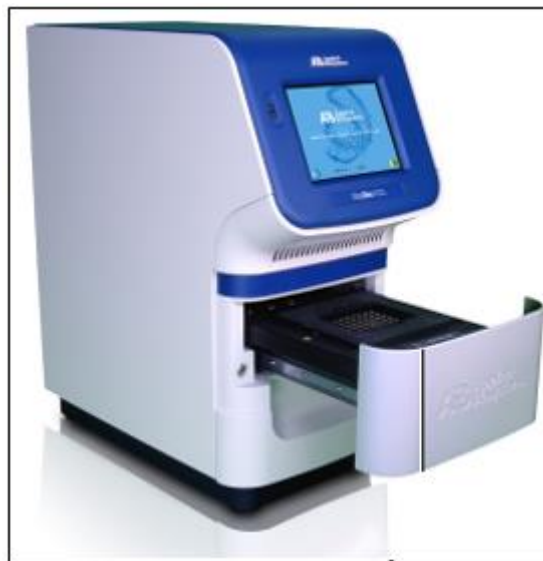


Figure 13 : Thermocycleur de pcr en temps réel

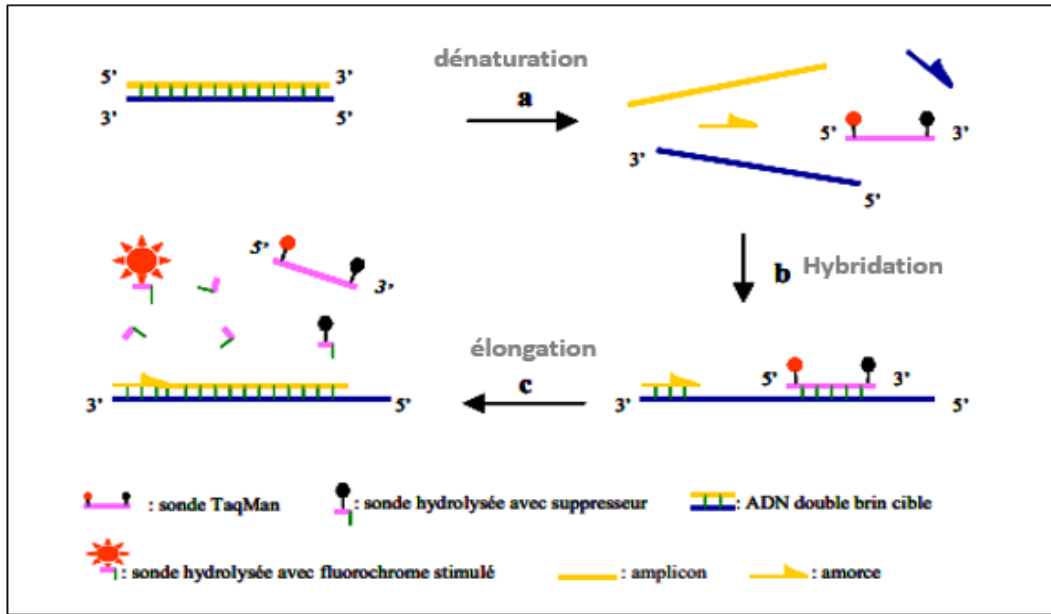


Figure 14 : Représentation schématique du principe de la technique qPCR en temps réel : méthode Taqman® (Poitras E and Houde A, 2002)

3.2 Cinétique d'amplification :

La fluorescence mesurée cycle par cycle est proportionnelle à la quantité d'ADNdb synthétisé (amplicon). Par ce suivi, il est alors possible de tracer une courbe, de caractériser les différentes phases de la cinétique PCR et de mesurer la quantité de produit d'amplification généré en un point de la phase exponentielle.

On distingue classiquement trois phases dans la cinétique d'amplification : Une phase de bruit de fond, une phase exponentielle et enfin une phase plateau où la quantité d'ADN reste constante quel que soit le nombre de cycle.

- La phase de « bruit de fond » correspond aux premiers cycles de PCR au cours desquels, malgré le doublement théorique du produit, l'intensité de la fluorescence émise est très faible et va permettre de définir la ligne de base de la courbe.

- La phase « exponentielle » correspond au doublement théorique du produit à chaque cycle, créant une croissance exponentielle du signal de fluorescence.

Le point de départ de la phase exponentielle d'amplification est appelé cycle seuil optique C_p ou C_t , il représente le de nombre de cycles de PCR à partir duquel le signal fluorescent du gène ciblé est supérieur à celui du bruit de fond. C'est un point remarquable de la cinétique d'amplification car c'est celui qui permet de calculer le nombre de molécules d'acide nucléique cible initialement présentes dans le milieu réactionnel avant l'amplification. (Taylor and Mrkusich, 2014)

- La phase dite de « plateau » correspond à un ralentissement de l'amplification qui peut être due à l'épuisement des différents réactifs de la PCR.

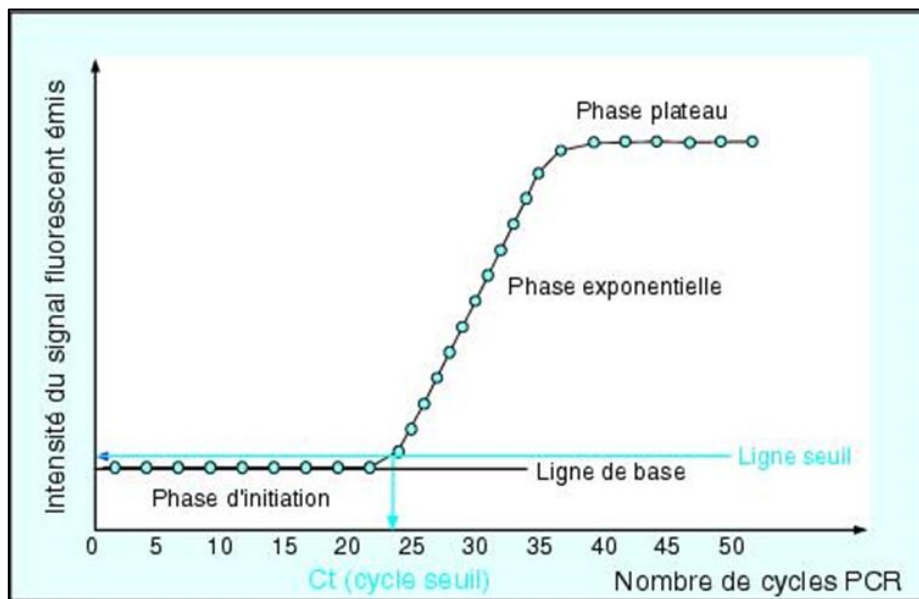


Figure 15 : Cinétique d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR). (Tse and Capeau, 2003)

Chapitre IV : Modalités thérapeutiques

La prise en charge des cancers bronchiques va dépendre de différents paramètres. Tout d'abord de l'extension de la maladie caractérisée par la classification TNM de la tumeur qui va permettre de déterminer si le traitement mis en place sera curatif ou bien palliatif. Ensuite, de l'anatomopathologie qui va intervenir dans le choix du traitement, et enfin, de l'état

général du patient qui sera à évaluer avant la mise en route du traitement. (**Gridelli C et al, 2015**)

1 La chirurgie :

La chirurgie représente le traitement de référence des cancers bronchiques non à petites cellules. Sa mise en place dépend de l'aptitude physiologique du patient à supporter une intervention chirurgicale ainsi que de la possibilité pour le chirurgien de retirer l'ensemble de la tumeur ainsi que les ganglions correspondants.

Plusieurs types d'intervention sont possibles, **la lobectomie**, qui consiste à enlever uniquement le lobe où se trouve la tumeur de façon à garder une partie du poumon ; **la bi-lobectomie** peut également être réalisée sur le poumon droit, ou **la pneumonectomie** qui repose sur l'ablation de tout le poumon atteint.

La chirurgie est réalisable plus particulièrement chez les patients avec des stades précoces et donc non métastatique, quand le cancer est encore localisé dans le poumon.

Un traitement néo-adjuvant complémentaire par radiothérapie pourra être proposé dans le cas où le volume tumoral est trop important et nécessite une réduction de la taille de la tumeur pour être opérée. (**Gridelli C et al, 2015**).

2 La radiothérapie :

La radiothérapie est la deuxième thérapeutique qui a fait la preuve de son efficacité dans le traitement des cancers bronchiques non à petites cellules, son but est de détruire définitivement toutes les cellules cancéreuses retrouvées dans le volume irradié, afin d'obtenir la guérison du cancer. (**Giraud P et al, 2016**)

Elle est utilisée chez les patients présentant une tumeur primaire peu étendue, qui ne sont pas traitables par chirurgie. Une radiothérapie post-opératoire peut être réalisée chez les patients présentant des tumeurs moyennement étendues afin d'éliminer les tumeurs satellites éventuelles et diminuer ainsi les risques de résurgence tumorale.

Il existe différentes sortes de radiothérapies : **Gridelli C et al, 2015**

- **La radiothérapie externe transcutanée** : elle utilise une source de rayonnements ionisants placée à distance des tissus irradiés (rayons gamma du cobalt, rayons X ou électrons des accélérateurs linéaires). Plus l'énergie du rayonnement est élevée, plus les tissus touchés par la dose maximale sont profonds.

- **La curiethérapie** : qui consiste à mettre des tuyaux directement à l'intérieur de la tumeur ou au niveau de la zone où se trouve la tumeur. Ces tuyaux seront branchés à un appareil qui, activé enverra des rayonnements au niveau de la tumeur. C'est donc une technique qui permet d'irradier de façon très précise la zone concernée.

- **La radiothérapie métabolique** : elle utilise des particules injectées dans la circulation et qui se fixent dans des gîtes préférentiels. Elle fait le plus souvent appel à de l'Iode 131 dans certaines formes de cancers de la thyroïde. De plus, certaines substances chimiques sont captées par les cellules tumorales de certains types de cancers et y atteignent des concentrations plus élevées que dans les tissus sains.

3 La chimiothérapie :

La chimiothérapie consiste à injecter un ou plusieurs médicaments toxiques afin de détruire les cellules cancéreuses. Elle peut être couplée à la radiothérapie ou bien d'utiliser une chimiothérapie de première ligne dans le traitement des CBNPC stade IV ne présentant pas de mutations accessibles à une thérapie ciblée et si l'expression PDL1 est inférieure à 50%.

Elle se compose d'un doublet à base de sels de platine (Carboplatine ou Cisplatine) associés à une molécule dite de 3ème génération type (Gemcitabine, Pemetrexed, Vinorelbine, Paclitaxel, Docétaxel) plus ou moins associés à un traitement anti-angiogénique (Bevacizumab) dans les tumeurs non épidermoïdes. Le choix de la chimiothérapie sera décidé en Réunion de Concertation Pluridisciplinaire (RCP) en fonction de l'âge, de l'état général, des comorbidités et du type histologique de la tumeur. (**Garassino MC et al, 2018**)

S'il existe une progression tumorale pendant la chimiothérapie en fonction de la décision de RCP une mono-chimiothérapie, une thérapie ciblée ou une immunothérapie seront proposées. (**Ramnath N et al, 2013**)

4 Les thérapies ciblées :

La thérapie ciblée est une stratégie thérapeutique dite personnalisée qui agit en bloquant précisément l'action de certains oncogènes agissant sur la prolifération, la survie ou encore l'angiogenèse tumorale (formation de néovaisseaux à partir du réseau vasculaire préexistant destinés à répondre aux besoins métaboliques de la tumeur) pour lutter contre les cellules tumorales tout en épargnant les cellules saines. Ces traitements peuvent être réalisés soit de manière isolée, soit de manière séquentielle ou combinée (**Favoni et Alama, 2013**)

Ce type de traitement, s'il est possible, offre un meilleur taux de réponse ainsi qu'une meilleure médiane de survie qui peut être supérieure à 2 ans. (**Ramnath N et al, 2013**)

4.1 Les thérapies ciblées en cas de réarrangement d'ALK

4.1.1 Mécanisme d'action

Comme nous l'avons vu précédemment, les RTK sont composés d'une région extracellulaire contenant un domaine de liaison au ligand, une courte région transmembranaire et une région intracellulaire possédant le domaine à activité tyrosine kinase. Les tyrosines kinases ont pour rôle d'amplifier et de contrôler de nombreux signaux intracellulaires en favorisant des phosphorylations sélectives des résidus tyrosine sur elles-mêmes ou sur d'autres protéines. Une fois activées, les kinases catalysent une réaction de transfert d'un groupement phosphate terminal de l'ATP vers le substrat, pour permettre son activation. (**Hantraye B et al, 2015**)

Les ITK (Inhibiteurs de tyrosine kinase) sont des molécules synthétiques de faible poids moléculaire (300 à 1000 Daltons), amphiphiles, ciblent la région intracellulaire des RTK. Elles possèdent une analogie structurale très importante à l'ATP, leur permettant de se fixer de manière compétitive sur le domaine kinase du récepteur et de rendre ainsi le site d'action inaccessible à l'ATP (**figure 16**). Elles empêchent spécifiquement l'activité enzymatique de ces récepteurs. La phosphorylation de protéines en aval nécessaires pour la prolifération cellulaire est alors rendue impossible. (**Boutayeb S et al, 2012**)

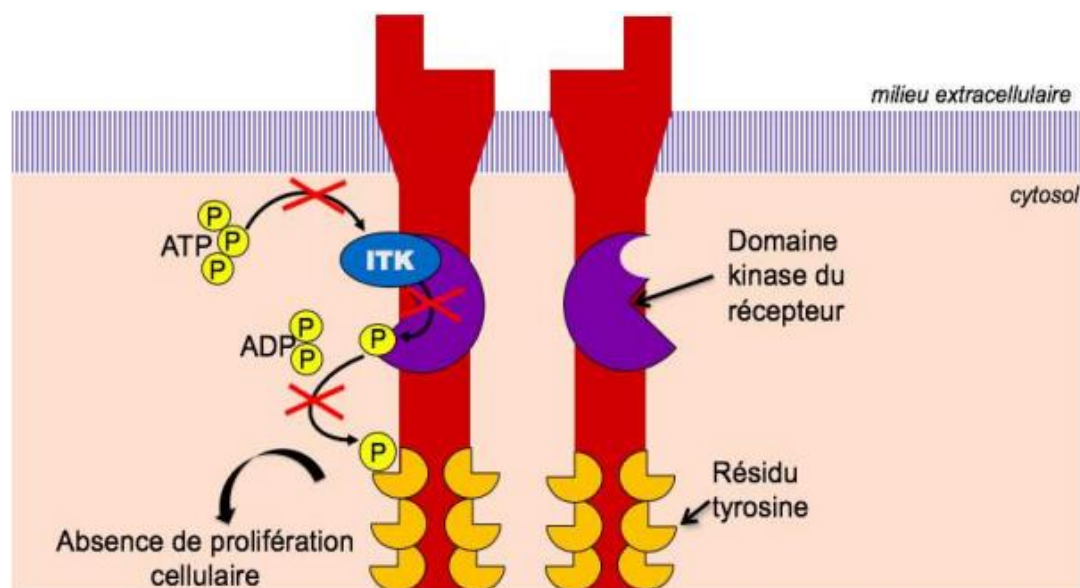


Figure 16 : Modèle de représentation du mécanisme d'action des ITK (Boulland S, 2019)

4.1.2 Molécules en cas de réarrangement d'ALK

Selon les dernières recommandations, le traitement de 1ère ligne repose sur l'alectinib à la posologie de 600 mg en deux fois. Il existe sous forme per os. Cet ITK est hautement sélectif et puissant. En effet, selon la Commission de la transparence, l'alectinib est l'option à privilégier en 1ère intention dans le traitement du CBNPC à un stade avancé avec réarrangement d'ALK. (Boutayeb S et al, 2012)

L'apparition de résistance est retrouvée dans environ 53% des cas à cause de nouvelles mutations touchant le site tyrosine kinase d'ALK, d'amplifications d'ALK ou d'activation d'autres voies de signalisations telles qu'EGFR ou KRAS. Il est recommandé d'adapter le traitement au profil moléculaire de résistance ou d'utiliser d'autres ITK tels que le ceritinib, le brigatinib etc. En cas de résistance aux ITK, une chimiothérapie associée au bevacizumab sera proposée. (Couraud S et al, 2019)

4.2 Les Thérapies ciblées en cas de mutation d'EGFR :

Certains ITK anti-EGFR sont utilisés dans le CBNPC. Il existe trois générations d'ITK. La première génération (erlotinib: Tarcéva® et géfitinib Iressa) il n'agit que sur l'EGFR, la

seconde génération, dite irréversible (lapatinib, afatinib et dacomitinib) est différente sur deux points; elle inhibe de manière irréversible car elle se lie de manière covalente d'où son action plus longue et sa cible est plus large car elle peut inhiber également d'autres récepteurs comme HER2 (**Ou S-HI et al, 2012**). Et enfin, la troisième génération (AZD92 (osimertinib-Tagrisso), le CO-1686 (rociletinib) et le WZ4002) cible plutôt les mutations acquises telle que la mutation (1790M).

En cas de progression sous un traitement par les ITK de première ou deuxième génération, il est conseillé de rechercher une mutation T790M sur ADN circulant, sur biopsie ou sur cytologie. En effet, cette mutation de résistance retrouvée dans plus de 50%. En cas d'absence de cette mutation, un traitement adapté au mécanisme de résistance identifié ou une chimiothérapie à base de sels de platine sera privilégiée. (**Dong Y et al, 2019**)

5 L'immunothérapie :

L'immunothérapie est devenue une approche prometteuse dans le traitement des cancers, elle est une avancée majeure et est au cœur de tous les congrès internationaux.

Les premières Autorisations de Mise sur le Marché (AMM) se sont développées dans le mélanome puis les indications se sont étendues dans le cancer du poumon et d'autres cancers avec la multiplication de nouveaux essais cliniques. (**Gandhi L et al 2018**)

5.1 Immunothérapie anti-PD1/ PD-L1 :

Le récepteur PD-1(Programmed cell death 1) est exprimé essentiellement par les lymphocytes activés mais également sur d'autres cellules du système immunitaire (LT régulateur, lymphocytes B, cellules NK, cellules dendritiques et monocytes). Son expression augmente au niveau des LT activés en cas d'exposition antigénique prolongée afin de limiter l'activation des lymphocytes et d'éviter une réponse immune excessive. (**Pardoll DM 2012**)

Ce récepteur PD1 a deux ligands : PDL1, protéine transmembranaire retrouvée principalement sur les cellules tumorales sous l'effet de l'interféron ou parfois sur quelques cellules immunocompétentes et PDL2 peu exprimé au niveau tumoral mais principalement sur les macrophages et les cellules dendritiques (qui interviendraient notamment dans la tolérance au niveau pulmonaire).

L'interaction PD1/PDL1 conduit à une régulation négative du lymphocyte qui cesse de proliférer et sécréter des cytokines et donc de détruire les cellules tumorales. Il en résulte alors une anergie et une apoptose des lymphocytes T. (Nguyen LT and Ohashi PS 2015)

Les cellules tumorales utilisent cette voie pour échapper au système immunitaire à la fois en sur-exprimant le ligand PDL1 à sa surface mais également sur les cellules de son environnement pour freiner l'activité du système immunitaire.

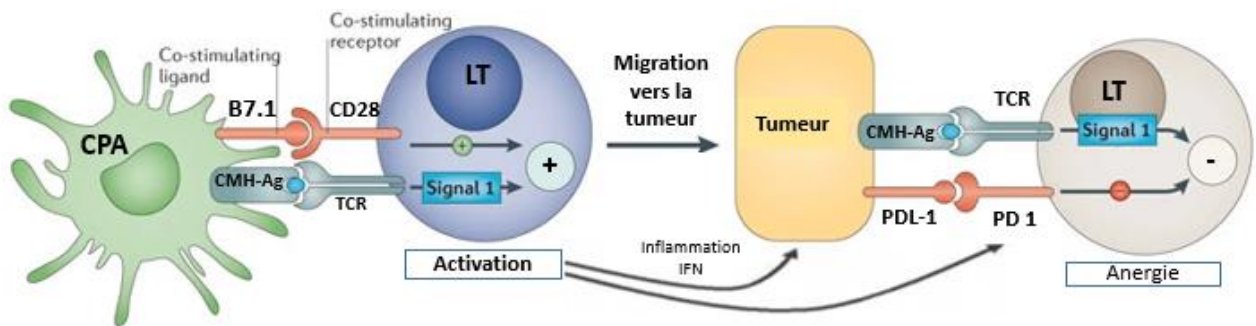


Figure 17 : Mécanismes de l'axe PD1/PDL1 dans la résistance immunitaire

(Pardoll DM 2012)

Les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire empêchent les mécanismes de frein mis en jeu par la cellule tumorale et réactiver le système immunitaire pour lui permettre de lutter plus efficacement contre les cellules tumorales. (Figure 18)

Parmi ces molécules, nous nous intéressons particulièrement aux anti-PD1 et anti-PDL1 qui sont des immunoglobulines monoclonales humanisées. Les anti-PD1 bloquent l'interaction de PD1 avec ses deux récepteurs à savoir le PDL1 et le PDL2, l'avantage des anti PD1 serait de pouvoir saturer les récepteurs PD1 des LT circulants avant leur migration au niveau tumoral et donc d'être actif à des concentrations plus faibles. Les anti-PDL1 bloquent la liaison PD1 PDL1 mais également à un autre récepteur B7-1 dont le rôle semble moins important par contre les anti-PDL1 respectent l'interaction de PD1 et PDL2 impliquée dans la tolérance périphérique notamment au niveau pulmonaire. (Topalian SL et al 2012)

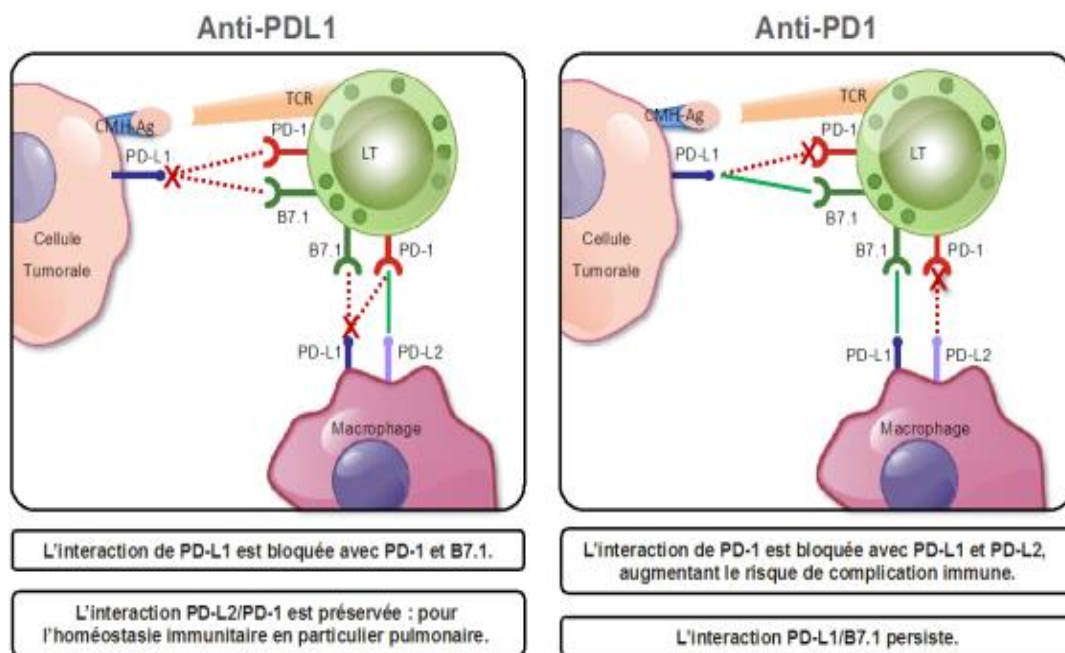


Figure 18 : Mécanismes d'action des anticorps anti PDL/PDL1 (Chen DS et al, 2012)

Les molécules actuellement disponibles sont regroupées dans le tableau suivant (**tableau VII**):

Tableau II: Tableau regroupant les molécules disponibles en immunothérapie dans le CBNPC

Anti-PD1	Anti-PD-L1
Pembrolizumab (KEYTRUDA®)	Atezolizumab (TECENTRIQ®)
Nivolumab (OPDIVO®)	

Partie Pratique

1. Présentation du cadre du travail

❖ **Le laboratoire d'Anatomo-pathologie de l'INO**

L'institut national d'oncologie Sidi Mohamed Ben Abdellah de Rabat est une institution publique qui fait partie du centre hospitalier Ibn Sina -CHUIS de Rabat, spécialisée dans la prise en charge des maladies cancéreuses, elle a été inaugurée en 1983.

Le Laboratoire d'anatomo-pathologie de l'INO est situé au sous-sol de l'hôpital, chargé à scruter les pièces opératoires et les biopsies cancéreuses de l'hôpital, en s'appuyant sur des techniques cyto-histologiques et de biologie moléculaire.

❖ **Cheminement d'un prélèvement au sein de LACP**

1) Unité de réception

La première ligne de service, tout type d'échantillon passe premièrement par la réception, comme première étape on aura la création du dossier du patient opéré grâce à un système informatique dit ENOVA. Après l'archivage numérique des différents donnés du patient (un numéro de référence, l'identité du patient, le numéro du dossier, l'âge, l'organe prélevé, les informations cliniques, le fixateur utilisé, le médecin prescripteur...etc), Le numéro de référence est composé d'un code qui aide à l'identification après la fin de l'examination, à noter que tous les échantillons reçus sont fixés au formol tamponné à l'état frais. Et finalement l'échantillon va être acheminé au sein du laboratoire vers la salle de macroscopie.

2) Salle de macroscopie

Le travail du poste commence par la fixation de l'échantillon dans le Formol tamponné à 10% d'une durée de 24H à 48H pour les pièces opératoires, et de 6H à 12H pour les biopsies.

Cette étape est primordiale dans la préparation tissulaire, elle a pour but d'immobiliser les sites antigéniques et de conserver l'aspect structurale du tissu autant que possible.

Prise en charge des pièces opératoires

Cette étape est réalisée par un médecin pathologiste dans une table de macroscopie qui décrit l'échantillon en précisant la localisation tumorale, la taille de la tumeur, son poids, sa couleur, sa forme, sa délimitation, sa consistance, son aspect coupé...etc. Ces informations sont enregistrées dans le système par un technicien.

Après la description, le médecin prélève des échantillons représentatifs de la tumeur on les mettant des cassettes numérotées, puis les incubant dans une boîte rempli par le formol pour éviter toutes lésions tissulaires.



Figure 19 : Photo illustrant l'hôte de la salle de macroscopie au laboratoire d'anatomie-pathologique

Prise en charge des biopsies

Après avoir reçu les flacons contenant les fragments biopsiques, comme 1^{er} étape le technicien vérifie le N de référence de la biopsie retrouvé dans la fiche et dans le flacon, puis il note ce dernier dans des cassettes. Ensuite une étape d'installation de la mousse dans les cassettes est nécessaire pour permettre de stabiliser les fragments et d'éviter leur diffusion à

travers les pores de la cassette, puis comme une 3^{ème} étape, on détermine le nombre et la taille des fragments après les avoir prélevés du flacon vers les cassettes. Ces dernières seront incubées dans une boîte remplie par le formol.

Pour pouvoir distinguer entre les fragments des pièces opératoires et biopsiques, des cassettes de couleur différentes sont utilisées, roses pour les fragments biopsiques et blancs/jaunes pour les pièces opératoires.

Les cassettes examinées pendant la journée vont être mise au niveau de l'appareil de circulation toute la nuit dans une série de solutions bien ordonnées :

Formol ➡ Alcool ➡ Toluène ➡ Paraffine ➡ Alcool

Cette série de solutions assure la déshydratation des pièces, qui consiste à débarrasser le tissu de toute trace d'eau et se fait par un agent miscible à l'eau et à la paraffine qui est généralement l'alcool.



Figure 20 : L'appareil de circulation

3) Salle technique

Après la circulation qui est une phase primordiale dans l'anatomie pathologique, qui permet la déshydratation, le circuit est enchaîné par d'autres étapes essentielles qui sont : l'inclusion ou l'enrobage dans de la paraffine, la microtomie, et la coloration.

L'imprégnation par la paraffine : Après avoir récupéré le tissu déshydraté de l'appareil de circulation, ce dernier est imprégné dans la paraffine afin d'obtenir un bloc qui permettra au prélèvement de garder ses propres caractéristiques.

Pour effectuer cette partie, les cassettes sont mises en place dans une zone chaude dans la station d'inclusion. Après la vérification des fiches, les fragments déjà mise dans des cassettes sont disposés selon leurs tailles dans des moules correspondants, le tout est ensuite rempli par la paraffine chaude. Les moules sont laissés sur une plaque refroidissante puis démoulés pour obtenir le bloc.



Figure 21 : Station d'enrobage

La microtomie : c'est une étape qui permet la réalisation des coupes fines de bonne qualité et visualisée au microscope.

Les blocs sont disposés dans un support au niveau du microtome, en contrôlant ce dernier, on réalise des coupes ‘‘rubans’’ de plusieurs niveaux du fragment à l’aide des lames à rasoir. On élimine ensuite le ruban du microtome et on dépose sur une lame blanche déjà imbibée par l’alcool, au sein du bain marie on identifie la lame, enlève le bloc du microtome, et on réchauffe les lames dans l’étuve.



Microtomie

Bain marrie

Etuve

Figure 22 : Matériels utilisés pour la réalisation des coupes

La coloration : Consiste à la coloration des noyaux et cytoplasmes des cellules ce qui permet une bonne visualisation de la morphologie cellulaire au microscope. Elle peut être manuelle ou automatique. Il existe différents types de coloration :

- ❖ **Standard :** C’est la coloration histologique de routine par lequel on associe deux colorants « Hémalum ou hématoxyline et Eosine ». L’hémalum est un colorant basique qui colore le noyau en bleu alors que l’Eosine est un colorant acide, qui colore le cytoplasme en rose.



Figure 23 : L'appareil de coloration HE

- ❖ **Spéciale :** Ils existent des colorations spéciales par exemple qui mettent en évidence les fibres conjonctives (la coloration de Trichrome de Masson, Movatt, la réticuline), les glucides (PAS, le bleu Alcian), l'amyloïde (le rouge Congo) ainsi que des micro-organismes (la coloration de Grocott et gram).

4) Salle d'immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique de routine dans le laboratoire d'anatomopathologie, elle permet de détecter le niveau de l'expression des protéines dans les cellules cancéreuses.

L'immunohistochimie se réalise en plusieurs étapes :

- ❖ Déparaffinage des coupes (bains de toluène, 5 minutes)
- ❖ Réhydratation (passage dans des bains d'alcool à concentration décroissante pendant 5 minutes chacun puis un rinçage dans l'eau distillé)
- ❖ Démasquage des coupes (imprégnation dans une solution à pH approprié puis dans un bain d'eau pendant 45 minutes à une température de 95 à 100°C)

- ❖ Blocage des peroxydes endogènes pour inhiber les sites antigéniques non spécifiques
- ❖ Application d'un anticorps primaire : Couvrir les sections avec l'anticorps primaire spécifique, pendant 30 à 40 minutes en fonction de l'anticorps, rincer dans le PBS (5 minutes)
- ❖ Application de l'anticorps secondaire (streptavidine-biotine) : couvrir avec l'anticorps secondaire, incuber (20 à 30 minutes), rincer dans le PBS. (5 minutes)
- ❖ Application du substrat chromogène (diaminobenzidine ou DAB) : Diluer la DAB chromogène dans le substrat, couvrir les lames avec ce complexe qui forme une couleur brune au site de l'antigène cible. (3 minutes)
- ❖ Comptage : Passage dans l'hématoxyline
- ❖ Post-contre-couleur : Passage dans l'eau ammoniacale
- ❖ Déshydratation : Passage dans l'alcool à concentration croissante et dans deux bains de toluène.
- ❖ Montage



Figure 24 : L'appareil d'immunohistochimie (Autostainer Link48 Dako®)

5) Salle d'archivage

Les blocs d'inclusion, les lames colorées et les comptes rendus sont conservés par le laboratoire dans des archives. Il est donc toujours possible de réexaminer les Lames et/ou de confectionner de nouvelles lames à partir du bloc d'inclusion tant que le matériel tissulaire n'est pas épuisé. Les lames, les blocs et les comptes rendus sont classés et stockés dans des armoires.

2) Matériels et méthodes

Présentation de l'étude

Il s'agit d'une étude prospective réalisée sur des patients atteints d'un cancer bronchique non à petites cellules et suivis à l'INO, dont le but est d'étudier le statut mutationnel du gène d'EGFR, le réarrangement de l'ALK et l'expression de PD-L1 par les cellules tumorales.

Cette étude est réalisée au sein du laboratoire d'anatomopathologie à l'institut national d'oncologie (INO) de Rabat sur des prélèvements biopsiques fixés dans le formol.

Collecte des données

Les données des patients ont été recueillies à partir des dossiers médicaux informatisés et des comptes rendus opératoires dont les paramètres collectés sont les suivants :

- ❖ L'âge
- ❖ Le sexe
- ❖ Le statut du tabagisme
- ❖ Le type histologique
- ❖ Le statut mutationnel de l'EGFR et l'ALK
- ❖ Le statut d'expression de PD-L1

Détection du spectrum mutationnel du gène EGFR par Idylla

Idylla™ est un système de diagnostic moléculaire automatisé basé sur la PCR en temps réel, il fournit des résultats rapides permettant aux médecins de prendre des décisions en temps opportun pour améliorer le traitement des patients cancéreux. Idylla™ peut être utilisé avec plusieurs types d'échantillons, y compris les biopsies solides à partir des coupes de tissus FFPE (fixé au formol et inclusion en paraffine) et des échantillons de plasma de biopsie liquide.



Figure 25 : La plateforme Idylla™. ([Idylla EGFR Mutation Test | Biocartis](#))



Figure 26 : Les étapes d'un test Idylla TM ([Idylla EGFR Mutation Test | Biocartis](#))

Idylla TM détecte qualitativement les mutations du gène EGFR y compris celles qui touchent **les exons 18,19,20 et 21 (Figure 27)** dans une durée totale de 150 minutes et d'une concordance globale de 97,9%.

EGFR mutation detection		
Exon 18	G719A G719C G719S	c.2156G>C c.2155G>T; c.2154_2155delinsTT c.2155G>A
	Del9	c.2238_2248delinsGC c.2239_2248delinsC c.2240_2248del cc.2239_2247del
Exon 19	Del12	c.2239_2251delinsC c.2240_2251del
	Del15	c.2235_2249del c.2236_2250del c.2239_2253del c.2240_2254del c.2238_2252del c.2237_2251del c.2235_2252delinsAAT c.2237_2252delinsT c.2234_2248del c.2236_2253delinsCTA c.2237_2253delinsTA c.2235_2251delinsAG c.2236_2253delinsCAA c.2230_2249delinsGTCAA
Exon 19	Del18	c.2240_2257del c.2237_2255delinsT c.2239_2256del c.2236_2253del c.2239_2258delinsCA c.2237_2254del c.2238_2255del c.2237_2257delinsTCT c.2236_2255delinsAT c.2236_2256delinsATC c.2237_2256delinsTT c.2237_2256delinsTC c.2235_2255delinsGGT
	Del21	c.2238_2258del c.2236_2256del
	Del24	c.2253_2276del
Exon 20	T790M	c.2369C>T
	S768I	c.2303G>T
	insG insASV9 insASV11 insSVD insH	c.2310_2311insGGT c.2308_2309insGCCAGCGTG c.2308_2311delinsCCAGCGTGGAT c.2311_2312insGCGTGGACA c.2319_2320insCAC
	L858R	c.2573T>G c.2573_2574delinsGT c.2573_2574delinsGA
Exon 21	L861Q	c.2582T>A

Figure 27 : Les différentes mutations détectées par la plateforme Idylla du gène EGFR ([Idylla EGFR Mutation Test / Biocartis](#))

La révélation du statut ALK par l'immunohistochimie

Le statut de la protéine ALK a été mise en évidence par la technique d'immunohistochimie en analysant son niveau d'expression dans les cancers pulmonaires non à petites cellules.

L'IHC examine qualitativement l'intensité du marquage engendré par les anticorps anti-ALK.

Il existe plusieurs anticorps anti-ALK, mais tous ne sont pas adaptés aux cancers pulmonaires.

L'Ac-anti ALK utilisé durant ce travail est celle du **clone 5A4**, dilué 1/40 de type IgG1.

Anticorps Primaire	Temps d'incubation de l'anticorps primaire	Réactif de visualisation	Temps d'incubation de HRP	Système de visualisation	Révélation du complexe Ac-Ag	Expression
Clone 5A4	60min, 23 °C	Polymère HRP conjugué, kit Dako	20 min	EnVision FLEX+, Dako	DAB+, Dako	Cytoplasmique

Tableau III: Protocole de révélation de l'expression de la protéine ALK par l'immunohistochimie.

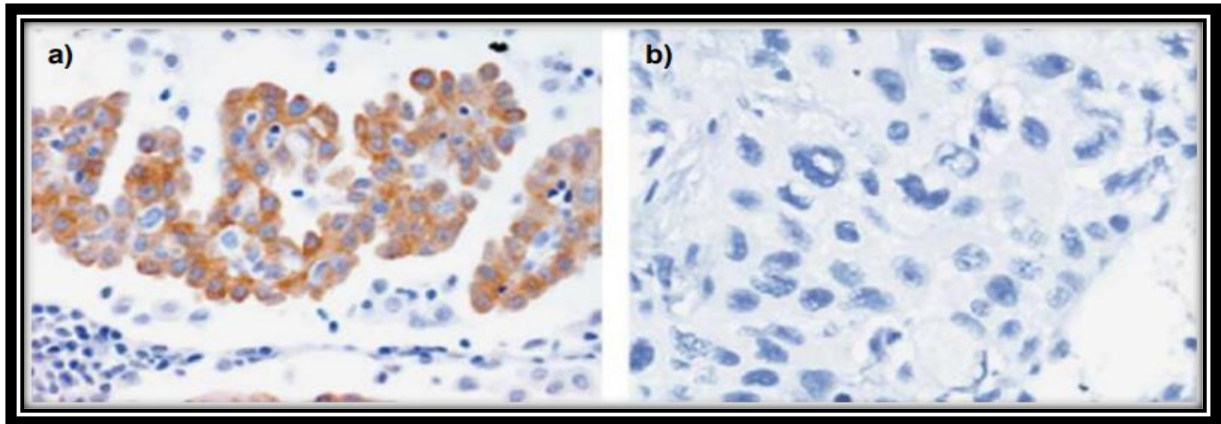


Figure 28 : Exemple d'un marquage de la protéine ALK par l'IHC. a) Réarrangement Positive (marquage cytoplasmique intense). b) Pas de réarrangement. (Selinger et al., 2013)

Les résultats sont donnés sous forme d'un score :

- **Score 0 :** Absence du marquage = Pas de réarrangement
- **Score 1+ :** Expression faible
- **Score 2+ :** Expression modérée
- **Score 3+ :** Expression forte = présence d'réarrangement



Nécessite un contrôle par la technique FISH

La révélation de l'expression de PD-L1 par l'immunohistochimie

Le protocole qui met en évidence le niveau d'expression de PD-L1 nécessite en premier lieu des témoins interne et externe. Les témoins positifs externe qui sont généralement issus du tissu amygdalien ou placentaire permettent de contrôler le protocole d'immunohistochimie. Les témoins externes négatifs assurent qu'il n'y a pas de marquage non spécifique, alors que les témoins internes composés de cellules dendritiques ou macrophages exprimant naturellement la protéine PD-L1.

En utilisant le kit commercialisé par Dako, nous avons pu rechercher l'expression de l'anticorps anti-PDL1.

Anticorps Primaire	Temps d'incubation de l'anticorps primaire	Réactif de visualisation	Temps d'incubation de HRP	Système de visualisation	Révélation du complexe Ac-Ag	Expression
Anticorps monoclonal, clone 22C3	30 minutes	Polymère HRP conjugué, Dako	20 minutes	EnVision FLEX+, Dako	DAB+, Dako	Membranaire

Tableau IV: Protocole de révélation de l'expression de la protéine PDL1 par l'immunohistochimie.

La détermination du niveau d'expression de la protéine PD-L1 est déterminée à l'aide du score de la proportion du tumeur (TPS), qui signifie le pourcentage de cellules tumorales viables marquées partiellement ou complètement de la membrane.

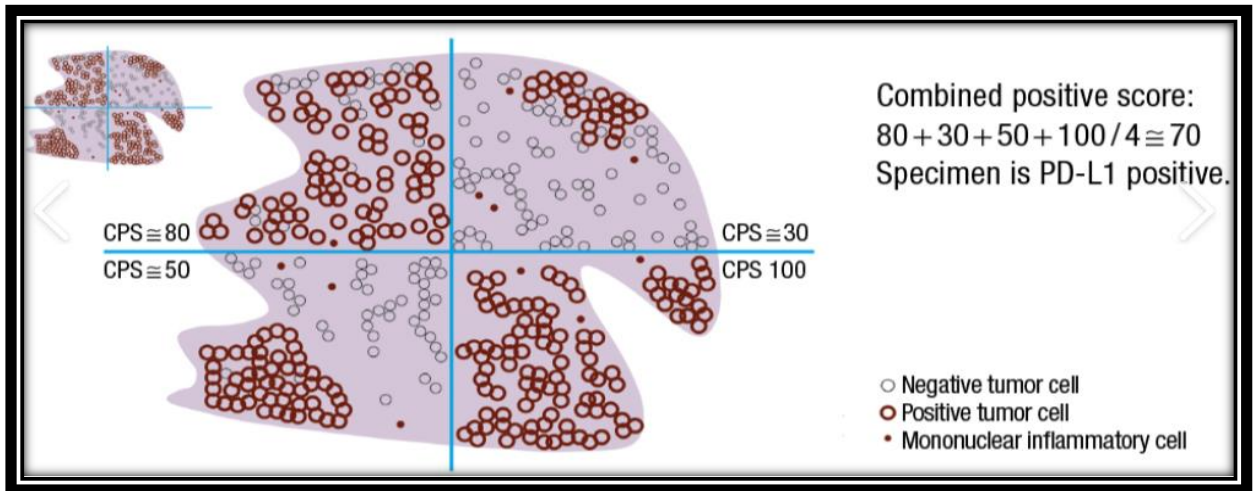


Figure 29 : Exemple d'un calcul du score TPS (Scoring des cancers gastriques GEJ pour l'expression de PD-L1 - CAP TODAY (captodayonline.com))

L'interprétation du score TPS est mentionné ci-dessous :

% des cellules marquées	
Niveau d'expression (TPS)	
Inférieur à 1%	
Compris entre 1 et 49%	
Supérieur ou égale 50 %	

Etat d'expression de la PDL1	
Absence d'expression de PD-L1	
Expression de PD-L1	
Expression élevée de PDL1	

Figure 30 : Interprétation de l'expression de PD-L1 par l'IHC

Résultats

Au total, 27 cas atteints du cancer bronchique non à petites cellules ont été inclus dans cette étude dans une période de 6 mois.

✓ Répartition des patients selon Le sexe :

A partir du graphe ci-dessous on constate une dominance masculine de 70% contre 30% pour les femmes.

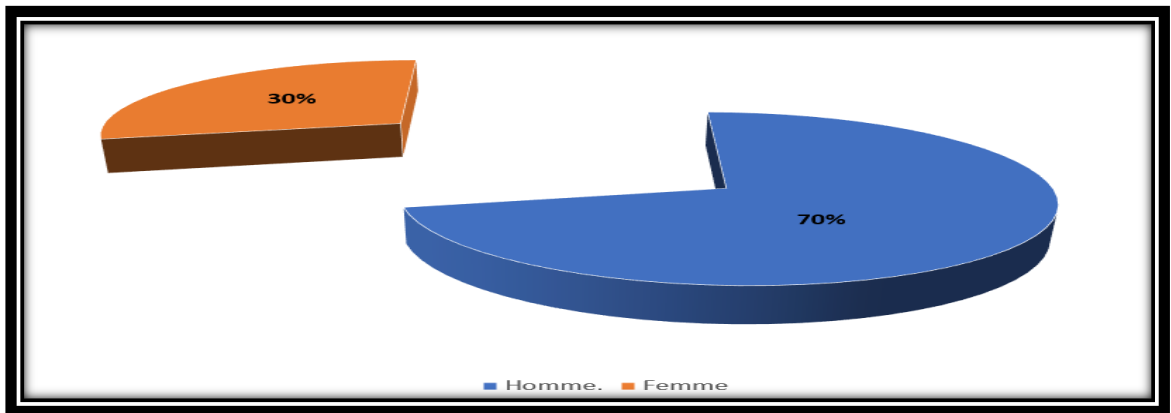


Figure 31 : Répartition des patients atteints de CBNPC selon le sexe.

✓ Répartition des patients selon L'âge :

Les patients inclus dans notre étude avaient plus 40ans avec un âge moyen de 61 ans.

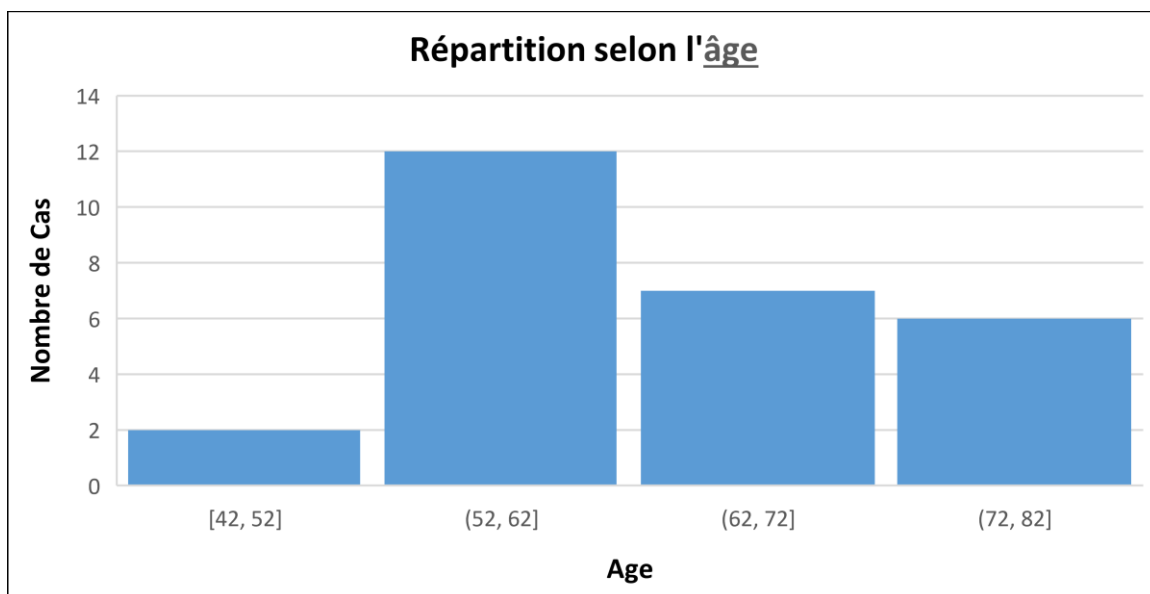


Figure 32 : Répartition des patients atteints de CBNPC selon l'âge.

✓ **Répartition des patients selon le statut du tabagisme :**

Nos résultats montrent une prédominance des patients fumeurs avec un pourcentage de 63%, dont 100% des femmes étaient non-fumeurs.

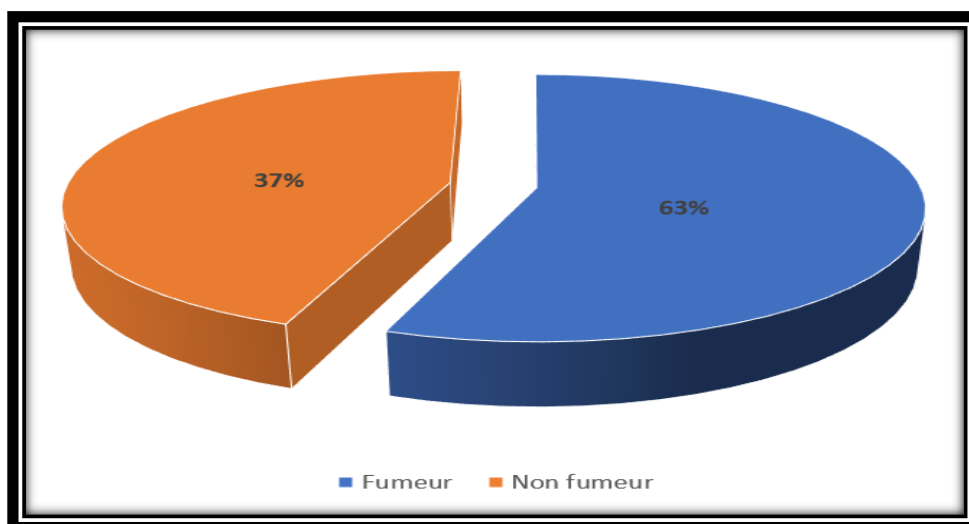


Figure 33 : Statut du tabagisme des 27 patients dont 100% des femmes étaient non-fumeurs.

✓ **Répartition des patients selon le type histologique et le degré de différenciation :**

Nos résultats montrent une dominance quasi-totale des patients ayant des adénocarcinomes (96,2%) avec des degrés de différenciation variables contre 3,8% pour les carcinomes sarcomatoïdes.

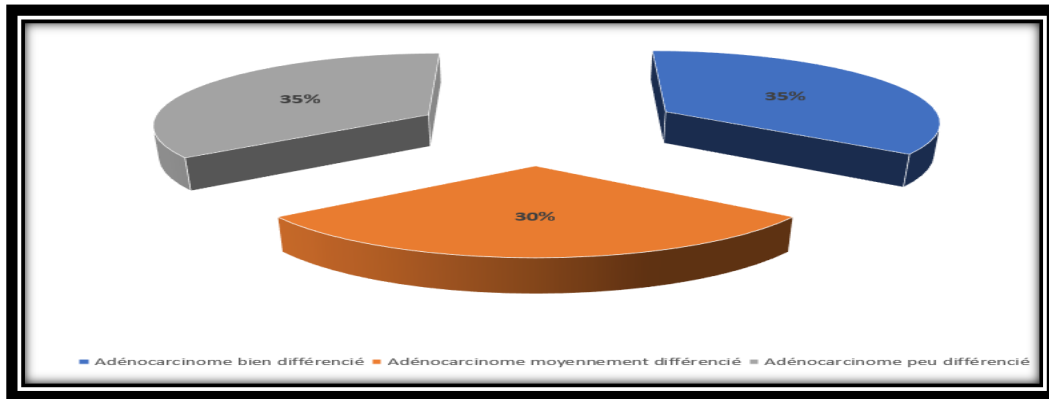


Figure 34 : Répartition des cas selon le degré de différenciation des adénocarcinomes.

Détection de mutations EGFR par Idylla

Parmi 27 cas atteints de CBPNPC, 3 cas ont été porteurs des différentes mutations au niveau du gène EGFR : L858R, G719A/C/S, L861Q et suppression d'exon 19.

Idylla™ EGFR Mutation Test	
GÉNOTYPE EGFR	
G719A/C/S	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	p.Gly719Ala / p.Gly719Cys ; p.Gly719Cys(2) / p.Gly719Ser
Changement de nucléotide	c.2156G>C / c.2155G>T ; c.2154_2155delinsTT / c.2155G>A
L861Q	MUTATION DÉTECTÉE
Changement de protéine	p.Leu861Gln
Changement de nucléotide	c.2582T>A
L858R	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
SUPPRESSION DE L'EXON 19	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
T790M	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
INSERTION DE L'EXON 20	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE
S768I	AUCUNE MUTATION DÉTECTÉE

CQ DU CONTRÔLE EGFR	23.4
----------------------------	-------------

Figure 35 : Exemple d'un résultat d'un patient affiché par le système Idylla

Etude Immunohistochimique des cancers bronchiques non à petites cellules

- **Statue de l'expression de la protéine ALK**

L'expression de la protéine ALK était positive chez 2 cas, soit 7% en totalité.

	Score	Fréquence	Pourcentage
ALK négatif	0	25	93%
ALK Positif	1	0	0
ALK positif	2	1	3,5%
ALK positif	3	1	3,5%

Tableau V: Répartition de l'expression de la protéine ALK dans notre série

- **Statut de l'expression de la protéine PD-L1**

Parmi nos patients, 15 cas étaient positifs, soit 55,5% de la totalité, dont 2 cas avaient l'ALK réarrangés.

Score de la proportion de la tumeur	Le nombre	Pourcentage
Inférieur a 1%	12	44,5%
Compris entre 1% et 49%	6	22,2%
Supérieur ou égale a 50%	9	33,3%

Tableau VI: La répartition des cas selon le score TPS

	Cas 1	Cas 2
Etat d'expression de PD-L1	Expression modérée	Expression modérée
Niveau d'expression de PD-L1	15%	30%

Tableau VII : Corrélation entre l'expression de la PD-L1 et les cas avec un statut ALK réarrangé

Discussion

Selon le **Registre Des Cancers du Grand Casablanca, 2016** les hommes étaient les plus touchés par le cancer pulmonaire, d'une incidence de 89,6%, contre 10,4% pour les femmes, ce qui concorde avec nos résultats où il avait une dominance masculine de 70% contre 30% pour les femmes.

L'incidence d'être touchée par un cancer pulmonaire est fortement corrélée à la consommation du tabac (**Pierre P et al., 2003**), ce facteur était responsable de plus de 90% de nouveaux cas du CBPNPC au monde (**Doll R et al., 2010**), ce qui explique que 63% des cas dans notre série étaient des hommes consommateurs du tabac (**Figure 33**), donc un renforcement des politiques antitabac est nécessaire. Parmi les 33% des patients qui ont développé un cancer pulmonaire sans antécédents de tabagisme, d'autres facteurs de risques tels que environnementales ou héréditaires pourraient mettre en cause.

L'âge moyen des patients dans notre série étaient 61 ans, ce qui est similaire avec d'autres études qui étaient entre 60 et 70 ans (**FARUK TAS et al., 2013**), avec des extrêmes d'âges de 42 à 79 ans.

La dominance d'adénocarcinome dans notre série était de 92,2%, nos résultats concorde avec plusieurs littératures tels que celle de (**Hee-Young Yoon et al., 2020**), où l'adénocarcinome représentait le type histologique le plus diagnostiqué chez les patients atteints des cancers bronchiques.

La sélection des schémas thérapeutiques pour le cancer bronchique avancé n'est pas uniquement basée sur les types histologiques, mais aussi sur l'état des mutations pilotes et de l'expression du PD-L1, pour cela une évaluation précise des biomarqueurs joue un rôle clé dans la prise en charge personnalisé. Actuellement, le statut PD-L1 ainsi les mutations pilotes à savoir, celles de l'EGFR et ALK sont recommandées comme tests de biomarqueurs minimaux nécessaires en cas d'un cancer bronchique.

✓ Pour l'EGFR

D'après nos résultats on peut bien constater que seulement 11,1% (3 cas) des patients avec un CBPNPC présentait des mutations au niveau du gène EGFR, ce qui signifie qu'ils existent d'autres biomarqueurs qui interviennent dans ce type de cancer à savoir les mutations touchant le gène KRAS, les réarrangements de l'ALK et ROS1 et les niveaux d'expression de PD-L1. (**Rangachari et al., 2017**)

Les trois patients qui ont été porteurs des mutations au niveau de l'EGFR étaient des femmes ce qui corrèle avec les études qui disent que les femmes peuvent également être plus prédisposées aux aberrations moléculaires et elles sont également les plus touchées aux mutations d'EGFR (**Barrera-Rodriguez R et al., 2012**). Parmi ces mutations, la **L858R** et la **suppression d'exon 19** sont les plus répandues au niveau du gène d'EGFR, contre les mutations **G719A/C/S, L861Q** qui sont les moins répandues (10%). En se basant sur le profil de ces trois patientes (**EGFR+, ALK-, PD-L1-**) on peut dire que l'existence à la fois d'une mutation d'EGFR, un réarrangement ALK et une expression de PD-L1 est rare.

✓ Statut d'expression de la protéine ALK et PD-L1

La translocation de l'ALK constitue la mutation pilote la moins fréquente chez les patients atteints un cancer bronchique, cela explique son incidence faible dans notre série (7%) (**Tableau VII**), ce qui a été observé dans d'autres travaux tels que (**M-Kenudson et al., 2010**) et (**D Mehdaoui., 2010**). Le patient qui a été signalé d'avoir un score 2 (voir le tableau X) une confirmation de la translocation de l'ALK par la technique FISH est recommandée.

Dans notre série, 44,5% des patients ne présentaient pas une expression de PD-L1, ce résultat est proche de celui trouvé dans d'autres études dont les pourcentages des patients négatifs varient entre 69,2% et 54,4%. (**Yang J et al., 2016**) (**Jin Y et al., 2019**). 22,2% de nos patients ont été enregistrés d'avoir une expression modérée de PD-L1, ce qui concorde avec l'étude de (**Yang J et al., 2016**) qui était 21,1%, alors que 33,3% avaient une expression

forte de PD-L1, ce pourcentage est très élevé par rapport à l'étude de **(Yang J et al., 2016)** qui était 9,7%.

A ce moment, les niveaux d'expression de PD-L1 constituent un outil de décision clinique, l'inhibiteur du point de contrôle immunitaire anti-PD1 **pembrolizumab** a été approuvé par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour le traitement systémique de première intention dans les CBPNPC avancés avec un score de proportion tumorale (TPS)>50% et pour les patients qui ont un profil (*EGFR*-, *ALK*-) et avec un TPS <50% un doublet à base de platine avec ou sans **bévacizumab** .(**Rangachari et al., 2017**)

CONCLUSION

Les cancers du broncho-pulmonaire précisément les non à petites cellules représentent l'un des cancers les plus diagnostiqués et la principale cause de décès dans le monde. Le statut PD-L1 ainsi les mutations pilotes à savoir, celles des gènes EGFR et ALK sont recommandées comme tests de biomarqueurs minimaux nécessaires pour le diagnostic et la prise en charge de ces cancers.

Cette étude nous a permis de déterminer expérimentalement l'implication multifactoriel de ces biomarqueurs moléculaires dans les cancers broncho-pulmonaires, d'autre part de mettre en évidence la performance de certaines techniques de dépistage à savoir l'immunohistochimie pour déterminer l'expression des protéines ALK et PD-L1 et Idylla pour étudier le statut mutationnel du gène EGFR.

L'évaluation du statut mutationnel du gène EGFR par Idylla représente un outil puissant pendant la prise en charge. Cette dernière permet de détecter les variantes de mutations touchant le gène EGFR, qui constituent un moyen prédictif de la sensibilité aux ITK.

L'étude des niveaux d'expression de PD-L1 constitue un outil de prise de décision pour l'utilisation clinique des agents anti PD-1 ou anti PD-L1, aussi pour la thérapie ciblée anti-ALK chez les patients atteints des CBPNPC.

Notre étude a permis d'étudier le profil moléculaire des patients marocains atteints de CBPNPC, mais le nombre des cas recrutés est minime, ainsi une étude plus large est recommandée pour pouvoir effectuer des analyses statistiques, étudier les corrélations entre les différents paramètres pour pouvoir tirer des conclusions.

Références bibliographiques

- ✓ **Antoine, M., Moroch, J., Kebir, F., Georges, M., Ruppert, A. M., Wislez, M., & Cadranel, J.** (2018). Classification histomoléculaire des cancers pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 10(3), 236-247.
- ✓ **Bade, B. C., & Cruz, C. S. D.** (2020). Lung cancer 2020: epidemiology, etiology, and prevention. *Clinics in chest medicine*, 41(1), 1-24.
- ✓ **Barrera-Rodriguez R., Morales-Fuentes J.** Lung cancer in women. *Lung Cancer*. 2012;3:79–89.
- ✓ **Barta, J. A., Powell, C. A., & Wisnivesky, J. P.** (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of global health*, 85(1).
- ✓ **Benowitz NL et al.**, Clinical pharmacology of nicotine: implications for understanding, preventing, and treating tobacco addiction. *Clin Pharmacol Ther.* 2008 Apr; 83(4):531-41.
- ✓ **Borghaei H, Paz-Ares L, Horn L, Spigel DR, Steins M, Ready NE, et al.** Nivolumab versus Docetaxel in Advanced Nonsquamous Non–Small–Cell Lung Cancer. *N Engl J Med.* 22 oct 2017;373(17):1627-39.
- ✓ **Boulland S.** Poster stage hospitalier DFASP2-Adénocarcinome bronchique métastatique présentant un réarrangement d'ALK ou ROS1 : du diagnostic au traitement. Faculté de Pharmacie Marseille; 2019.
- ✓ **Boutayeb S, Zakkouri FZ, Aitelhaj M, Mesmoudi M, Boutayeb A, Boutayeb W, et al.** Bilan des inhibiteurs de protéine tyrosine kinase dans le traitement des cancers. *Pathol Biol.* 1 août 2012; 60(4):229-33.
- ✓ **Brambilla E, Gazdar A.** Pathogenesis of lung cancer signalling pathways: Roadmap for therapies. *Eur. Respir. J.* 2009;33(6):1485–97.
- ✓ **Bustin SA, Benes V, Garson J, Hellemans J, Huggett J, Kubista M et al.** The need for transparency and good practices in the qPCR literature. *Nat Methods* 2013; 10: 1063–1067.
- ✓ **Camidge DR, Doebele RC.** Treating ALK-positive lung cancer — early successes and future challenges. *Nat Rev Clin Oncol* 2012;9:268-77.
- ✓ **Carlson JJ, Garrison LP, Ramsey SD, Veenstra DL.** Epidermal growth factor receptor genomic variation in NSCLC patients receiving tyrosine kinase inhibitor therapy: a systematic review and meta-analysis. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2009 May 9;135 (11):1483–93.
- ✓ **Chen DS, Irving BA, Hodi FS.** Molecular pathways: next-generation immunotherapy-- inhibiting programmed death-ligand 1 and programmed death-1. *Clin Cancer Res.* 2012;18(24):6580–7.

- ✓ **Couraud S, Westeel V., Toffart A.-C, Souquet P.-J. et le comité de rédaction des référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique.** Référentiel sur le cancer bronchique non à petites-cellules : actualisation 2019. ARISTOT.2019. ISBN 978-2-490858-00-2.
- ✓ **Cree Ia, Booton R, Cane P, Gosney J, Ibrahim M, and Kerr K, et al.** PD-L1 testing for lung cancer in the UK: Recognizing the challenges for implementation. *Histopathology* 2016; 69 (2):177-86
- ✓ **Darby SC, Ewertz M, McGale P, et al.** Risk of ischemic heart disease in women after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med.* 2013;368:987-998.
- ✓ **Dela Cruz CS, Tanoue TL, Matthany RA.** Lung Cancer: Epidemiology and Carcinogenesis. In: Shields TW, editor. *General Thoracic Surgery.* 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 2009:1281-98.
- ✓ **Doll R et al.,** Evolution of knowledge of the smoking epidemic. In: Boyle P, Gray N, Henningfield JE, et al. editors. *Tobacco: Science, policy and public health.* 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press, 2010:12.
- ✓ **Dong Y, Zhou Z, Wang J, Ma L, Liu Z, Wang Y, et al.** Origin of the T790M mutation 122 and its impact on the clinical outcomes of patients with lung adenocarcinoma receiving EGFR-TKIs. *Pathol - Res Pract.* 1 mai 2019; 215(5):946-51.
- ✓ **Elidrissi Errahhali M, Elidrissi Errahhali M, Abda N, Bellaoui M** (2016) Exploring Geographic Variability in Cancer Prevalence in Eastern Morocco: A Retrospective Study over Eight Years. *PLoS ONE* 11(3): e0151987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0151987>
- ✓ **Favoni, R.E. and Alama, A.** (2013) Preclinical Strategies Targeted at Non-Small-Cell Lung Cancer Signalling Pathways with Striking Translational Fallout. *Drug Discovery Today*, 18, 11-24.
- ✓ **Frankel, D., Bourlard, D., Garcia, S., Robaglia-Schlupp, A., Peker, E., Groliere, A., & Roll, P.** (2019, June). Mise en évidence du réarrangement d'ALK et ROS1 en immunocytochimie sur liquides de ponction. In *Annales de Pathologie* (Vol. 39, No. 3, pp. 227-236). Elsevier Masson.
- ✓ **Gandhi L, Rodríguez-Abreu D, Gadgeel S, Esteban E, Felip E, De Angelis F, et al.** Pembrolizumab plus chemotherapy in metastatic non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 2018; 378:2078-92.
- ✓ **Garassino MC, Cho BC, Kim JH, Mazières J, Vansteenkiste J, Lena H, et al.** Durvalumab as third-line or later treatment for advanced non-small-cell lung cancer (ATLANTIC): an open-label, single-arm, phase 2 study. *Lancet Oncol* 2018; 19:521-36.
- ✓ **García-Regalado A, González-De la Rosa CH.** The role of anaplastic lymphoma kinase in human cancers. *Oncol. Hematol. Rev.* 9(2), 149–153 (2013).

- ✓ **Giraud P, Lacornerie T, Mornex F.** Radiothérapie des cancers primitifs du poumon. *Cancer Radiother* 2016; 20:147-156
- ✓ **Gonzalez-Hormazabal P, Musleh M, Bustamante M, Stambuk J, Pisano R, Valladares H, Lanzarini E, Chiong H, Rojas J, et al.** Polymorphisms in RAS/RAF/MEK/ERK pathway are associated with gastric cancer. *Genes (Basel)*. (2018) 10:1.
- ✓ **Gridelli C, Rossi A, Carbone DP, Guarize J, Karachaliou N, Mok T, Petrella F, Spaggiari L, Rosell R** (2015) Non-small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers* 2(T3):N1
- ✓ **Hallberg, B., & Palmer, R. H.** (2013). Mechanistic insight into ALK receptor tyrosine kinase in human cancer biology. *Nature Reviews Cancer*, 13(10), 685-700.
- ✓ **Hamard C, Mignard X, Pecuchet N, Mathiot N, Blons H, Laurent-Puig P, Leroy K, Lupo A, Chapron J, Giraud F, et al.** IHC, FISH, CISH, NGS in non-small cell lung cancer: What changes in the biomarker era? *Rev Pneumol Clin*. 2018;74:327–338. doi: 10.1016/j.pneumo.2018.09.013.
- ✓ **Hantraye B, Leroux A, Clere N.** Les inhibiteurs de tyrosine kinase. *Actual Pharm*. 1déc 2015; 54(551):22-7.
- ✓ **He M, Capelletti M, Nafa K, Yun CH, Arcila ME, Miller VA, Ginsberg MS, Zhao B, Kris MG, Eck MJ, Jänne PA, Ladanyi M, Oxnard GR.** «EGFR Exon 19 Insertions: A New Family of Sensitizing EGFR Mutations in Lung Adenocarcinoma >>. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 18 (6): 1790-1797. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2361. (2012).
- ✓ **Horn, L., et Pao, W.** (2009). EML4-ALK: honing in on a new target in non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 27, 4232–4235.
- ✓ **Jin Y, Shen X, Pan Y, Zheng Q, Chen H, Hu H, et al.** Correlation between PD-L1 expression and clinicopathological characteristics of non-small cell lung cancer: A real-world study of a large Chinese cohort. *J Thorac Dis* 2019;11:4591- 601.
- ✓ **König K, Göhlert A, Liehr T, Loncarevic IF.** Riemann I: Two-Photon Multicolor FISH: A Versatile Technique to Detect Specific Sequences with in Single DNA Molecules in Cells and Tissues. *Single Mol*. 2015, 1:41–51
- ✓ **Lissowska J et al.** Family history and lung cancer risk: international multicentre case-control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control*. 2010 Jul; 21(7):1091-104.
- ✓ **National Center for Biotechnology Information (2021).** PubChem Gene Summary for Gene 1956, EGFR - epidermal growth factor receptor (human). Retrieved October 5, 2021
- ✓ **Nguyen LT, Ohashi PS.** Clinical blockade of PD1 and LAG3--potential mechanisms of action. *Nat Rev Immunol* 2015; 15:45-56.

- ✓ **Noria H, Nesrine M, Rachida S et al.** Epidemiology and Risk Factors for Exocrine Pancreatic Cancer in a Northern African Population. *Journal of Gastrointestinal Cancer* pages 126–130 (2015).
- ✓ **Ou S-HI, Bartlett CH, Mino-Kenudson M, Cui J, Iafrate AJ.** Crizotinib for the Treatment of ALK-Rearranged Non-Small Cell Lung Cancer: A Success Story to Usher in the Second Decade of Molecular Targeted Therapy in Oncology. *The Oncologist*. 11 janv 2012; 17(11):1351-75.
- ✓ **Pardoll DM.** The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*.2012; 12(4):252–64.
- ✓ **POITRAS, Elyse et HOUDE, Alain.** La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in biology and biotechnology*, 2002, vol. 2, no 2, p. 2-11.
- ✓ **Porta C, Paglino C, Mosca A.** Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling in cancer. *Front Oncol.* (2014) 4:64. 10.3389/fonc.2014.00064
- ✓ **Ramnath N, Dilling TJ, Harris LJ, Kim AW, Michaud GC, Balekian AA, et al.** Treatment of stage III non-small cell lung cancer: Diagnosis and management of lung cancer, 3rd ed: American College of Chest Physicians evidence-based clinical practice guidelines. *Chest* 2013;143(5 Suppl):e31 45-40.
- ✓ **Rangachari, D., Vanderlaan, P.A., Shea, M., Le, X., Huberman, M.S., Kobayashi, S.S., et al.,** 2017. Correlation between classic driver oncogene mutation in EGFR, ALK or ROS1 and 22C3PD-L1 & 50% expression in lung adenocarcinoma. *J. Thorac. Oncol. off. Publ. Int. Assoc. Study Lung Cancer* 12 (5), 878–883.
- ✓ **Rudin CM, Brambilla E, Faivre-Finn C, Sage J.** Small-cell lung cancer. *Nat Rev Dis Primers*. 2021;7:3.
- ✓ **Schabath, M. B., & Cote, M. L.** (2019). Cancer progress and priorities: lung cancer. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 28(10), 1563-1579.
- ✓ **SCHRELL, Adrian Mark.** Frequency Modulated Fluorescence Detection for Multiplexing on Microfluidic Devices. 2015.
- ✓ **Selinger C.I., Rogers T.M., Russell P.A., O’Toole S., Yip P., Wright G.M., Wainer Z., Horvath L.G., Boyer M., McCaughan B., et al.** Testing for ALK rearrangement in lung adenocarcinoma: A multicenter comparison of immunohistochemistry and fluorescent in situ hybridization. *Mod. Pathol.* 2013;26:1545–1553. doi: 10.1038/modpathol.2013.87.
- ✓ **Soda M, Choi YL, Enomoto M, Takada S, Yamashita Y, Ishikawa S, et al.** Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature* 2007; 448 (7153):561–6
- ✓ **Sun Y, Ren Y, Fang Z, Li C, Fang R, Gao B, Han X, Tian W, Pao W, Chen H, H. J.** Lung adenocarcinoma from East Asian never-smokers is a disease largely defined by targetable oncogenic

mutant kinases. Clin Oncol. 2010 Oct 20; 28(30):4616-20. doi: 10.1200/JCO.2010.29.6038. Epub 20Sep (2010).

- ✓ **Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al.** Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA Cancer J Clin. 2021.
- ✓ **Tanner, N.T., et al.** The role of molecular analyses in the era of personalized therapy for advanced NSCLC. Lung Cancer, 2011. 76(2): p. 131-7.
- ✓ **Taylor SC, Mrkusich EM** (2014) The state of RT-quantitative PCR: firsthand observations of implementation of minimum information for the publication of quantitative real-time PCR experiments (MIQE). J Mol Microbiol Biotechnol 24(1):46–52
- ✓ **Topalian SL, Drake CG, Pardoll DM.** Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity. Curr Opin Immunol 2012; 24:207-12.
- ✓ **Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG.** Introduction to the 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. J Thorac Oncol. sept 2015;10(9):1240-2.
- ✓ **Tse C, Capeau J.** [Real-time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. Ann Biol Clin 2003;61: 279-93.
- ✓ **Witherden IR, Tetley TD.** Isolation and Culture of Human Alveolar Type II Pneumocytes. *Methods Mol. Med.* 2001;56:137–146. doi: 10.1385/1-59259-151-5:137.
- ✓ **Yang J, Chen J, Wei J, Liu X, Cho WC.** Immune checkpoint blockade as a potential therapeutic target in non-small cell lung cancer. Expert Opin Biol Ther 2016;16: 1209-23.
- ✓ [human respiratory system | Description, Parts, Function, & Facts | Britannica \(05/21\)](#)
- ✓ [Scoring des cancers gastriques GEJ pour l'expression de PD-L1 - CAP TODAY \(captodayonline.com\) \(06/21\)](#)
- ✓ [Idylla EGFR Mutation Test | Biocartis \(07/21\)](#)

Annexe 1

Types et sous-types histologiques	Code ICDO
TUMEURS EPITHELIALES	
Adénocarcinome	8140/3
Adénocarcinome lépidoïde†	8250/3
Adénocarcinome acinaire	8551/3
Adénocarcinome papillaire	8260/3
Adénocarcinome micro papillaire †	8265/3
Adénocarcinome solide	8230/3
Adénocarcinome Invasif Mucineux†	8253/3
Adénocarcinome invasif mixte mucineux	
Adénocarcinome invasif mixte non-mucineux	8254/3
Adénocarcinome colloïde	8480/3
Adénocarcinome fœtal	8333/3
Adénocarcinome entérique†	8144/3
Adénocarcinome avec invasion minime†	
Non-mucineux	8250/2
Mucineux	8257/3
Lésions pré-invasives	
Hyperplasie adénomateuse atypique	8250/0
Adénocarcinome <i>in situ</i> †	
Non mucineux	8410/2
Mucineux	8253/2
Carcinome malpighien (ou épidermoïde)	8070/3
Carcinome malpighien kératinisant†	8071/3
Carcinome malpighien non kératinisant†	8072/3
Carcinome malpighien basaloïde †	8083/3
Lésion pré-invasive	
Carcinome malpighien <i>in situ</i>	8070/2
Tumeurs neuroendocrines	
Carcinome à petites cellules	8041/3
Carcinome à petites cellules composite	8045/3
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules	8013/3
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite	8013/3
Tumeurs carcinoïdes	
Tumeur carcinoïde typique	8240/3
Tumeur carcinoïde atypique	8249/3
Lésion pré-invasive	
Hyperplasie neuroendocrine diffuse pulmonaire idiopathique	8040/0
Carcinome à grandes cellules	8012/3
Carcinomes adénoquameux	8560/3
Carcinomes sarcomatoïdes	
Carcinome pléomorphe	8022/3
Carcinome à cellules fusiformes	8032/3
Carcinome à cellules géantes	8031/3
Carcinosarcome	8980/3
Blastome pulmonaire	8972/3
Autres carcinomes et carcinomes inclassés	
Carcinome "Lymphoepithelioma-like"	8082/3
Carcinome avec réarrangement NUT †	8023/3

Tumeurs de type glandes salivaires	
Carcinome mucoépidermoïde	8430/3
Carcinome adénoïde kystique	8200/3
Carcinome épithélial-myoépithélial	8562/3
Adénome pléomorphe	8940/0
Papillomes	
Papillome malpighien	8052/0
Exophytique	8052/0
Inversé	8053/0
Papillome glandulaire	8260/0
Papillome mixte malpighien et glandulaire	8560/0
Adénomes	
Pneumocytome séroissant†	88320
Adénome alvéolaire	8251/0
Adénome papillaire	8260/0
Cystadénome mucineux	8470/0
Adénome des glandes muqueuses	8480/0
Tumeurs mésenchymateuses	
Hamartome pulmonaire	8992/0
Chondrome	9220/0
PEComes†	
Lymphangioliomyomatose	9174/1
PECome bénin†	8714/0
Clear cell tumor	8005/0
PECome malin†	8714/3
Tumeur myofibroblastique congénitale péri bronchique	8827/1
Lymphangiomatose diffuse pulmonaire	
Tumeur myofibroblastique inflammatoire	8825/1
Hémangioendothéliome épithélioïde	9133/3
Blastome pleuropulmonaire	8973/3
Synovialo-sarcome	9040/3
Sarcome intimal de l'artère pulmonaire	9137/3
Sarcome myxoïde pulmonaire avec translocation EWSR1-CREB1†	8842/3
Tumeurs myoépithéliales†	
Myoépithéliome	8982/0
Carcinome myoépithélial	8982/3
Tumeurs lymphohistiocytiques	
Lymphome extra-ganglionnaire de la zone marginale du MALT	9699/3
Lymphome diffus à grandes cellules	9680/3
Granulomatose lymphomatoïde	9766/1
Lymphome intravasculaire diffus à grandes cellules†	9712/3
Histiocytose pulmonaire Langerhansienne	9751/1
Maladie d'Erdheim-Chester	9750/1
Tumeurs d'origine ectopique	
Tumeurs germinales	
Tératome, mature	9080/0
Tératome, immature	9080/1
Thymome intrapulmonaire	8580/3
Mélanome	8270/3
Méningiome, NOS	9530

*ANNEXE 1 : classification anatomo-pathologie des cancers broncho-pulmonaire (Travis
WD et al, 2015)*