



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



Année 2022

N°: MM252022

MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »

OPTION: « Biomédicale »

Intitulé:

**Mise en place de la technique FISH au sein de
laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn
Sina de Rabat dans la détection de l'amplification du
gène HER2 chez les patientes atteintes du cancer de sein**

Soutenu par :

ER-REGRAGUI Asma

Le 20 Octobre 2022

Devant le jury, composé de :

Pr. LOUATI Sara, Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat, **Présidente**

Dr. EL KHAZRAJI Abdelhak, Hôpital militaire Mohammed V, **Encadrant**

Pr. BERNOUSSI Zakia, faculté de médecine et de pharmacie de Rabat, **Co- encadrante**

Pr. ZAHID Hafid, Hôpital militaire Mohammed V, **Examineur**

Dédicace

A mes parents

Je vous dédie ce travail, qui n'est en réalité que le fruit de vos encouragements et l'aboutissement de vos grands sacrifices.

Vous avez su le long de mon parcours m'épauler, me guider et vous n'avez pas cessé un seul instant d'attirer le feu de ma volonté.

A mes chers frères et sœurs

Pour leur affection et leur encouragement

A toute ma famille

A tous mes amis

A tous ceux qui me sont chers et que j'ai omis de citer.

A tous ceux qui de près ou de loin m'ont apporté leur aide.

Remerciement

Tout d'abord, Louange à Dieu le tout puissant qui m'a donné la force et la volonté d'achever ce travail.

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

*Ce travail n'aurait pas été rendu possible sans l'encadrement de **Docteur ELKHAZRAJI Abdelhak**, je vous remercie infiniment pour votre confiance et votre implication dans ce projet. En travaillant avec vous, j'ai pu bénéficier de votre rigueur scientifique et de vos nombreux conseils qui ont été des éléments clés dans la réussite de ce projet. Votre disponibilité malgré vos grandes occupations, votre gentillesse. Merci à vous pour tout.*

*Je remercie le **Professeur ELBERNOUSSI Zakia**, chef de service du laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat, de m'avoir accueilli et de m'encadrer au sein de son laboratoire durant ce travail. Je tiens également à la remercier sincèrement pour tous ses conseils précieux qui ont été un vrai moteur tout au long de ce travail.*

*Je remercie sincèrement le **docteur HAJJAMI Kaoutar**, pour son grand cœur, sa gentillesse, son soutien et son aide tout au long de ce travail malgré ses grandes occupations, ainsi que tous les membres de jurys.*

*Je remercie sincèrement le **Professeur LOUATI Sara** pour sa gentillesse et d'avoir accepté de présider le jury de soutenance. Et le **Professeur ZAHID Hafid** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail malgré ses grandes occupations.*

Résumé

Titre:Mise en place de la technique FISH au sein de laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat dans la détection de l'amplification du gène HER2 chez les patientes atteintes du cancer de sein.

Auteur:ER-REGRAGUI Asma

Mot clés:FISH, HER2, la cytogénétique moléculaire, cancer de sein, immunohistochimie.

Introduction/objectif:la FISH est une technique de la cytogénétique moléculaire. L'objectif de ce travail est de rapporter l'apport de la FISH dans le pronostic du cancer du sein et la mise en place de la FISH au LACP de l'hôpital Ibn Sina de Rabat, à partir de l'étude de l'amplification du gène HER2 chez les patientes atteintes de cancer de sein.

Matériels et méthodes:en se basant sur le manuel du kit HER2 IQFISH pharmDx et les matériels de laboratoire, la FISH a été réalisé au sein de LACP à partir des étapes suivantes : préparation des lames, déparaffinage et réhydratation, le prétraitement à la chaleur, la digestion enzymatique avec la pepsine, dénaturation et hybridation, lavage stringent, montage et lecture à l'aide d'un microscope à épifluorescence.

Résultats et discussion:la présente étude a été réalisée sur 32 cas de cancer de sein: 12 cas du LACP de l'hôpital Ibn Sina à Rabat qui ont été positives avec l'IHC, Et 20 cas d'autres laboratoires externes d'anatomopathologie ont été préalablement testés par la FISH. Les résultats obtenus montre la présence d'une corrélation variable entre les résultats de la mise en place réalisés au laboratoire et ceux de l'immunohistochimie (60% et 100% respectivement pour le score 2+ et le score 3+), ainsi une concordance de 100% entre les résultats obtenus par la FISH au laboratoire et ceux des laboratoires externes.

Conclusion:l'amplification de gène HER2 sur les coupes analysées ainsi que la forte corrélation des résultats confirme, que la FISH a été bien mise en place au LACP Ibn Sina à Rabat. L'étape de la validation devient nécessaire.

Summary

Title:Implementation of the FISH technique in the laboratory of anatomy and cytopathology of the Ibn Sina hospital in Rabat in the detection of HER2 gene amplification in breast cancer patients.

Author:ER-REGRAGUI Asma

Key words:FISH, HER2, molecular cytogenetics, breast cancer, immunohistochemistry.

Introduction/objective:FISH is a technique of molecular cytogenetics. The objective of this work is to report the contribution of FISH in the prognosis of breast cancer and the implementation of FISH at the LACP of Ibn Sina Hospital in Rabat, from the study of HER2 gene amplification in patients with breast cancer.

Materials and methods:Based on the HER2 IQFISH pharmDx kit manual and laboratory materials, FISH was performed at LACP using the following steps: slide preparation, dewaxing and rehydration, heat pretreatment, enzymatic digestion with pepsin, denaturation and hybridization, stringent washing, and finally slide mounting and reading with an epifluorescence microscope.

Results and discussion:The present study was performed on 32 cases of breast cancer: 12 cases from the LACP of Ibn Sina Hospital in Rabat that were positive with IHC, And 20 cases from other external anatomopathology laboratories were previously tested by FISH. The results obtained show the presence of a variable correlation between the results of the setting performed in the laboratory and those of the immunohistochemistry (60% and 100% respectively for the score 2+ and the score 3+), as well as a concordance of 100% between the results obtained by FISH in the laboratory and those of the external laboratories.

Conclusion:The HER2 gene amplification on the analyzed sections as well as the strong correlation of the results confirms that FISH has been well implemented at LACP Ibn Sina in Rabat. The validation step is now necessary.

ملخص

العنوان: تطبيق تقنية FISH في مختبر التشريح السيتوباثولوجي في مستشفى ابن سينا في الرباط للكشف عن تضخيم جين HER2 في مرضى سرطان الثدي.

المؤلف: الركاكي أسماء

الكلمات الرئيسية: FISH، HER2، علم الوراثة الخلوية الجزيئي، سرطان الثدي، الكيمياء الهيستولوجية المناعية.

مقدمة/هدف: FISH هي تقنية وراثية خلوية جزيئية. الهدف من هذا العمل هو الإبلاغ عن مساهمة FISH في تشخيص سرطان الثدي وإنشاء FISH في LACP في مستشفى ابن سينا في الرباط، بناءً على دراسة تضخيم الجينات HER2 في المرضى الذين يعانون من سرطان الثدي..

المواد والأساليب: استناداً إلى دليل ومواد مخبرية لمجموعة فارم HER2 IQFISH FharmDx، تم تنفيذ FISH في LACP من الخطوات التالية: تحضير الشفرات، ونزع المياه والإماهة، والمعالجة المسبقة للحرارة، والهضم الإنزيمي بالبيبين، والتطهير والتجهين،

النتائج والمناقشة: أجريت هذه الدراسة على 32 حالة إصابة بسرطان الثدي:

12 حالة من LACP من مستشفى ابن سينا في الرباط كانت إيجابية مع IHC، و20 حالة من مختبرات علم التشريح الخارجية الأخرى تم اختبارها سابقاً بواسطة FISH.

تظهر النتائج التي تم الحصول عليها وجود علاقة متغيرة بين نتائج وضع المختبر ونتائج الكيمياء الهيستولوجية المناعية (60% و100% على التوالي للنتيجة +2 و+3)، وبالتالي اتفاق 100% بين النتائج التي حصل عليها FISH في المختبر ونتائج المختبرات الخارجية.

الاستنتاج: يؤكد تضخيم جين HER2 في الأقسام التي تم تحليلها وكذلك الارتباط القوي للنتائج أن FISH تم تنفيذه بشكل جيد في LACP ابن سينا في الرباط. تصبح خطوة التحقق ضرورية.

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique
AR	L'amphiréguline
ARN	Acide Ribonucléique
ATP	Adénosine Tri-Phosphate
BAC	Bacterial Artificial Chromosome
BTC	Bêta-Celluline
CEN-17	Centromère De Chromosome 17
CISH	Hybridation In Situ Chromogénique
DAG	Diacylglycerol
DAPI	Diamidino Phénylindole
DAPI	4',6-Diamidino-2-Phénylindole
EGF	L'epidermal Growth Factor
EGFR	Epedermal Growth Factor Receptor
EPR	L'épiréguline
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase
FAK:	Focal Adhesion Kinase
FGFR	Facteurs De Croissance Des Fibroblastes
FISH	Hybridation In Situ Fluorescence
FITC	Fluorescein Isothiocyanate
GSK3β	Glycogen Synthase Kinase 3 β
HB-EGF	L'heparin-Binding Epidermal Growth Factor
HE	Hématoxyline Éosine
HER2	Human Epedermal Growth Factor Receptor
HGC	L'hybridation Génomique Comparative
ICH	The International Conférence On Harmonisation
IHC	Immunohistochimie
IMC	L'index De Masse Corporelle

IR	Récepteur A L'insuline
Kda	Kilodalton
L'IP3	Inositol-1.4.5-Triphosphate
LACP	Laboratoire D'anatomie Cytopathologie
LD	Limites De Détection
LQ	Limite De Quantification
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MES	(Acide 2-[N-Morpholino]Éthanesulphonique)
MGG	May-Grünwald Giemsa
MI :	Milliliter
NRG	Neuréguline
PAC	Phage Artificial Chromosome
Pbs	Phosphate-Buffered Saline
PDGFR	Récepteurs Aux Facteurs De Croissance Dérivée Des Plaquettes
Ph	Potentiel Hydrogène
pip2	Phosphatidylinositol Bisphosphate
PKC	Protein Kinase C
PNA	Acide Peptidique
RAF	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma Nucléique
RTK	Récepteur Tyrosine Kinase
RTK	Récepteurs Tyrosine Kinase
SSC	Solution Saline/Citrate De Sodium
STAT	Signal Transducers And Activators Of Transcription
TGF-α	Transforming Growth Factor A
TK	Tyrosine Kinase
Tris HCL	Tris Hydrochloride
VEGFR	Les Récepteurs Aux Facteurs De Croissance De L'endothélium Vasculaire
μg/L	Microgramme/Litre

Listes de figures

Figure 1: Principe général de l'immunohistochimie	6
Figure 2: Principe de la CGH classique	8
Figure 3: Principe de la CGH-array	9
Figure 4: Principe de l'hybridation in situ en florescence	12
Figure 5: Localisation du gène HER2 sur le chromosome 17 et observation du HER2 et CEN-17 par microscope à épifluorescence à l'aide de sonde fluorescente	19
Figure 6: Les différents type de de RTKs (récepteur tyrosine kinase).....	21
Figure 7: Organisation des domaines des récepteurs	22
Figure 8: Structure du récepteur HER	23
Figure 9: Description des mutations activatrices de HER2	24
Figure 10: Les voies de signalisation activées par HER2	28
Figure 11: Hybridizer	31
Figure 12: Microscope à fluorescence.....	32
Figure 13: Etuve de laboratoire	32
Figure 14: Agitateur vortex	33
Figure 15: Bain marie	33
Figure 16: Le kit de HER2 IQFISH pharmDx	34
Figure 17: L'étape du déparaffinage et la déshydratation	36
Figure 18 : Etape de prétraitement des lames dans le bain marie	38
Figure 19: Placement des lames dans la solution de prétraitement	38
Figure 20: Rinçage avec le tampon de lavage (wash buffer).	39
Figure 21: Etape d'application de la pepsine et incubation à l'hybridizer	39
Figure 22: Déshydratation dans une série de bain d'alcool et à l'air libre	40
Figure 23: Etape d'agitation de la sonde par un agitateur Vortex	41
Figure 24 : Etape de la déposition de la sonde puis la lamelle et l'étanchéisant	41
Figure 25: Position des lames et lancement de l'hybridizer.	41
Figure 26 : Images vues au microscope à épi fluorescence montrant l'amplification du gène HER2	46

Figure 27: Amplification du gène HER2 détectée par FISH (signaux rouges : HER2 ; signaux verts : centromères du chromosome 17). B : absence de l'amplification du gène HER2	50
Figure 28: L'hôte et les matériels de la macroscopie.....	66
Figure 29: Appareil de circulation	67
Figure 30: Appareil de l'enrobage	68
Figure 31: Blocks de paraffine prêts pour la coupe	68
Figure 32: Les moules d'enrobage.....	68
Figure 33: Microtome automatique.....	69
Figure 34: Appareil contenant les bains de coloration HE.....	70
Figure 35: Appareil de l'immunohistochimie.....	72

Liste des tableaux

Tableau 1: Bases génétiques et biologiques des 2 types de mutations activatrices	24
Tableau 2: Récapitulatif des différents ligands des récepteurs HER	25
Tableau 3: Les fluorochromes utilisés dans la lecture des lames	43
Tableau 4: Résultats de la FISH des cas de LACP et leurs corrélation avec les résultats de l'IHC.....	47
Tableau 5: Comparaison entre les résultats de la mise en place et les résultats du laboratoire externe effectué par la FISH	51
Tableau 6: Guide de décompte des signaux	73
Tableau 7: Les flacons de kit IQFISH pharmDx.....	74

Table des matières

Introduction	1
Première partie : Revue Bibliographique	3
I. Le cancer de sein	4
1. Définition et épidémiologie	4
II. Techniques de diagnostic	5
1. Examen histologique	5
2. L'immunohistochimie (IHC).....	5
2.1. Définition	5
2.2. Principe	5
3. La cytogénétique.....	6
4. Techniques de la cytogénétique moléculaire	7
4.1. Hybridation génomique comparative (CGH).....	7
4.2. Hybridation in situ fluorescence (FISH).....	10
III. Les différents biomarqueurs de cancer de sein	18
IV. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)	19
1. Implication de l'HER2 dans le cancer de sein	19
1.1. Le gène HER2.....	19
1.2. Les récepteurs HER :.....	21
Deuxième partie : Matériels et méthodes	30
I. Type, période et lieux de l'étude	31
II. Matériel	31
1. Échantillon	31
2. Les appareils utilisés	31
A. L'hybridizer.....	31
B. Microscope à fluorescence.....	31
C. Etuve :	32
D. Agitateur vortex	33
E. Autres matériels	33
3. Les réactifs utilisés	34
III. METHODE	35
1. Procédure de la technique FISH	35

1.1. Préparation des lames.....	35
1.2. Préparation des réactifs.....	35
2. Le protocole expérimental de la technique FISH.....	36
2.1. Déparaffinage et réhydratation	36
2.2. Le prétraitement à la chaleur	37
2.3. La digestion enzymatique avec la pepsine	39
2.4. Dénaturation et hybridation	39
2.5. Lavage stringent.....	42
2.6. Montage des lames	42
2.7. La Lecture.....	42
Troisième partie : Résultats et discussion.....	44
Conclusion.....	53
Références bibliographiques	54
Annexes	64
Annexe 1 : Présentation de cadre de travail	64
Annexe 2 : Guide de décompte des signaux	73
Annexe 3 : les flacons de kit IQFISH pharmDx	74

Introduction

Le cancer du sein chez la femme est un enjeu majeur de santé publique, il représente d'une part la cause la plus fréquente de décès par cancer et d'autre part le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans le monde [1].

L'amplification de certains oncogènes notamment le récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (HER2) est associée à un mauvais pronostic de la maladie.

HER-2 est un proto-oncogène localisé sur le chromosome 17 (17q21- q22) d'une taille de 35,109 à 35,138 Mb [2], codant pour un récepteur transmembranaire tyrosine kinase appartenant à la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) [3].

Les divers remaniements génétiques induisent sur ce gène une mécanistique d'amplification provoquant ainsi une augmentation des activités de prolifération et des capacités de croissance des cellules tumorales.

la stratégie thérapeutique s'est améliorée grâce à l'utilisation des traitements adjuvants qui ont permis de réduire au maximum le risque de récives et le taux de mortalité [4].

Plus récemment et grâce à une thérapie ciblée anti-HER2, le pronostic des patientes atteintes d'un cancer HER2 amplifié s'est considérablement amélioré. Cette possibilité thérapeutique nécessitait donc une détermination précise du statut HER2 des carcinomes mammaires au diagnostic

Des examens spécifiques sont pratiqué en aval du test histologique sur tous les cas de cancer du sein invasif notamment l'examen d'immunohistochimie et la technique d'hybridation fluorescente in situ (FISH). [5].

L'immunohistochimie a pour objet de préciser le statut des récepteurs hormonaux et d'évaluer la surexpression de la protéine HER2, alors que la technique FISH est considérée comme la technique de référence dans la détection de l'amplification de l'oncogène [6]

En terme d'assurance qualité les recommandations internationales relative à l'utilisation de ces deux techniques exige que l'immunohistochimie doit être calibrée sur l'amplification du gène par la technique FISH avec une concordance de plus de 95 % entre les 2 approches.

Ainsi le laboratoire doit pouvoir prouver les résultats de sa calibration et son adhésion à des organismes de contrôle de qualité [7].

Après des années d'attente, le laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat vient finalement de mettre en place la technique FISH, qui est jusqu'à présent en cours d'optimisation de la technique et de validation des méthodes.

Le présent travail a pour objectifs dans un premier temps de rapporter l'apport de la FISH dans le diagnostic et le pronostic du cancer du sein, et dans un deuxième temps d'expliquer le work flow de la mise en place de la technique FISH appliquée sur la détection de l'amplification de l'oncogène HER2 au sein de laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat.

Première partie :
Revue
Bibliographique

I. Le cancer de sein

1. Définition et épidémiologie

Le cancer du sein est une tumeur maligne qui se développe au niveau de la glande mammaire, il constitue une préoccupation majeure de santé publique en raison de l'augmentation de son incidence. Les taux d'incidence ajustés pour l'âge varient, selon les régions du monde [8]. Dans tous les pays du monde, quel que soit leur état de développement économique, Le cancer du sein est le site de cancer le plus courant chez les femmes et la principale cause de décès par cancer chez les femmes dans presque tous les pays [1]. Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), il y a 19 292 789 nouveaux cas de cancer dans le monde en 2020, soit 11,4% de cancer du sein, en 2020, on a recensé 2,3 millions de femmes atteintes du cancer du sein et 685 000 en meurent dans le monde. Fin 2020, 7,8 millions de femmes en vie s'étaient vues diagnostiquer un cancer du sein au cours des cinq années passées, c'est en Afrique et en Polynésie que l'on observe le taux le plus élevé de mortalité par ce cancer, en Afrique subsaharienne, la moitié des femmes qui décèdent du cancer du sein ont moins de 50 ans [9].

Selon une étude les différents facteurs de risque sont les suivants [10] :

- L'âge de la femme au moment du diagnostic de la lésion initiale.
- L'index de masse corporelle (IMC).
- Le tabagisme.
- L'âge des premières règles.
- La prise de contraception orale supérieure à six mois.
- L'âge de la première grossesse.
- Le nombre de grossesses au-delà de 28 SA.
- L'allaitement et nombre d'enfants allaités supérieur à trois mois.
- L'âge de la ménopause.
- La prise d'un traitement hormonal substitutif supérieure à trois ans.
- Les antécédents familiaux au premier ou deuxième degré.

II. Techniques de diagnostic

1. Examen histologique

L'examen histologique c'est le plus connu dans les laboratoires d'anatomopathologie s'effectue sur des prélèvements reçus et fixés (en général au formol), inclus en paraffine et colorés par des colorations standards, tel l'hématéine-éosine ou des colorations spécialisées pourront dans certains cas être utilisées en complément, par exemple, la réticuline (**l'annexe 1**) afin d'analyser les caractéristiques cellulaires des tissus à l'aide d'un microscope.

2. L'immunohistochimie (IHC)

2.1. Définition

L'immunohistochimie (IHC) est une technique rapide et peu coûteuse qui peut être réalisée sur une partie de la pièce tumorale après biopsie. Cette technique présente comme inconvénient d'être opérateur dépendant. Malgré les contrôles externes, la reproductibilité est faible. Il existe également des problèmes de standardisation du fait que de nombreux anticorps sont disponibles sur le marché avec différents protocoles, en particulier en ce qui concerne la fixation de l'échantillon. L'expression du résultat est semi-quantitative. Seule une surexpression classée +++, bénéficierait d'une thérapie ciblée. [11]

2.2. Principe

L'immunohistochimie est une méthode phénotypique permettant la localisation des antigènes dans les tissus ou les cellules, par des anticorps (immunoglobulines) dirigés de façon spécifique contre ces antigènes (**figure 1**), et rendus visibles au microscope par conjugaison avec des fluorochromes ou des enzymes donnant un signal coloré.

Un antigène peut être défini comme toute substance qui peut induire une réponse immunitaire spécifique, et il possède plusieurs épitopes (déterminants antigéniques). Les anticorps sont produits par des lymphocytes qui deviennent des plasmocytes en stockant les immunoglobulines, qu'ils peuvent excréter. Les anticorps se lient spécifiquement aux antigènes qui ont déclenché leur production par les lymphocytes. [12]

- 1= Antigène
- 2= Anticorps primaire
- 3= Anticorps secondaire couplé au complexe avidine-biotine peroxydase
- 4= Révélation par substrat de la peroxydase

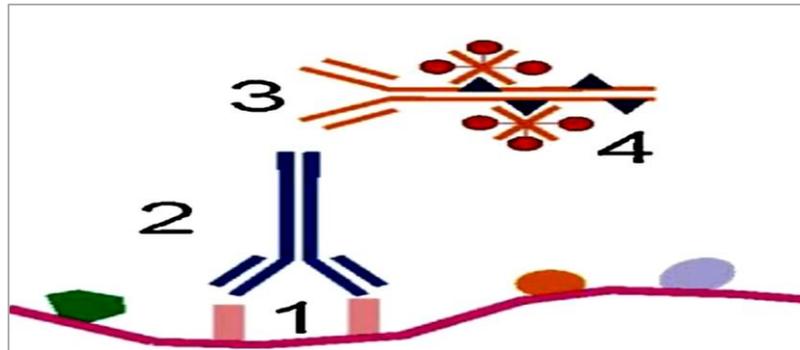


Figure 1: Principe général de l'immunohistochimie.[13]

Le schéma au-dessus présente l'antigène (1) est reconnu par l'anticorps primaire (2), lui-même reconnu par l'anticorps secondaire (3) conjugué à un fluorochrome. Ce fluorochrome (complexe avidine-biotine-peroxydase) est présenté par un substrat de peroxydase (4). [14]

3. La cytogénétique

La cytogénétique est la science qui a pour objet l'étude et la détection de la physiopathologie chromosomiques constitutionnelles ou acquises, grâce à des techniques chromosomiques microscopiques ou moléculaires, visant à étudier le rangement des gènes au niveau des chromosomes, quantifier le nombre de copies des gènes et rechercher la présence de gènes de fusion afin d'établir un diagnostic biologique et d'assurer un conseil génétique [15]. La cytogénétique a un intérêt diagnostique, pronostique, voire même thérapeutique. [16]

4. Techniques de la cytogénétique moléculaire

4.1. Hybridation génomique comparative (CGH)

4.1.1. Historique

En 1992, l'équipe de Dan Pinkel mit au point une nouvelle technique de cytogénétique nommée hybridation génomique comparative (CGH). Le principe est de comparer le nombre de molécules d'une même quantité d'ADN de deux individus en les marquant chacune par un fluorochrome différent puis en les hybridant ensemble sur des métaphases d'un témoin. Après l'étape d'hybridation, les signaux générés par les deux fluorochromes sont numérisés [17].

Vers la fin des années 1990, Solinas-Toldo et Pinkel et al proposent une autre technique de CGH sur des lames sur lesquelles sont fixés des fragments d'ADN. Il s'agit de la CGH sur réseau d'ADN ou CGH array [18] [19].

4.1.2. Définition et technique

L'hybridation génomique comparative (HGC) est une technique développée récemment qui permet, en une seule analyse, la détection d'aberrations génétiques pour la totalité du génome de la tumeur sans nécessiter de culture cellulaire.

La méthode d'hybridation génomique comparative permet de comparer le génome du patient à un génome de référence, afin d'identifier les différences entre les deux génomes. Premièrement, l'ADN de la tumeur est marqué avec un fluorochrome vert, et l'ADN de référence normal est marqué avec un fluorochrome rouge, ensuite, ces deux ADN marqués sont mélangés et hybridés à des préparations de métaphases humaines normales. Les ADN marqués en rouge et en vert rentrent en compétition pour s'hybrider à ces chromosomes [20]. Il existe deux types de CGH : CGH classique et CGH array.

- **CGH classique**

Son principe consiste à cohybrider en compétition une même quantité d'ADN d'un patient, marqué par un fluorochrome (par exemple la fluorescéine émettant dans le vert) et d'un témoin contrôle, marqué par un autre fluorochrome (par exemple la rhodamine émettant dans le rouge), **Figure 2** sur une cible. Dans la CGH classique, la cible est constituée par les chromosomes d'un sujet normal. Après lavage et coloration au DAPI (4',6-diamidino-2-

phénylindole : molécule fluorescente), pour générer des bandes qui permette l'identification des chromosomes, les préparations seront analysées sur un système d'imagerie microscopique numérisée, capable de mesurer tout le long des chromosomes, le rapport entre les fluorescences verte et rouge compris entre 0,80 et 1,2 est considéré comme normal alors qu'un rapport sortant de ces limites indique soit un gain soit une perte selon le sens de la déviation.[21] [22]

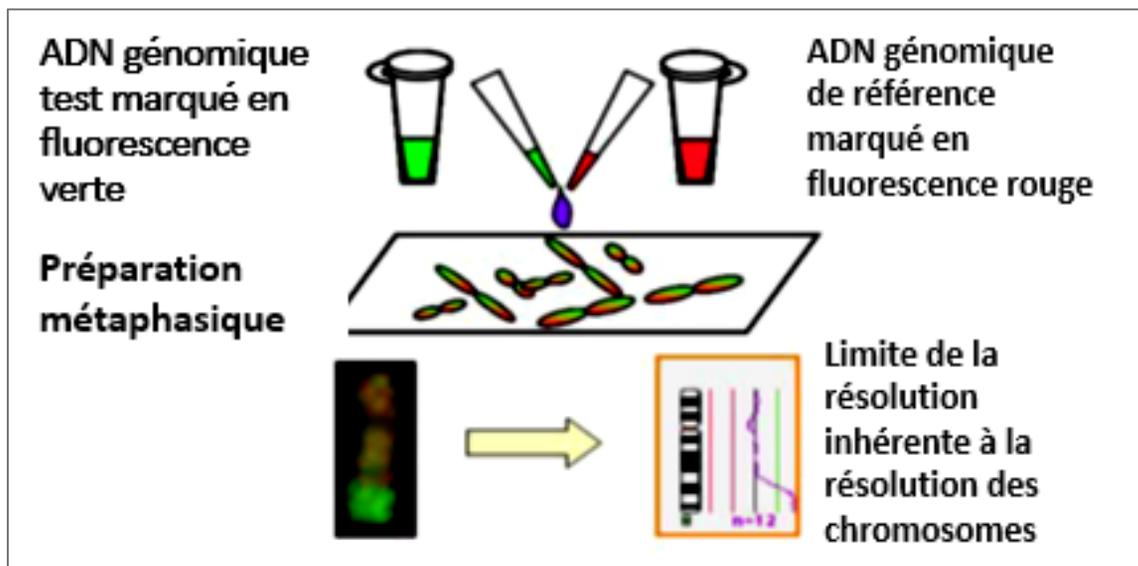


Figure 2: Principe de la CGH classique [23]

- **CGH array**

La CGH-array repose sur le même principe que la CGH classique, la différence c'est que l'hybridation n'a plus lieu sur des métaphases mais sur des séquences connues, fixé sur une lame de verre (appelé puce) [23] . Elle nécessite essentiellement trois composants : un support, des lames de verre, des sondes (fixées sur la lame) et des cibles. Les sondes sont ici constituées de fragments d'ADN génomique déposés sous forme de micro-réseaux sur un support. Ces fragments d'ADN génomique humain peuvent être de grande taille (50 à 200 Kb) portés par des vecteurs (BAC [Bacterial Artificial Chromosome], PAC [Phage Artificial Chromosome], fosmides ou cosmides) ou des oligonucléotides de petite taille. Après hybridation, la fluorescence est capturée à l'aide d'un scanner laser. Contrairement à la CGH

classique sur chromosomes, le rapport de fluorescence n'est plus calculé selon l'axe de chromosomes mais au niveau de chaque dépôt correspondant au fragment d'ADN fixé. Un logiciel permet de calculer les rapports de fluorescence entre les deux ADN, et représente les résultats sous forme graphique [24] [21] **Figure 3**.

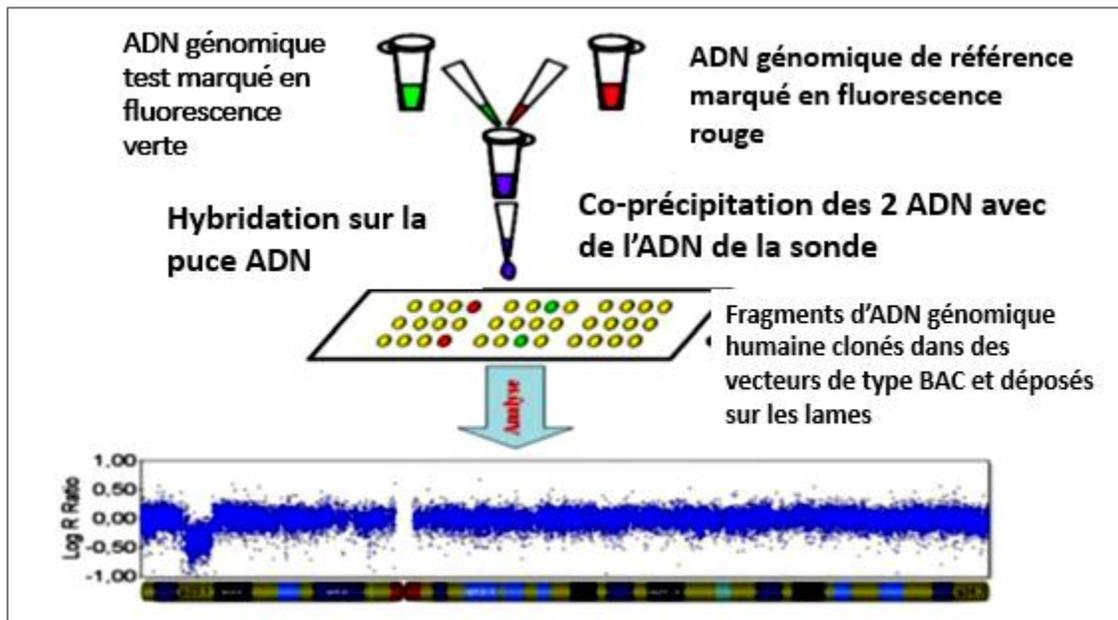


Figure 3: Principe de la CGH-array [23]

4.1.3. Interprétation

L'analyse d'image digitale est réalisée à l'aide d'une microscopie fluorescente, le ratio de fluorescence verte sur rouge est calculé pour chaque chromosome, ce ratio est une mesure de la sous- ou sur-représentation de matériel génétique pour cette région de la tumeur étudiée, Le ratio d'intensité des deux fluorochromes au niveau d'une bande aura une valeur théorique proche de 1 si le nombre de molécules des deux génomes est identique au niveau de la bande observée. En cas de délétion, ce rapport théorique sera de 0,5 et de 1,5 en cas de trisomie [25] [20].

4.1.4. Limites

L'hybridation génomique comparative HGC a plusieurs limites par exemple elle ne peut pas détecter des translocations chromosomiques équilibrées, qui sont fréquemment retrouvées dans des tumeurs hématologiques et mésoenchymateuses et un bien moindre degré dans des tumeurs solides également. Le criblage de ces anomalies ne peut être réalisé que par caryotypage après culture des cellules tumorales. De plus, les délétions sub-microscopiques ne seront pas apparentes en HGC [20].

4.2. Hybridation in situ fluorescence (FISH)

4.2.1. Historique

Les premières techniques d'hybridation in situ sur chromosomes datent de 1969 lorsque *Gall* et *Pardue* ont utilisé un ARN ribosomique radioactif dans le but de détecter la présence de gènes d'ADN ribosomique sur des chromosomes d'amphibiens [26]. Plus tard, *Saunders*, en 1972 [27] et *Jones* en 1973 [28] ont utilisé des sondes radioactives complémentaires de l'ADN satellite afin d'hybrider les régions centromériques des chromosomes métaphasiques. L'hybridation in situ sur chromosomes d'une séquence d'ADN non répétée et radioactive a été réalisée, pour la première fois par *Harper* et *Saunders* [29] ainsi que par *Gerhard* en 1981 [30], grâce à l'adjonction d'une macromolécule (le sulfate de dextran) dans le milieu d'hybridation. L'hybridation in situ s'est ensuite développée grâce au clonage de l'ADN à l'aide de vecteurs plasmidiques qui a permis de produire de grandes quantités d'ADN et des sondes de meilleure qualité [31].

Le véritable essor de la cytogénétique moléculaire date des années 1986- 1988 avec l'utilisation de sondes dites froides non radioactives et le développement de l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) par les équipes de *Pinkel* [32] [33] et de *Cremer* [34]. Depuis, de grands progrès techniques en cytogénétique moléculaire ont été réalisés et mis à profit aussi bien dans la recherche en génétique que dans le diagnostic clinique. Technique rapide et simple d'analyse chromosomique, l'hybridation in situ en fluorescence a conduit à introduire la biologie moléculaire dans l'arsenal des techniques d'analyse cytogénétique dont le caryotype reste toutefois l'examen de première intention [31].

4.2.2. Définition et principe

L'hybridation in situ en fluorescence (FISH) est une technique de cytogénétique moléculaire basée sur une réaction d'hybridation entre une sonde spécifique marquée par fluorescence et une séquence cible complémentaire d'ARN ou d'ADN. Cette technique est utilisée pour étudier l'amplification des gènes, ainsi que pour détecter et localiser des séquences nucléotidiques dans divers échantillons. [35]

La FISH est basée sur la propriété de dénaturation et de renaturation de la double hélice d'ADN. Son principe est fondé sur la complémentarité possible entre l'ADN d'un patient et un fragment d'ADN marqué d'une sonde fluorescente après dénaturation thermique et hybridation. La technique consiste à dénaturer l'ADN du sujet et l'ADN d'une sonde spécifique complémentaire fluorescente. Cette dénaturation thermique génère la séparation des deux brins d'ADN. Une complémentarité possible entre l'ADN du patient et l'ADN de la sonde fluorescente permettra l'hybridation in situ fluorescence (**Figure 4**). L'observation s'effectue grâce à un microscope à épifluorescence permettra ensuite la visualisation des signaux fluorescents émise par les sondes. [15]

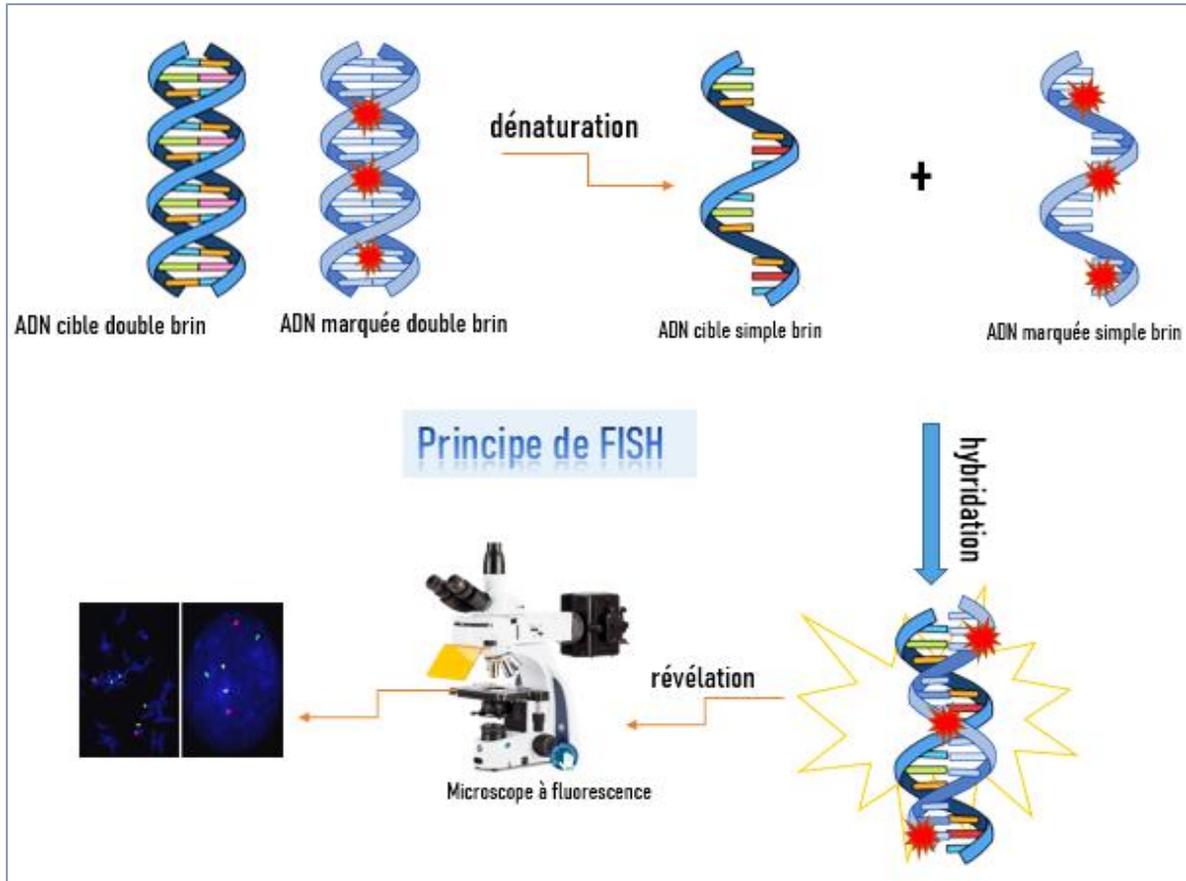


Figure 4: Principe de l'hybridation in situ en fluorescence

4.2.3. Les cibles :

Il existe deux types majeurs de cibles, les chromosomes métaphasiques et les noyaux interphasiques :

- **Les noyaux interphasiques** : L'hybridation in situ fluorescente sur noyaux interphasiques permet l'analyse rapide d'un grand nombre de cellules en évitant l'étape de culture préalable, ce qui permet des diagnostics directs avec des délais de réponses plus courts, particulièrement utiles dans le domaine du diagnostic prénatal.
- **Chromosomes métaphasiques** : La possibilité de discriminer et d'ordonner des séquences proches par hybridation in situ en fluorescence sur chromosomes métaphasiques dépend du locus étudié, du fait des différences de condensation à

l'intérieur même de l'euchromatine. Toutefois, le niveau de résolution semble être compris dans une fourchette allant de 1 à 3 Mb. [31]

4.2.4. Les sondes utilisées

Les sondes sont des fragments d'acide nucléique spécifiques de régions chromosomiques particulières et peuvent être manipulées, amplifiées et surtout marquées pour permettre leur localisation après hybridation in situ fluorescence sur des chromosomes préparés de façon classique [36]. Elles peuvent être classées en quatre catégories :

- **Les sondes centromériques** : Reconnaittent des séquences répétitives spécifiques des régions centromériques, elles permettent d'augmenter le taux de détection des aberrations génétiques [37]
- **Les sondes télomériques** : Elles permettent également de détecter des anomalies cryptiques des extrémités des chromosomes. [36]. Il est à noter qu'il existe des sondes spécifiques des régions subtélomériques propres à certains chromosomes qui visualisent l'extrémité terminale d'un chromosome donné, mais ces sondes correspondent en fait à des séquences uniques non répétées, différentes des séquences télomériques [31].
- **Les sondes de peinture chromosomique** : Les sondes de peinture chromosomique, reconnaissant le chromosome entier, peuvent être obtenues par triage chromosomique. Elle permet de mettre en évidence un chromosome particulier en totalité (ou seulement un bras chromosomique) par hybridation sur toute sa longueur [31]. Ces sondes permettent de préciser des remaniements chromosomiques complexes [36].
- **Les sondes spécifiques de régions chromosomiques** : Les sondes spécifiques de régions chromosomiques comme leur nom l'indique, marquage d'un endroit bien précis des chromosomes, elles vont pouvoir détecter des anomalies chromosomiques invisibles au caryotype standard, et même au caryotype en haute résolution [36].

4.2.5. Les fluorochromes utilisés [25] [38] [39] [40] [41]

Les fluorochromes sont des molécules fluorescents capables d'être excités par l'accumulation d'énergie par une longueur d'onde donnée, appelée longueur d'onde

d'excitation (λ_{exc}) et de restituer une partie de cette énergie sous l'aspect d'une longueur d'onde de moindre énergie appelée longueur d'onde d'émission (λ_{em}). Ils sont donc tous caractérisés par une longueur d'onde d'excitation et une longueur d'onde d'émission. Les fluorochromes couramment utilisés sont :

- le DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (310nm – 372nm) se fixe sur les régions riches en AT de l'ADN et est appliqué directement sur les préparations chromosomiques après l'hybridation pour colorer de façon aspécifique tous les chromosomes, ce qui permet de les repérer.
- le FITC (Fluorescein isothiocyanate) (exc 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans le vert
- La Cyanine 3 (Cy3) (λ_{exc} 495nm – λ_{em} 519nm) fluoresce dans l'orange
- Le Texas red (λ_{exc} 589nm – λ_{em} 615nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5 (λ_{exc} 650nm – λ_{em} 670nm) fluoresce dans le rouge
- La Cyanine 5.5 (λ_{exc} 675nm – λ_{em} 694nm) fluoresce dans le rouge

4.2.6. Les avantages et les limites

- **Les avantages** [42] [43]
 - ✓ Le principal avantage de la FISH est l'utilisation d'une sonde d'ADN marquée par un colorant fluorescent, ce qui permet un test très sensible, simple et rapide.
 - ✓ FISH fournit des informations supplémentaires par rapport à la carte génétique. Elle situe les réarrangements chromosomiques.
 - ✓ FISH permet l'analyse des chromosomes sur noyau interphasique.
 - ✓ FISH utilise des fragments de 100 kpb et cela cause ainsi peu de contraintes spatiales au niveau du noyau.
- **Les limites** [43] [44]
 - ✓ Technique coûteuse (sondes).
 - ✓ Application FISH : uniquement pour des cellules non viables.
 - ✓ Perte de la fluorescence donc du signal au cours du temps.

- ✓ Manque d'informations lors de l'analyse des résultats FISH en 2D microscope 3D à déconvolution.
- ✓ Elle demande plus de temps, elle est techniquement exigeante, nécessite un microscope à fluorescence, et elle ne permet pas de visualiser les caractéristiques morphologiques.

4.2.7. Les domaines d'application

- **Cytogénétique interphasique**

Il ne fait aucun doute que les techniques FISH ont eu un impact important dans le domaine de la cytogénétique diagnostique. La capacité de visualiser les sondes chromosomiques dans le noyau interphasique non divisé, ainsi que la disponibilité commerciale et la facilité d'utilisation des sondes centromériques multicopies. [45] [46].

La cytogénétique interphase présente plusieurs avantages :

1. Elle ne dépend pas d'une population de cellules en division, nécessaire à l'analyse cytogénétique classique.
2. Il est possible d'analyser un grand nombre de cellules et de réaliser une analyse statistique.
3. permet l'analyse rapide de l'échantillon car aucune technique de culture n'est nécessaire [46].
4. Il est possible d'analyser des documents d'archives. [47] [48]
5. elle augmente le taux de détection des anomalies chromosomiques clonales. [49]

- **Analyse de la translocation**

Sondes spécifiques de la séquence. Les translocations chromosomiques peuvent être détectées à la fois dans les noyaux en interphase et dans les chromosomes en métaphase en utilisant une variété de techniques de FISH. Des sondes à séquence unique couvrant un point de rupture de translocation peuvent être regroupées afin de couvrir une région facilement visible de l'ADN génomique. [50]

- **Amplification et délétion**

Plusieurs publications récentes ont démontré l'utilisation de la FISH dans la détection de délétions génétiques sub-microscopiques associées à des maladies génétiques. [51]

Une étude des gènes candidats pour l'aniridie, qui fait partie du syndrome WAGR (tumeur de Wilms, aniridie, anomalies génito-urinaires et retard mental), a montré une délétion hémizygote d'une séquence homologue au gène Pax-6 de la souris chez une mère et un fils atteints de la maladie. Le fils a ensuite présenté une tumeur de Wilms et la mère et le fils ont tous deux été atteints de la maladie. Il a été démontré que la mère de l'enfant présentait une délétion hémizygote du gène de prédisposition à la tumeur de Wilms. [52]

Fournissant qu'il existe des sondes informatives pour la région d'intérêt et que l'efficacité de l'hybridation de la sonde est bonne, l'analyse FISH constitue la méthode la plus directe pour observer une délétion hémizygote, en particulier lorsque le matériel patient est limité. [50]

- **Cartographie des chromosomes**

L'une des principales applications de l'hybridation in situ a été la cartographie de séquences uniques à des bandes chromosomiques spécifiques sur des chromosomes en métaphase. Contrairement aux autres techniques de cartographie, elle permet de localiser directement la position physique d'un gène, fournissant ainsi un point de référence pour une dissection moléculaire plus poussée. [50]

4.2.8. Dérivés de FISH

a. La technique d'hybridation in situ chromogénique (CISH)

La technique d'hybridation in situ chromogénique est similaire à celle de la FISH puisqu'il s'agit là aussi d'une hybridation in situ mais la détection des signaux de la sonde ne se fait plus grâce à un fluorochrome mais grâce à un chromogène. Avec la CISH, les meilleurs résultats sont obtenus avec un marquage indirect des sondes et non un marquage direct par un nucléotide transformé. La CISH utilise des anticorps ou de l'avidine conjugués

avec des enzymes comme l'alcaline phosphatase ou la peroxydase qui vont développer une réaction chromogénique. Concernant les sondes, pour la CISH sont plus limitées que celles pour la FISH : sondes centrométriques ciblant des chromosomes porteurs du gène cible et sondes spécifiques de la séquence cible associés à des chromogènes différents, et elle nécessite un microscope simple et non à fluorescence [14].

La CISH permet de déterminer le nombre de copies du gène cible, le nombre de copies du centromère ou le ratio copies gène cible/copies centromère. Cette technique est plus fiable pour identifier les amplifications mais pas les réarrangements [53].

b. La FISH multi-couleurs

La FISH multi-couleurs encore appelée FISH 24-couleurs est une technique de FISH permettant l'hybridation simultanée et spécifique des 22 paires d'autosomes et de la paire de gonosomes, elle utilise 24 sondes marquées par cinq fluorochromes différents utilisés séparément ou en combinaison de deux ou trois. Chaque paire chromosomique possède une combinaison de couleurs caractéristiques. Cette technique permet en une seule hybridation l'identification des chromosomes [54].

4.2.9. Apport de la FISH dans le diagnostic et le pronostique de cancer de sein

Le cancer de sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes, ainsi que c'est la 1^{ère} cause de mortalité chez le sexe féminin [1]. Environ 15 % des cancers du sein présentent une amplification du gène HER2 et une surexpression de la protéine. Ce statut « HER2 positif » peut être affirmé soit par FISH qui permet de mettre en évidence l'amplification de gène HER2, soit par immunohistochimie, mettant en évidence la surexpression de la protéine au niveau membranaire [55].

La FISH étant techniquement possible en routine et utile, voire indispensable, en termes diagnostiques et pronostiques, de nombreux pathologistes et cliniciens ont recours à cette technique complémentaire, de façon de plus en plus systématique. La FISH est en passe de devenir un standard et offre plusieurs avantages, et la confrontation histologie/biologie moléculaire augmente les compétences des pathologistes.

Depuis un peu plus de 10 ans, la détermination du statut de HER2 dans le cancer du sein fait partie de la routine de la prise en charge de ce cancer. Il existe de multiples

techniques permettant d'évaluer le statut de HER2 dans les tumeurs du sein, mais les deux les plus couramment utilisées sont l'immunohistochimie (IHC), qui permet d'évaluer le niveau d'expression de la protéine HER2 au niveau de la membrane cytoplasmique, et FISH, qui permet de compter le nombre de copies du gène HER2 au niveau du noyau des cellules tumorales, la technique FISH a prévalu par rapport aux autres, principalement à cause de sa possibilité de cibler précisément les cellules tumorales et d'établir un meilleur diagnostic par une meilleure précision du statut HER2 et du chromosome 17 [5].

III. Les différents biomarqueurs de cancer de sein

1. BRAF

BRAF est un proto-oncogène impliqué dans la voie de signalisation intracellulaire KRAS-MAPkinase. L'activation de récepteurs membranaires par liaison avec leurs ligands spécifiques induit une activation en cascade de cette voie et la stimulation de plusieurs fonctions cellulaires, cela se produit dans de nombreux types de cellules. [56]

2. KRAS

Le gène **KRAS** est un oncogène qui appartient à la famille des gènes ras. Il code pour une protéine avec un poids moléculaire de 21 KDa, située à l'intérieur de la membrane plasmique interne et qui module la prolifération et la différenciation cellulaire.[57]

3. PIK3CA

Le gène **PIK3CA** situé sur le chromosome humain 3 code pour la sous-unité catalytique p110 α de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) qui, par son rôle dans la voie PI3K/Akt est important pour la régulation des fonctions cellulaires importantes telles que la prolifération, le métabolisme et la synthèse des protéines l'angiogenèse et l'apoptose. Les mutations de PIK3CA sont connues pour être impliquées dans un large éventail de cancers humains et on pense que le PIK3CA mutant agit en tant qu'oncogène.[58]

4. HER2

Le gène HER2 c'est le biomarqueur le plus utilisé en routine au sein des laboratoires d'anatomopathologie dans le diagnostic du cancer de sein, il est localisé sur le chromosome 17q (en 17q21,1; de 35,109 à 35,138 Mb) [59].

IV. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2)

1. Implication de l'HER2 dans le cancer de sein

1.1. Le gène HER2

1.1.2. Définition et localisation

Le gène HER2 est également connu sous le nom de HER2/neu, il est localisé sur le chromosome 17q (en 17q21,1; de 35,109 à 35,138 Mb) (**figure 5**) ainsi qu'il appartient à la famille des gènes de récepteurs de facteurs de croissance HER (HER1, HER2, HER3 et HER4) famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, et il code pour une protéine transmembranaire de 185 kDa. Le gène HER2 est un facteur pronostique et prédictif important dans les cancers du sein, que ce soit en situation adjuvante ou métastatique. Le gène HER2 est amplifié et la protéine HER2 surexprimée à la surface des cellules dans 15 à 20 % des cas. [60] [61] [2].

HER2 est le récepteur le plus largement exprimé de la famille EGFR [59].

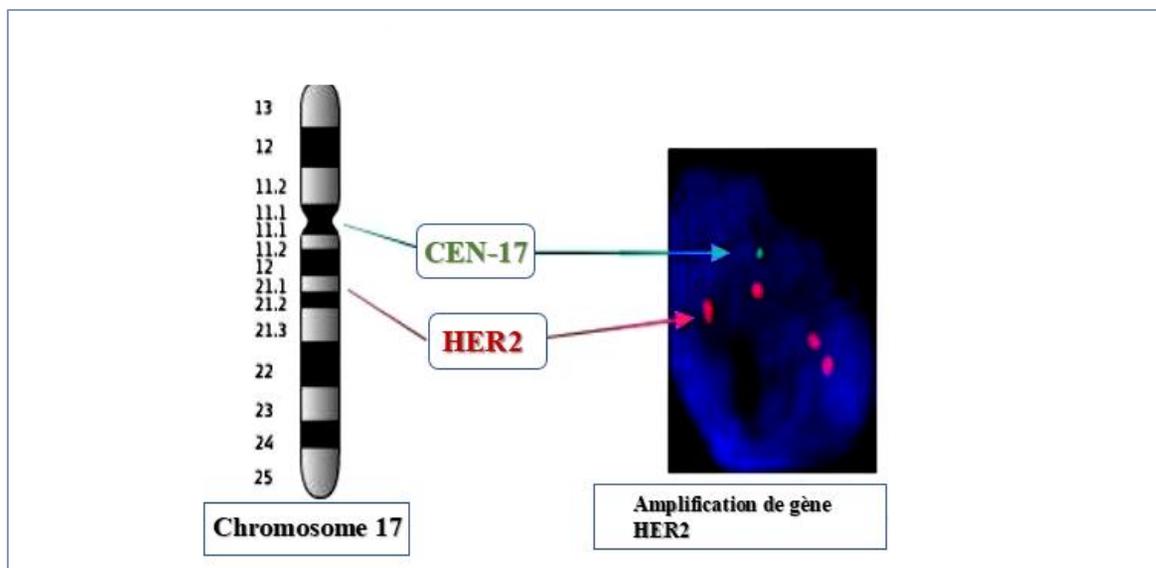


Figure 5: Localisation du gène HER2 sur le chromosome 17 et observation du HER2 et CEN-17 par microscope à épifluorescence à l'aide de sonde fluorescente [62]

Le gène HER2/neu est l'une des molécules les plus étudiées dans le domaine du cancer. Les principaux domaines d'expérimentation et d'intérêt portent sur le rôle de ce gène dans l'évolution du cancer de sein, l'utilité des anomalies de HER2/neu comme marqueur pronostique et comme facteur prédictif de la réponse à diverses thérapies, ainsi que son utilisation potentielle comme cible thérapeutique. Cependant, les mécanismes moléculaires par lesquels HER2/neu favorise la croissance et la survie des cellules cancéreuses et induisent une résistance à la chimiothérapie ne sont pas complètement compris [63].

1.1.3. Activation de HER2 dans le cancer de sein

Le récepteur HER2 sous sa forme monomérique est inactif. Son activation se fait suite à la liaison à un ligand qui n'est pas encore identifié. [59] [64]

L'activation de HER2 dans le cancer de sein provient d'une amplification génique, c'est-à-dire une multiplication du nombre de copies du gène HER2 normal. Les récepteurs de la famille HER sont activés après la fixation de ligand entraînant l'homo ou l'hétérodimérisation. Il existe des interactions directes entre les récepteurs dimérisés mis en avant par la boucle de dimérisation formée dans le domaine II. La structure de HER1, HER3 et HER4 inactifs est caractérisée par les interactions intramoléculaires entre les domaines II et IV qui maintiennent les domaines de fixation du ligand en conformation fermée. Cependant, dans le cas du récepteur HER2 la même caractéristique n'est pas observée. En effet, le domaine extracellulaire de HER2 adopte une conformation ouverte similaire à celle des autres récepteurs HER activés par la fixation du ligand. Dans cette conformation ouverte, les interactions fortes entre les domaines I et III ne permettent aucune liaison du ligand, ce qui peut expliquer l'absence d'affinité de HER2 pour un ligand.

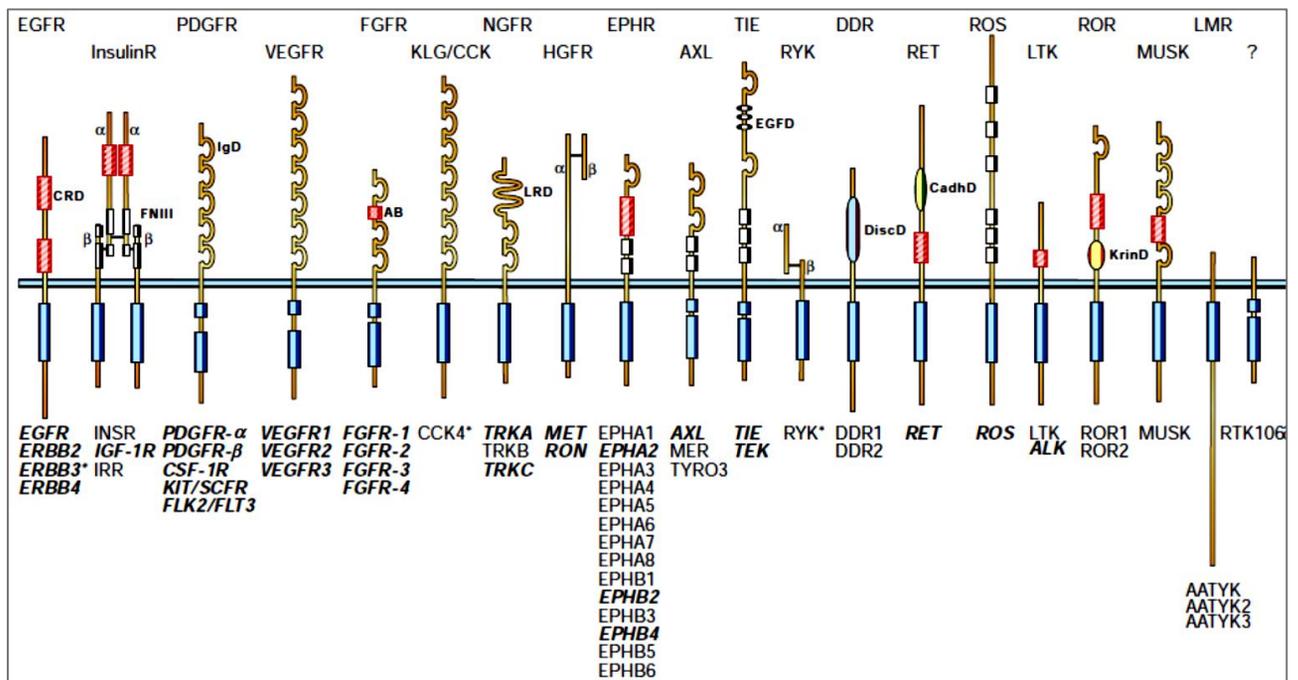
HER2 se trouve donc dans une conformation favorable à la dimérisation [65]. En ayant une conformation ouverte, HER2 est capable d'interagir avec les autres récepteurs HER, expliquant ainsi son rôle de co-récepteur avec les autres récepteurs HER en absence de liaison directe avec le ligand. En effet, HER2 est le partenaire favori pour l'hétérodimérisation avec les autres récepteurs HER.

Les hétérodimères contenant le récepteur HER2 ont des caractéristiques particulières, comme une endocytose plus lente qui induit alors un signal plus prolongé et plus puissant, ce qui permet une prolifération cellulaire plus importante [66].

1.2. Les récepteurs HER :

Les récepteurs des facteurs de croissance (HER) à la surface des cellules constituent un groupe de molécules capables de recevoir des signaux de l'extérieur, via leur partie extracellulaire afin de les transmettre à l'intérieur de la cellule et induire de nombreux messages cellulaires. Ce sont généralement des glycoprotéines transmembranaires présentant une activité tyrosine kinase dans leur domaine intracellulaire. On les appelle donc des récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK). [67]

Les RTK (récepteur tyrosine kinase) sont une famille de 58 récepteurs de surface cellulaire présentant des caractéristiques structurales et fonctionnelles similaires [68]. Selon leur organisation structurale, ces récepteurs se regroupent en plusieurs familles, parmi lesquelles, on distingue les récepteurs à l'insuline (IR), les récepteurs aux facteurs de croissance épidermique (EGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance dérivés des plaquettes (PDGFR), les récepteurs aux facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGFR) et les récepteurs aux facteurs de croissance des fibroblastes (FGFR) (**figure 6**). [69]



a. Étude structurale du récepteur HER

Les récepteurs HER sont composés de trois domaines distincts : un domaine N-terminal extracellulaire portant le site de fixation du ligand, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal intracellulaire qui porte l'activité tyrosine kinase. La région extracellulaire de chaque récepteur HER se compose de quatre sous-domaines. Les sous-domaines riches en leucine L1 et L2 interagissent directement avec le ligand. Le sous-domaine CR1 et CR2, riche en cystéine, contient la boucle de dimérisation responsable de la réaction du récepteur-récepteur (**Figure 7**) [70].

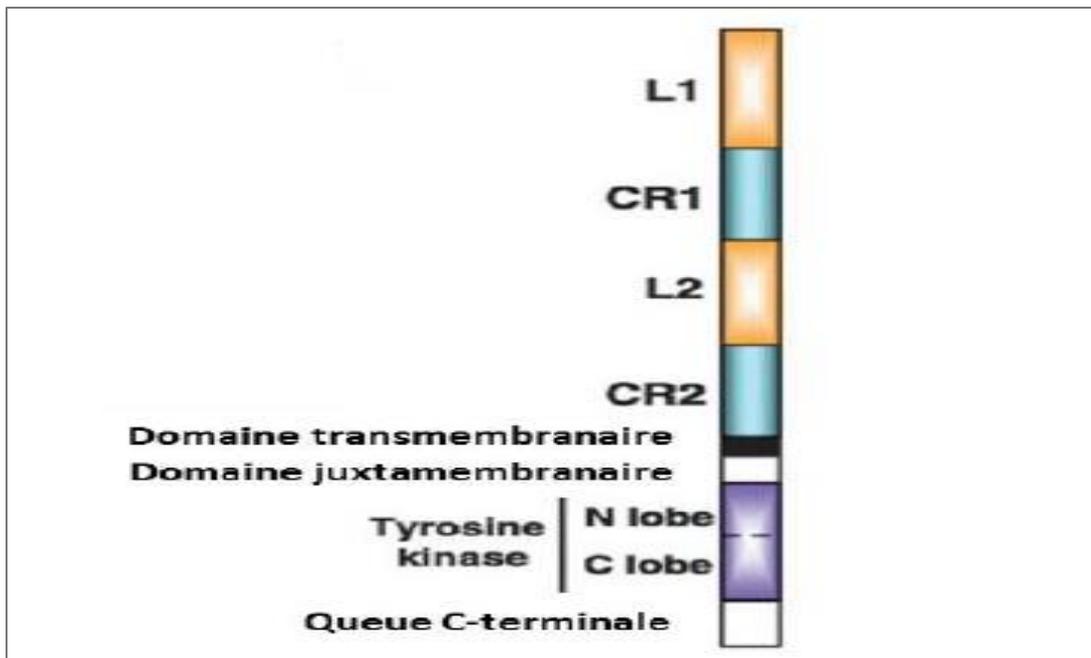


Figure 7: Organisation des domaines des récepteurs [70].

La région extracellulaire de HER2 est différente des autres. HER2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état activé par le ligand, de plus, cette structure rend la liaison au ligand impossible parce que l'emplacement n'est pas accessible pour l'interaction. (**Figure 8**) [64].

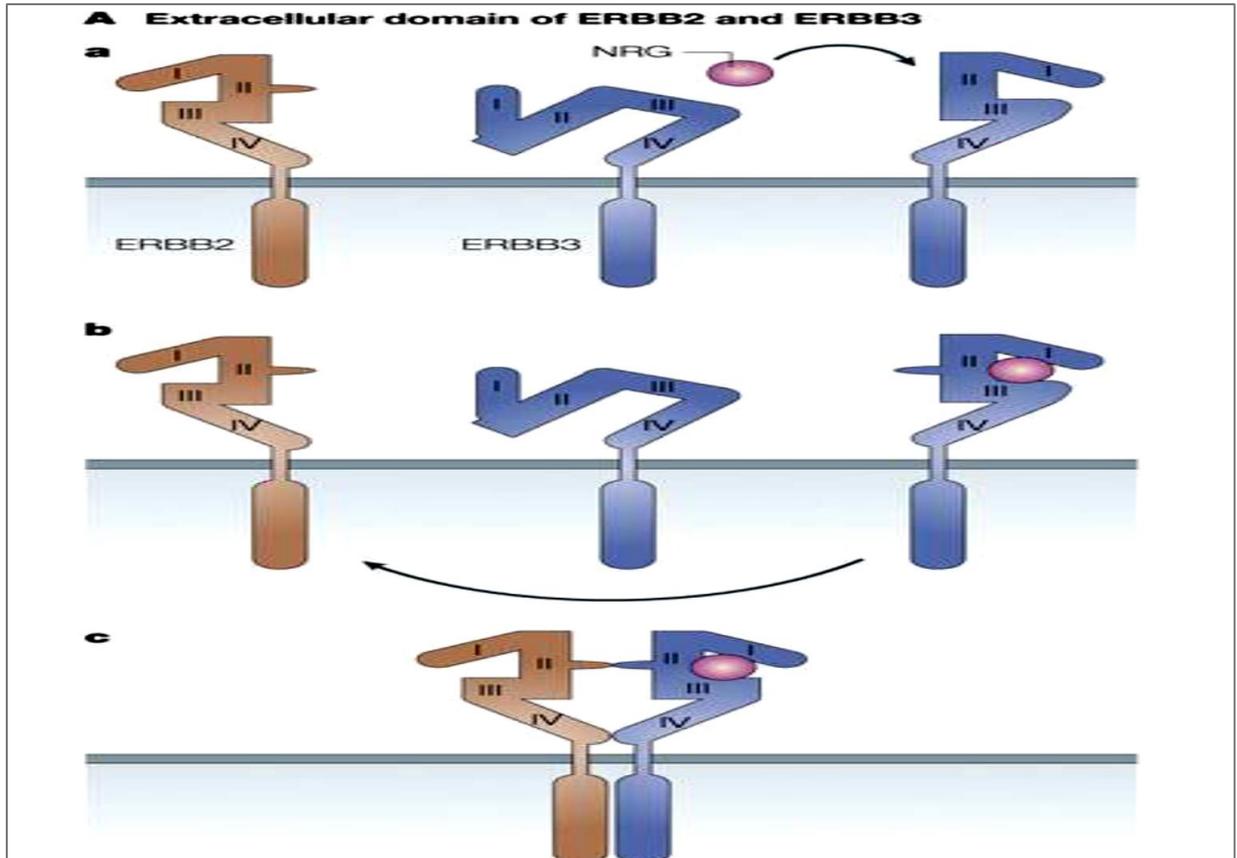


Figure 8: Structure du récepteur HER [64]

La région extracellulaire de chaque HER est composée de 4 domaines (I-IV). En absence de ligand, HER3 a une structure particulière (a). Quand les domaines I et III lient la neureguline (NRG), le bras de dimérisation du domaine II est exposé (b) ce qui donne une réaction récepteur-récepteur (c). HER2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état de HER3 activé par le ligand. [64]

b. Les mutations activatrices de HER2 [71]

Deux grands types majeurs de mutations activatrices de HER2 ont été mis en évidence en cancérologie humaine, qui concerne soit le domaine extracellulaire du récepteur, soit le domaine tyrosine kinase (TK) (**figure 9 et tableau 1**).

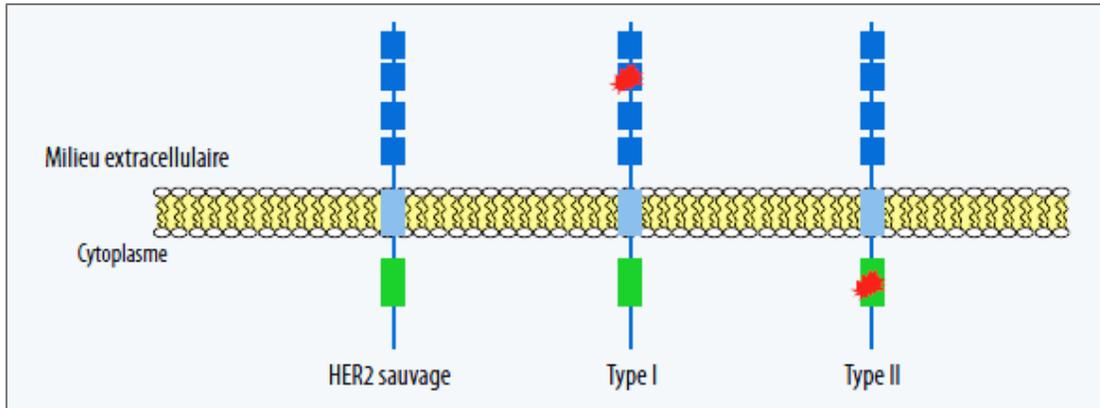


Figure 9: Description des mutations activatrices de HER2 [71]

Tableau 1: Bases génétiques et biologiques des 2 types de mutations activatrices [71]

	<i>localisation</i>	<i>Type de mutation</i>	<i>Conséquences biologiques</i>	<i>Fréquence estimée</i>
Type 1	Domaine extracellulaire	Substitution	Modification des structures intramoléculaires du sous-domaine II induisant la dimérisation et l'activation constitutive du récepteur	– 1 à 2 % des cancers du sein et bronchiques – 40 % des carcinomes urothéliaux micropapillaires
Type 2	Domaine tyrosine kinase	Substitution Insertion en phase Délétion	Changement conformationnel du site de liaison à l'ATP résultant en une augmentation de l'activité tyrosine kinase	– 2 à 4 % des cancers bronchiques – 0,5 % des cancers du sein

c. Les ligands de récepteur HER :

Les récepteurs HER sont activés par la liaison d'une famille de ligands. [72]. Ces ligands peuvent être divisés en trois groupes (**tableau 2**). Le premier groupe comporte 3 ligands spécifiques de l'EGFR qui sont l'epidermal growth factor (EGF), le transforming growth factor α (TGF- α) et l'amphiréguline (AR). Le second groupe comporte la bêta-celluline (BTC), l'heparin-binding epidermal growth factor (HB-EGF) et l'épiréguline (EPR), qui montrent une spécificité double en liant l'EGFR et HER4. Le troisième groupe est composé des neurégulines (NRGs) qui se lient à HER3 et/ou HER4. [73] A ce jour, aucun ligand se fixant au domaine extracellulaire du récepteur HER2 n'est connu. [74].

Tableau 2: Récapitulatif des différents ligands des récepteurs HER [73]

ligands	récepteurs			
	<u>EGFR</u>	<u>HER2</u>	<u>HER3</u>	<u>HER4</u>
EGF	+	-	-	-
TGF-	+	-	-	-
amphiréguline	+	-	-	-
Bêta-celluline	+	-	-	+
HB-EGF	+	-	-	+
épiréguline	+	-	-	+
Neuréguline 1	-	-	+	+
Neuréguline 2	-	-	+	+
Neuréguline 3	-	-	-	+
Neuréguline 4	-	-	-	+

d. Les voies de signalisation activées par HER2

À la suite de l'activation du récepteur HER2 par dimérisation, la formation d'un complexe protéique avec différents effecteurs va permettre l'activation des voies de signalisation telles que PI3K/AKT, MAPK/ERK, PLC- γ 1, STAT et Src (**Figure 10**). Ces voies contrôlent les processus cellulaires fondamentaux tels que la survie, la prolifération, la migration, l'angiogenèse et la différenciation cellulaire.[75]

▪ La voie PI3K/AKT :

La voie PI3K/AKT est l'une des principales voies activées par les récepteurs HER [76].

La protéine PI3K est constituée de 2 sous-unités : p85 qui interagit avec les dimères HER, et la sous-unité p110 qui possède l'activité catalytique. Une fois activée après la fixation de p85 au niveau du domaine intracellulaire du récepteur, la sous-unité p110 catalyse la transformation du lipide membranaire PIP2 (phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate) en PIP3. Ainsi, le PIP3 permet l'activation d'AKT et sa phosphorylation par la protéine PDK1. Une fois activée, AKT permet la médiation de différents signaux intracellulaires tels que l'inhibition de la protéine pro-apoptotique BAD (BCL2 associated agonist of cell death), l'activation de GSK3 β (Glycogen synthase kinase 3 β) impliquée dans la survie et l'induction de NF κ B favorable à l'inhibition de l'apoptose. [77]

▪ La voie RAS/MAPK

L'activation de la voie RAS/MAPK par les récepteurs HER est permise par le recrutement des protéines Shc, GRB2 et SOS au niveau de la partie intracellulaire du récepteur [78]. La protéine RAS ainsi activée permet l'induction en cascade des kinases RAF, MEK et ERK. Lorsqu'ERK est phosphorylée et transloquée dans le noyau, elle active des facteurs de transcription tels qu'Elk1 et c-Fos qui contrôlent la prolifération et l'invasion cellulaire. [79]

- **La voie PLC- γ 1**

La phospholipase- γ 1 est une protéine qui contient deux domaines SH2 lui permettant de se fixer au niveau des phosphorylations des récepteurs HER. Ainsi activée, l'activité catalytique de PLC- γ 1 permet l'hydrolyse de PIP2 formant l'IP3 (inositol-1,4,5-triphosphate) et le DAG (diacylglycerol), ces deux messagers stimulent respectivement, la libération de Ca²⁺ intracellulaire et l'activation de la PKC (protein kinase C).[80]

- **La voie STAT**

L'implication des protéines de la famille STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) a été décrite dans la signalisation de différents RTK (récepteurs tyrosine kinase), notamment les récepteurs HER dans la plupart des cancers [81] [82]. Il existe 7 membres dans la famille STAT parmi lesquels on a STAT1, STAT3 et STAT5, ces derniers sont les plus impliqués dans les cancers. Lorsque le dimère HER est activé, il interagit d'une façon directe avec la protéine STAT et induit sa phosphorylation. L'activation de STAT peut également passer par le recrutement et l'activation de la protéine de signalisation Src et par l'interaction avec la protéine JAK (Janus kinase), ensuite, la protéine STAT phosphorylée est capable de former un dimère afin d'être transloquée au niveau du noyau et d'activer la transcription de gènes impliqués dans la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.[83]

- **La signalisation de Src**

Les protéines PI3K et STAT3 sont connues comme substrats naturels de Src et induisent leur phosphorylation. Ainsi, la signalisation de Src est en corrélation avec les voies PI3K/AKT et STAT et améliore la signalisation des récepteurs HER. [84] De plus, Src joue un rôle clé dans les phénomènes de migration cellulaire en activant la protéine FAK (Focal Adhesion Kinase) et la transduction des signaux médiés par les intégrines [85].

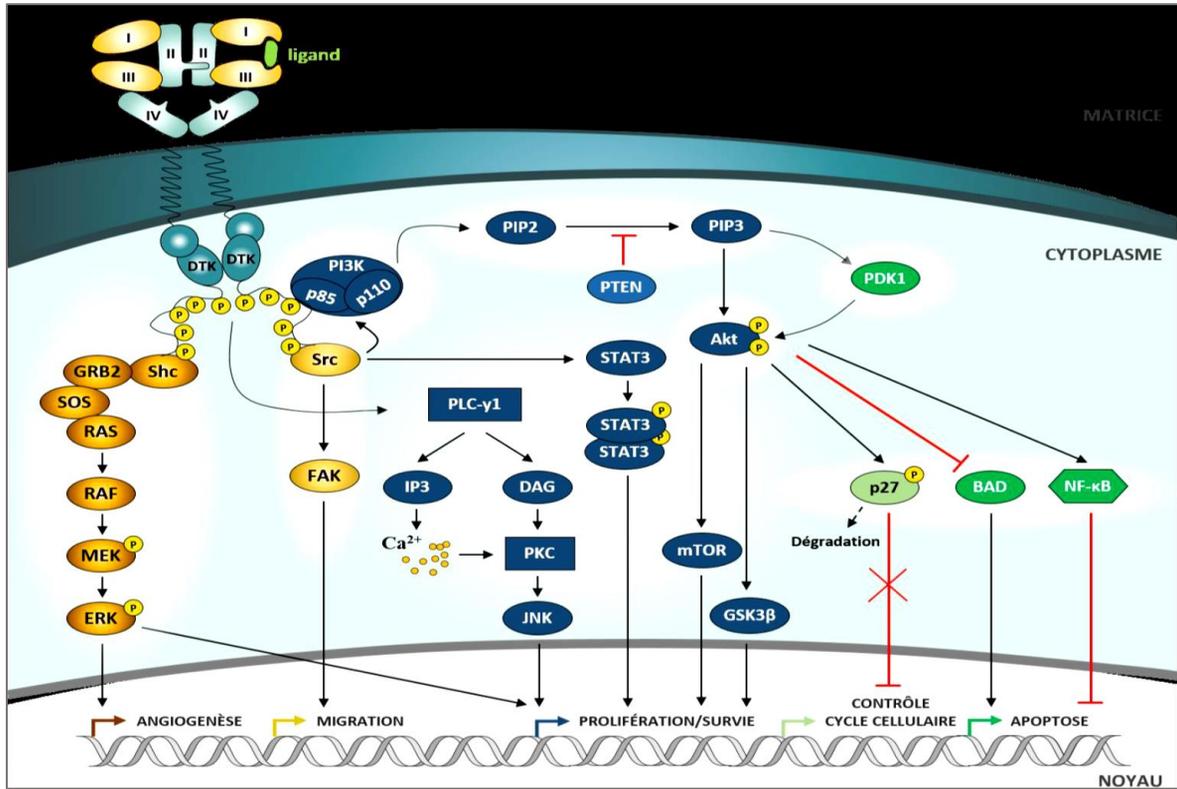


Figure 10: Les voies de signalisation activées par HER2 [86]

e. Fonction de récepteurs HER / HER2 :

Les récepteurs HER existent sous forme de monomères à la surface des cellules. Lorsque les ligands se lient à leurs domaines extracellulaires, les protéines HER subissent une dimérisation et une transphosphorylation de leurs domaines intracellulaires. HER2 n'a pas de ligand activateur direct connu et peut être dans un état activé de manière constitutive ou devenir actif lors de l'hétérodimérisation avec d'autres membres de la famille comme HER1 et HER3. L' homo- ou l'hétérodimérisation entraîne l'autophosphorylation de résidus tyrosine dans le domaine cytoplasmique des récepteurs et déclenche diverses voies de signalisation, ce qui entraîne une prolifération cellulaire.[87]

Le récepteur HER2 est présent à la surface des cellules normales où il participe à la croissance et à la différenciation cellulaire. La protéine HER2 de 185 KDa ou p185 est codée par le gène HER2/neu, proto-oncogène situé sur le bras long du chromosome 17 (17q21.1) [88]. Des études in vitro et in vivo ont démontré le rôle de HER2 à différents niveaux du processus tumoral :

- la prolifération cellulaire ;
- la transformation maligne de lignées cellulaires en culture ;
- la mobilité cellulaire (élément déterminant dans le potentiel métastatique des cellules tumorales). [11]

L'amplification et/ou la surexpression de HER2 serait une des causes de transformation cancéreuse des cellules par un mécanisme de potentialisation de la croissance cellulaire. HER2 se comporterait donc comme un amplificateur de signaux de la croissance cellulaire par l'intermédiaire de son activité tyrosine kinase intrinsèque lors d'une liaison avec un autre récepteur de la famille HER ou lors de sa surexpression, par la formation possible de dimères HER2-HER2.[11]

f. Thérapie ciblée anti HER2

L'intérêt de HER2 est de disposer d'un anticorps thérapeutique, appelé trastuzumab et commercialisé par le laboratoire Roche sous le nom d'Herceptin®. Le trastuzumab est un anticorps monoclonal dirigé contre le domaine extracellulaire du récepteur HER2 utilisé dans le cancer du sein métastatique avec surexpression tumorale de HER2, surexpression classée 3+ en immunohistochimie (IHC) [11].

Deuxième partie :
Matériels et méthodes

I. Type, période et lieux de l'étude

Il s'agit d'une étude analytique, expérimentale et comparative, de mettre en place de la technique FISH au sein du laboratoire d'anatomie et de cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat, la mise en place de la technique a duré quatre mois du 25/03/2022 au 15/07/2022.

II. Matériel

1. Échantillon

- À partir des archives du laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat entre 2018 et 2022, nous avons sélectionné une série de biopsies inclus en paraffine de cancer du sein, testés HER2 positif de score 3+ et 2+ avec la technique d'IHC.
- À partir d'autres laboratoires externes d'anatomopathologie on a reçu des biopsies déjà coupées et étalées dans des lames.

2. Les appareils utilisés

A. L'hybridizer



Figure 11: Hybridizer (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

B. Microscope à fluorescence



Figure 12: Microscope à fluorescence (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

Le microscope à épifluorescence permet la visualisation des lames sous la lumière, ce microscope est muni de plusieurs filtres et émet des ondes lumineuses permettant de différencier le type de la fluorescence.

C. Etuve :



Figure 13: Etuve de laboratoire [89]

D. Agitateur vortex



Figure 14: Agitateur vortex [90]

- a. Bain marie avec couvercle (pouvant maintenir une température de 95 à 99 °C)



Figure 15: Bain marie (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

E. Autres matériels

Pipettes réglables, les cuves en vers, miniature, thermomètre, lames et lamelles de protection, pince, lingette absorbant, éprouvette graduée.

3. Les réactifs utilisés

- ♣ Eau distillée
- ♣ Éthanol à 96 %
- ♣ Xylène ou toluène
- ♣ le kit de HER2 IQFISH pharmDx : Dans cette étude on a utilisé un kit qui contient tous les principaux réactifs nécessaires pour réaliser la technique FISH c'est le kit de HER2 IQFISH pharmDx, il contient 7 flacons, **figure 16 (détaillés dans l'annexe 3)**.



Figure 16: Le kit de HER2 IQFISH pharmDx

III. METHODE

1. Procédure de la technique FISH

1.1.Préparation des lames

- Les biopsies sélectionnées des archives du laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat sont coupées avec un microtome d'épaisseur de coupes de 4 μm (**l'annexe 1**) et étalées sur des lames, par la suite incubées dans l'étuve à 60C° pendant une heure puis conservées au réfrigérateur à 5C°.
- Les lames reçues des laboratoires externes sont incubées dans l'étuve à 60C° pendant une heure et conservées au réfrigérateur à 5C°.

1.2.Préparation des réactifs

La plupart des réactifs nécessaires pour la réalisation de la technique FISH sont prêts à l'emploi, mais l'éthanol, solution de prétraitement, tampon de lavage et tampon de lavage stringent doivent être reconstitués avec de l'eau distillée afin d'avoir des concentrations optimales pour la FISH :

- **Série de bain d'éthanol**

A partir d'une solution d'éthanol de 99%, on prépare à température ambiante 3 cuves contenant de l'éthanol à 70%, 85% et à 96 respectivement dilué avec l'eau distillé de 30%, 15%, et 4%.

- **Solution de prétraitement**

Pour la solution de prétraitement contenue dans le flacon 1 du kit, on vérifie premièrement l'absence de cristaux avant de préparer le réactif.

On prépare une quantité suffisante à partir du flacon 1 (solution de prétraitement 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée. La solution diluée inutilisée est conservée entre 2 et 8 °C pendant un mois.

- **Tampon de lavage**

On prépare une quantité suffisante à partir du flacon 6 (tampon de lavage 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée. Le tampon dilué inutilisé est conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois.

- **Tampon de lavage stringent**

Le flacon 4 (tampon de lavage stringent 20x) est concentré, on prépare une quantité suffisante à partir du flacon 4 (tampon de lavage stringent 20x) en diluant le concentré au 1/20ème dans de l'eau distillée. Le tampon dilué inutilisé est conservé entre 2 et 8 °C pendant un mois.

2. Le protocole expérimental de la technique FISH

2.1. Déparaffinage et réhydratation

Avant de réaliser l'analyse, les lames de tissus doivent être déparaffinées dans deux bains successives de toluène durant 5 min pour chacun afin d'éliminer le milieu d'inclusion (la paraffine), les coupes sont ensuite réhydratées dans 2 bain successives d'alcool ; alcool à 96% deux fois 2x2 minutes en renouvelant le bain, alcool à 70% deux fois 2x2 minutes, en renouvelant le bain (**figure 17**). Cette étape doit être réalisée à température ambiante (20 à 25 °C). Un rinçage des lames est effectué dans un bain contenant le tampon de lavage dilué comme indiqué dans l'étape de la préparation des réactifs.

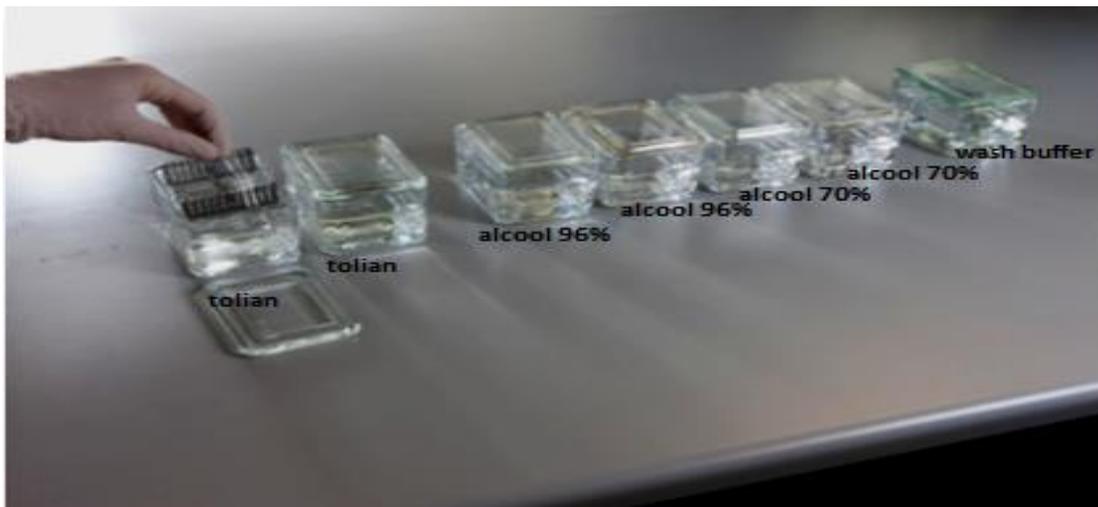


Figure 17: L'étape du déparaffinage et la déshydratation [91]

2.2. Le prétraitement à la chaleur

L'étape de prétraitement est réalisée dans une température entre 95 et 99°C à l'aide d'un bain marie. On lance premièrement le bain marie pour prendre la température nécessaire puis on place la cuve contenant la solution de prétraitement déjà préparé dans le bain marie, on recouvre la cuve avec un couvercle afin de stabiliser la température et d'éviter toute évaporation. Après environ 15min on vérifie la température de la solution avec un thermomètre et les lames déparaffinées et réhydratées à température ambiante sont prolongés dans la cuve de prétraitement et incubé à 95-99 °C pendant 10 minutes.

Après 10min on retire la cuve dans le bain marie et on retire le couvercle, puis on laisse les lames se refroidir dans la solution pendant 15min à température ambiante. Ensuite on prépare à nouveau deux autres bains de solution de lavage (wash buffer) (**figure 20**) dont le rinçage des lames est effectué pendant 3min pour chacun à température ambiante, ensuite on élimine l'excès de la solution de lavage avec une lingette absorbante avant d'appliquer la pepsine.



Figure 18 : Etape de prétraitement des lames dans le bain marie [91]

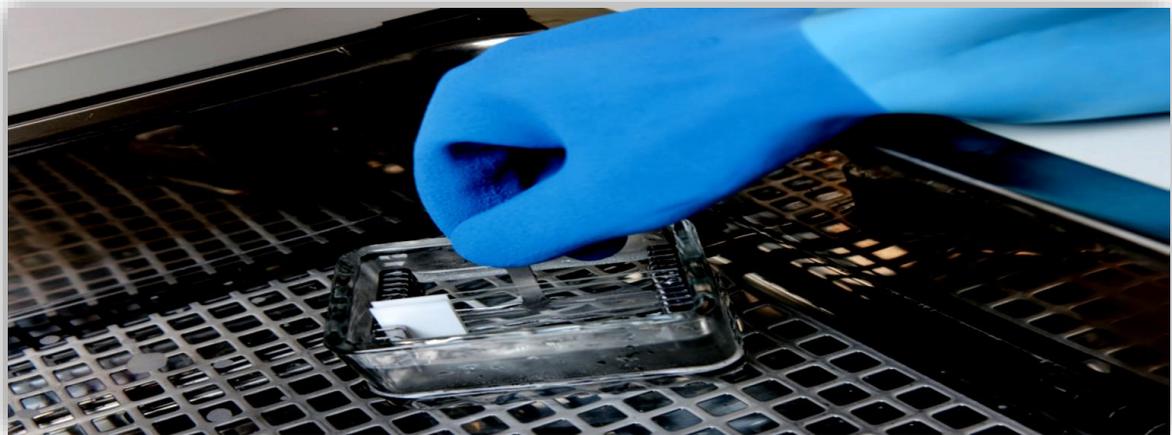


Figure 19: Placement des lames dans la solution de prétraitement [91]

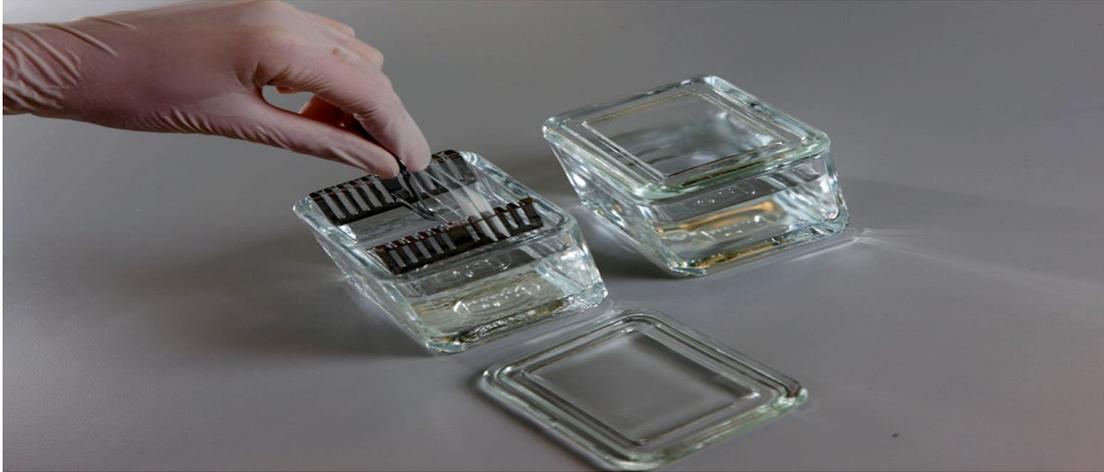


Figure 20: Rinçage avec le tampon de lavage (wash buffer). [91]

2.3. La digestion enzymatique avec la pepsine

La digestion enzymatique est réalisée avec la pepsine froide (2 à 8 C°) prête à l'emploi, puis on applique 5 à 8 gouttes de pepsine sur chaque lame, on vérifie que le tissu est complètement couvert, ensuite on incube les lames à l'hybridiser à 37 C° pendant 5 min (**figure 21**). Cette enzyme dégrade les barrières protéiques pour faciliter l'entrée de la sonde vers l'ADN cible permettant ainsi une meilleure hybridation.



Figure 21: Etape d'application de la pepsine et incubation à l'hybridizer [91]

2.4. Dénaturation et hybridation

Après l'étape de la digestion enzymatique, les lames sont transférées dans l'hybridizer, rincées à nouveau dans 2 baignoires de solution de lavage pendant 3 min pour chacune,

déshydratées dans 3 bains consécutifs d'alcool à 70 % et 85 %, puis à 96 % pendant 2 min pour chaque bain, et on les laisse bien sécher à l'air libre (**figure 22**).



Figure 22: *Déshydratation dans une série de bain d'alcool et à l'air libre [91]*

le flacon 3 a été ensuite retiré du congélateur à -18°C et laissé à température ambiante pendant 20min, 30min au max à l'abri de lumière intense, puis agité vigoureusement le flacon pendant 15 secondes à l'aide d'un agitateur Vortex (**figure 23**), à l'aide d'une micropipette on dépose $15\mu\text{l}$ de mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH au centre de la coupe de tissu sans le toucher, après on place immédiatement une lamelle de protection en verre de 22 mm x 22 mm sur le mélange de sondes et on le laisse celui-ci s'étaler de manière homogène sous la lamelle, toute en évitant la formation de bulles d'air, ensuite les lamelles sont scellés avec de l'étanchéifiant de flacon 7, on le place sur tous les bords de la lamelle (**figure 24**). A la fin on replace le mélange de sondes immédiatement dans le congélateur à -18°C . Les lames sont ensuite incubées dans l'hybridizer avec un programme de dénaturation à 66°C pendant 10 minutes et d'hybridation à 45°C pendant 120 minutes. On s'assurant que le couvercle est correctement fermé puis on lance le programme.

L'étape de la dénaturation permet de séparer les deux brins d'ADN cible et de l'ADN sonde, pour que l'ADN cible et celui de la sonde puissent s'apparier l'un avec l'autre, il est indispensable que chacun d'entre eux, soit sous une conformation simple brin, une fois l'ADN de la cible et de la sonde respectivement dénaturés sous la forme de simple brin, l'étape d'hybridation, d'une durée de 2h à 45°C , va permettre un appariement de l'ADN de la sonde et l'ADN chromosomique cible qui vont alors former un ADN double brin.



Figure 23: Etape d'agitation de la sonde par un agitateur Vortex [91]

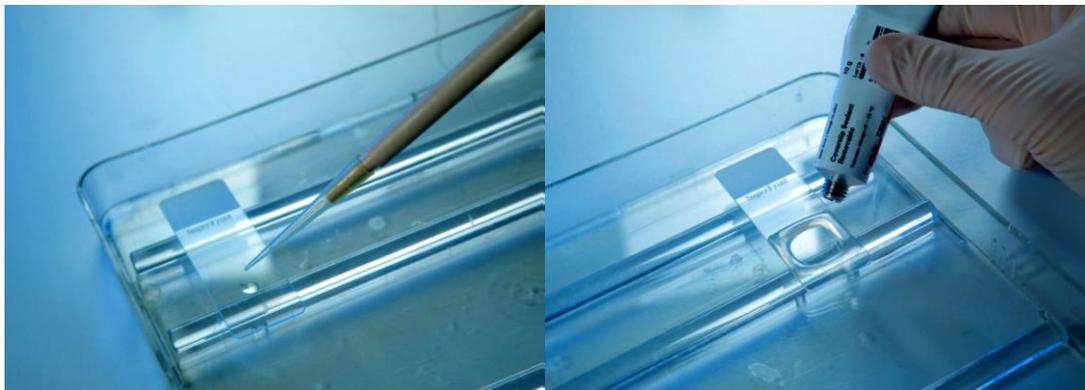


Figure 24 : Etape de la déposition de la sonde puis la lamelle et l'étanchéifiant [91]



Figure 25: Position des lames et lancement de l'hybridizer [91].

2.5.Lavage stringent

On prépare 2 bains en verre de flacon 4 contenant le tampon de lavage stringent dilué avec l'eau distillé à température ambiante, comme déjà indiqué dans les étapes de préparation des réactifs. Ensuite le premier a été placé dans le bain marie à température de 63°C en recouvrant le bain afin de stabiliser la température, puis le deuxième est laissé à température ambiante.

Après l'hybridation, les lames ont été retirées de la chambre d'hybridation en retirant avec précaution l'étanchéisant ainsi que les lamelles de protection, puis les lames sont placées les unes après les autres dans le deuxième bain de la solution stringente à température ambiante. Ensuite les lames sont transférées du deuxième bain à température ambiante au premier bain à 63°C qui se trouve dans le bain-marie après vérification de la température à l'aide d'un thermomètre.

Immédiatement après avoir transféré les lames dans le tampon de lavage stringent dilué à 63°C dans le bain-marie, on démarre le minuteur afin d'assurer un lavage stringent pendant exactement 10 minutes, ce type de lavage permet l'élimination des sondes non hybridées. Après 10min on retire les lames du tampon de lavage stringent dilué, les coupes ont ensuite trempé dans deux bains neufs contenant le tampon de lavage (wash buffer) dilué pendant 3 minutes dans chaque bain à température ambiante.

En fin les tissus sont déshydratés dans une série de trois bains d'alcool ; 70%, 85 et puis 96% pendant 2 minutes dans chaque bain. Ensuite on laisse les lames sécher à l'air libre.

2.6.Montage des lames

Après déshydratation complet, on applique 15µl de flacon 5 contenant le milieu de montage pour la fluorescence, puis on applique une lamelle de protection, enfin les lames sont met en place dans le réfrigérateur à 5 C° à l'abri de la lumière et peuvent être préservés jusqu'aux 7 jours au maximum.

2.7.La Lecture

La lecture des lames se fait à l'aide d'un microscope à épifluorescence menu de filtres sous une lampe de 100 watts, les filtres sont conçus individuellement pour des fluochromes spécifiques, dans notre cas on a utilisé selon le manuel de kit qui recommande l'utilisation

d'un filtre DAPI spécifique combiné à un double filtre Texas Red/FITC de haute qualité (**tableau 3**). Les lames préparées peuvent être lues 15 min jusqu'après le montage, mais le maximum c'est 7 jours car elles perdent sa fluorescence.

Tableau 3: Les fluorochromes utilisés dans la lecture des lames [91]

fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation	Longueur d'onde d'émission
DAPI	310nm	372nm
FITC	495nm	520nm
Texas Red	596nm	615nm

La lecture des lames est réalisée par numération des signaux vert et rouge avec l'objectif 100 en utilisant l'huile à émersion, on scanne plusieurs zones des cellules tumorales pour prendre en compte toute hétérogénéité possible, puis on sélectionne une zone présentant une bonne répartition des noyaux (**l'annexe 2**), puis on calcule le nombre de signaux rouges d'HER2 et les signaux verts des centromère de chromosome 17.

On compte 20 noyaux par échantillon tissulaire, à partir des zones tumorales distinctes. Puis on calcule le rapport HER2/CEN-17 en divisant le nombre total de signaux HER2 rouges par le nombre total de signaux CEN-17 verts.

- Si le rapport HER2/CEN-17 < 2 : aucune amplification du gène HER2 observée
- Et si le rapport ≥ 2 : amplification du gène HER2 observée. [91]

Troisième partie :
Résultats et discussion

Le présent travail a été réalisé au sein du laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat sur une période de quatre mois, l'objectif était la mise en place de la technique FISH et spécifiquement dans la détection et la quantification de l'amplification de gène HER2 à l'aide de kit HER2 IQFISH pharmDx. Le choix du récepteur HER2 dans notre étude est lié à plusieurs raisons, en l'occurrence son intérêt clinique dans la prise en charge des patientes atteintes du cancer du sein et la disponibilité des biopsies et des kits au laboratoire, facilitant ainsi l'étude expérimentale, cette dernière a été réalisée sur 32 cas de cancer de sein, répartis comme suit :

- 12 cas diagnostiqués positifs avec la technique d'immunohistochimie au laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat, dont 5 est de score 2+ et 7 de score 3+.
- 20 cas reçus auprès de trois laboratoires externes dont 13 ont été amplifié par la FISH.

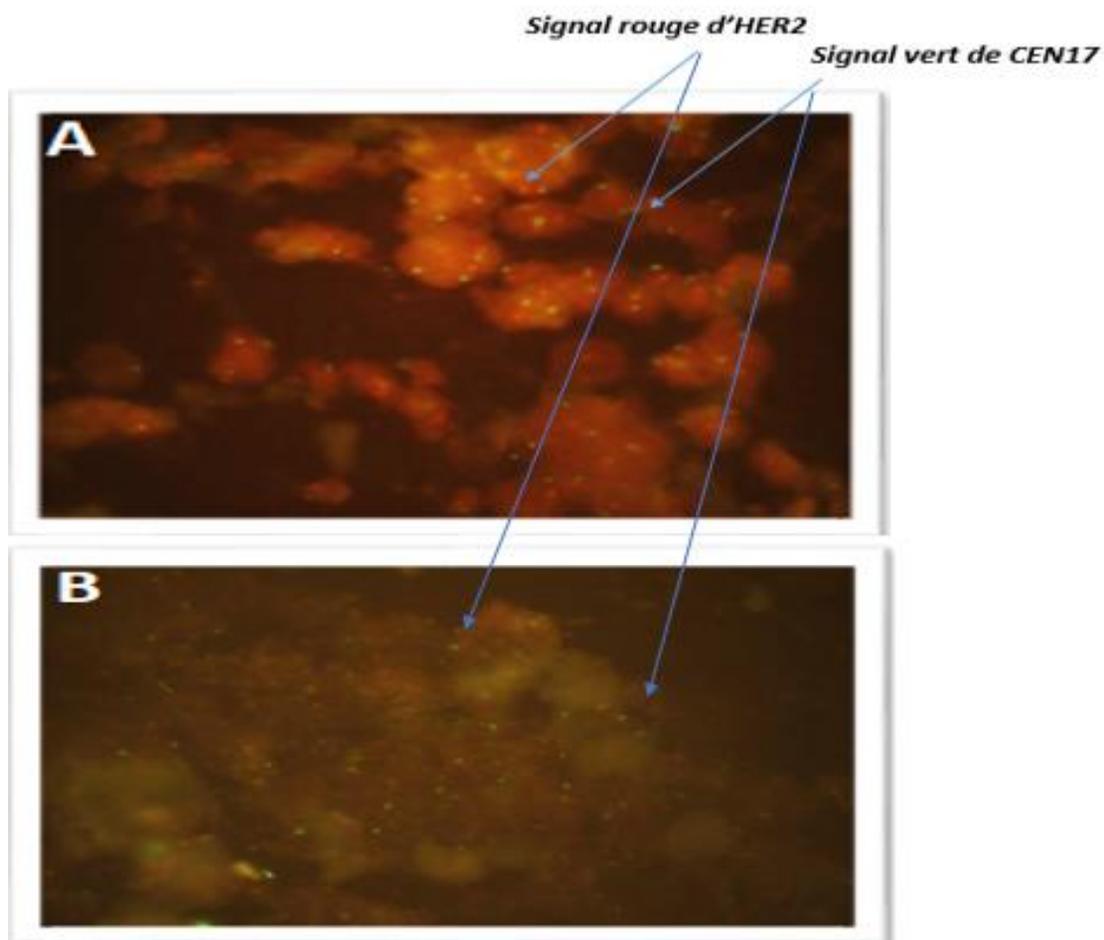


Figure 26 : Images vues au microscope à épi fluorescence au grossissement x100, montrant l'amplification du gène HER2
A : Amplification du gène HER2 détectée par FISH (signaux rouges : HER2 ; signaux verts : centromères du chromosome 17).
B : Absence de l'amplification du gène HER2

Tableau 4: Résultats de la FISH des cas de LACP et leurs corrélation avec les résultats de l'IHC

Les cas	Résultats de l'immunohistochimie	Résultats FISH (rapport HER2/CEN17)	commentaire
1	Score 2+	1,25	Non Amplifier
2		0,5	Non Amplifier
3		2,6	Amplifier
4		2	Amplifier
5		2	Amplifier
6		2,2	Amplifier
7	Score 3+	2,6	Amplifier
8		3	Amplifier
9		2,5	Amplifier
10		2	Amplifier
11		2,85	Amplifier
12		2,8	Amplifier

* Rapport HER2/CEN-17 < 2 : absence d'amplification du gène HER2

* Rapport ≥ 2 : Présence d'amplification du gène HER2.

La figure 26 et le tableau 4 montrent les résultats de la FISH sur les cas de cancer de sein qui ont été diagnostiqués positifs avec la technique d'immunohistochimie au laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat. Un résultat négatif (pas d'amplification) signifie que les taux intracellulaires de HER2 sont normaux et que le cancer du sein est classé HER2 négatif. Cependant, un résultat positif (présence d'amplification) signifie qu'il y a une amplification du gène HER2 ; traduisant au moins 4 copies dans la cellule, le cancer est ainsi classé HER2 positif [91].

L'image A de la figure 26 montre une amplification remarquable du gène HER2, notant la disposition en amas des signaux rouges d'HER2 et les signaux verts de centromère de chromosome 17, alors que l'image B montre la présence de quelques signaux verts et rouges indiquant l'absence de l'amplification du gène HER2.

Les signaux vert et rouge sont observés à l'aide d'un mélange de sondes de kit, ce dernier utilise un mélange de sondes IQISH non toxique prêt à l'emploi basé sur l'association des technologies PNA (acide nucléique peptidique) et ADN. Il est composé d'un mélange d'ADN marquées au Texas Red couvrant une région de 218 kb incluant le gène HER2 sur le chromosome 17, et d'un mélange de PNA marquées à la fluorescéine ciblant la région centromérique du chromosome 17 (CEN-17). L'hybridation spécifique sur ces deux cibles entraîne la formation d'un signal fluorescent rouge net au niveau de chaque locus du gène HER2 et d'un signal fluorescent vert net au niveau de chaque centromère du chromosome 17 [91].

Les résultats de la FISH rapportés dans le **tableau 4** des 12 cas de LACP (déjà examinés par l'immunohistochimie) montrent une amplification de gène HER2 pour tous les cas avec score 3+ en IHC, alors que pour les cas de score 2+ on note juste l'amplification de trois cas sur les cinq. Rappelons que les cas avec score 3+ sont inclus dans l'étude juste pour la mise en place de la technique, car selon les logigrammes proposés par les sociétés savantes, ces cas ne nécessitent pas la confirmation par la FISH, ainsi le passage direct à la thérapie ciblée anti HER2 demeure nécessaire [3].

La détection de la protéine HER2 est effectuée en première intention par immunohistochimie (IHC), sur coupes histologiques de la tumeur. Le résultat est exprimé sous forme d'un score, prenant en compte l'intensité du marquage membranaire et le pourcentage de cellules marquées dans la composante invasive ou dans la métastase : score 0 ou 1+ (expression négative), score 2+ (expression intermédiaire) et score 3+ (expression forte). Les patientes dont les tumeurs montrent en IHC une expression score 3+ sont éligibles pour le traitement. Pour les tumeurs classées score 2+, la situation est plus complexe, vu la variabilité interindividuelle d'expression de ce récepteur chez les patientes. De ce fait, la détection et la quantification de l'amplification du gène HER2 par la FISH chez les patientes avec score 2+ reste une obligation [3].

Selon les résultats rapportés dans le **tableau n°4** une comparaison a été effectuée entre les résultats d'IHC et nos résultats de la mise en place par la FISH, on note qu'il existe une corrélation variable entre les deux séries de résultats. Tous les cas avec un score de 3+ en immunohistochimie sont amplifiés par la FISH et montrent une corrélation de 100%, alors

que pour les cas avec un score de 2+ en IHC la corrélation IHC/FISH était seulement de 60%.

Ces résultats sont compatibles aux données de la littérature qui confirme l'intérêt majeur de la FISH chez les cas de score 2+ et ce pour une meilleure classification moléculaire du cancer.

De nombreuses études ont montré la relation entre l'expression de la protéine HER2 avec un score de 2+ et l'amplification génique à des fins thérapeutiques, M. Wesoła et al rapportaient que la surexpression de la protéine HER2 n'est pas relative à l'amplification du gène HER2, toutefois les patientes atteintes d'un cancer du sein présentant l'amplification du gène HER2 sans surexpression de la protéine ne bénéficient pas d'une thérapie anti HER2 [92].

Deux études supplémentaires ont conclu que les cas de cancer du sein diagnostiqués par immunohistochimie présentaient une surexpression du récepteur HER2 avec un score de 2+, montrent souvent une faible amplification du gène HER2 [93] [94].

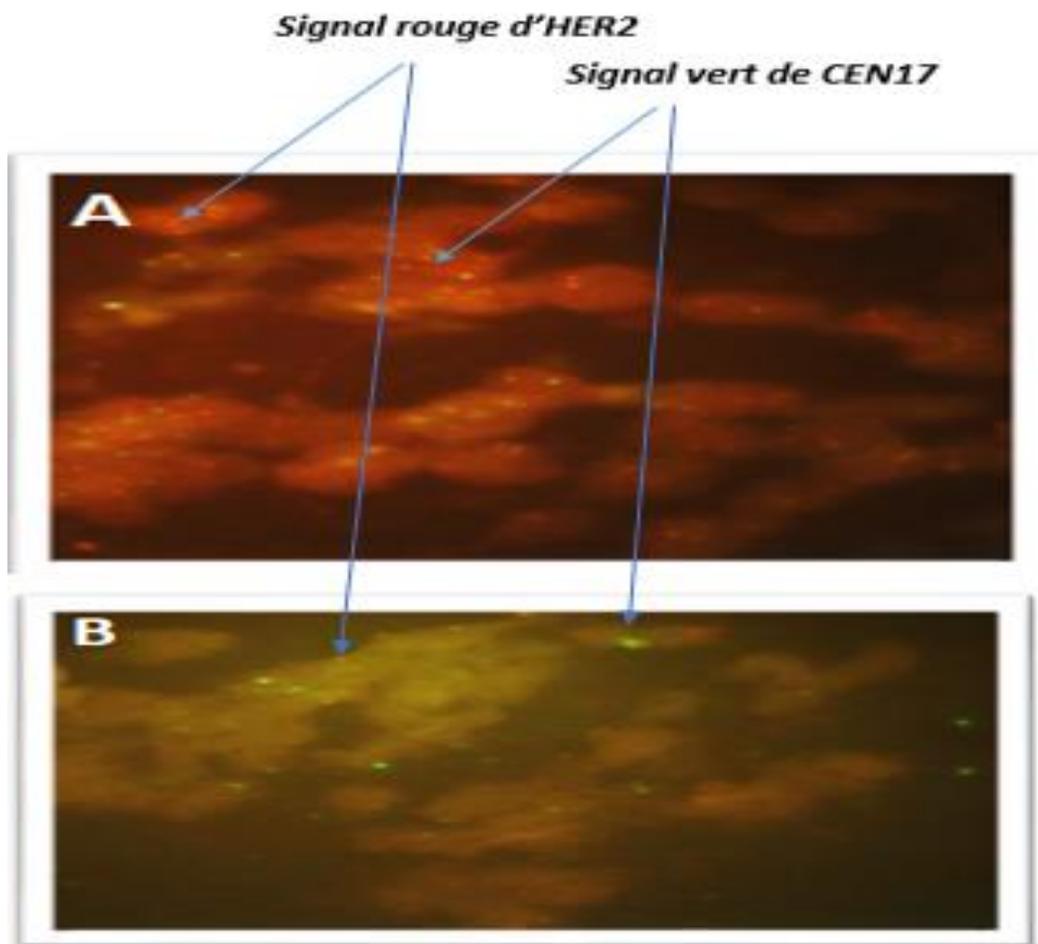


Figure 27: Images vues au microscope à épi fluorescence au grossissement $\times 100$, montrant l'amplification du gène HER2

A : Amplification du gène HER2 détectée par FISH (signaux rouges : HER2 ; signaux verts : centromères du chromosome 17).

B : Absence de l'amplification du gène HER2

La figure 27 présente deux images A et B montre respectivement la présence et l'absence de l'amplification du gène HER2.

Tableau 5: Comparaison entre les résultats de la mise en place et les résultats du laboratoire externe effectué par la FISH

Les cas	Résultats FISH des laboratoires externes		Résultats FISH de la mise en place	
	rapport HER2/CEN17	commentaires	(rapport HER2/CEN17)	commentaires
1	-	Amplifier	3,6	Amplifier
2	-	Amplifier	2,7	Amplifier
3	-	Amplifier	2,2	Amplifier
4	-	Amplifier	3,3	Amplifier
5	-	Amplifier	3	Amplifier
6	-	Amplifier	2,2	Amplifier
7	-	Amplifier	2	Amplifier
8	-	Amplifier	2,8	Amplifier
9	-	Amplifier	3	Amplifier
10	-	Amplifier	2,3	Amplifier
11	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
12	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
13	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
14	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
15	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
16	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
17	1	Non amplifier	1	Non Amplifier
18	2.2	Amplifier	2	Amplifier
19	3.7	Amplifier	3,6	Amplifier
20	3	Amplifier	3,3	Amplifier

*-=*non reçu*

* *rapport HER2/CEN-17 < 2 : aucune amplification du gène HER2 observée*

**rapport ≥ 2 : amplification du gène HER2 observée.*

Le tableau 5 montre une amplification variable du gène HER2 chez les cas examinés par la FISH de la mise en place (13 cas amplifiés sur 20), ainsi la comparaison de nos résultats avec les résultats des laboratoires externes, montre une concordance de 100%.

Selon les données du fabricant du kit HER2 IQFISH pharmDx, une fois que les signaux verts et rouge sont observés on peut confirmer d'une part la grande sensibilité et la spécificité de la technique et d'autre part la performance du protocole en cours de validation. D'après les présents résultats cités ci-dessus on conclut que l'étape de la mise en place de la technique FISH au sein du laboratoire d'anatomie cytopathologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat est réussie mais sous réserve au passage à la deuxième étape de validation des méthodes.

La mise en place de technique FISH au sein de laboratoire pourrait améliorer la prise en charge clinique des patientes atteintes de cancers notamment le cancer du sein et d'instaurer au niveau des hôpitaux marocains la notion de la médecine personnalisée par le biais de la thérapie ciblée.

Conclusion

La FISH est une technique de la cytogénétique moléculaire indispensable dans les laboratoires de pathologie et de cytogénétique. C'est un outil diagnostique qui permet la détection de l'amplification des oncogènes dont l'oncogène HER2 ayant une importance pronostique et thérapeutique dans le cancer du sein,

Les résultats obtenus lors de la mise en place de la technique FISH sur des cas de cancers de sein au LACP Ibn Sina de Rabat, à l'aide du mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH, ont montré une amplification remarquable chez la plupart des cas testés (13 cas amplifiés sur 20 cas), ainsi on note la présence d'une corrélation variable entre les résultats de la mise en place réalisés au laboratoire et ceux de l'immunohistochimie (60% et 100% respectivement pour le score 2+ et le score 3+), cette variabilité montre la limite de la technique d'immunohistochimie dans le cas de score 2+ . Les résultats obtenus par la FISH au laboratoire sont similaires et concordant 100% à ceux des laboratoires externes.

L'amplification de gène HER2 sur les coupes analysées ainsi que la forte corrélation des résultats confirme, que la technique FISH a été bien mise en place au laboratoire d'anatomie cytopathologie d'hôpital Ibn Sina à Rabat.

La mise en marche de la technique au sein du laboratoire nécessite le passage à l'étape de validation des méthodes qui est en cours d'exploration et d'étude par les anatomo-pathologistes du service.

Références bibliographiques

- [1] H. Sancho-Garnier et M. Colonna, « Épidémiologie des cancers du sein », *Presse Médicale*, vol. 48, n° 10, p. 1076-1084, oct. 2019, doi: 10.1016/j.lpm.2019.09.022.
- [2] J. Baselga et S. M. Swain, « Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3 », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 9, n° 7, p. 463-475, juill. 2009, doi: 10.1038/nrc2656.
- [3] J. Couturier, A. Vincent-Salomon, M.-C. Mathieu, A. Valent, et A. Bernheim, « Diagnostic de l'amplification du gène HER2 dans les cancers du sein », *Pathol. Biol.*, vol. 56, n° 6, p. 375-379, sept. 2008, doi: 10.1016/j.patbio.2008.03.009.
- [4] P.-J. Lamy, G. Romieu, P. Rouanet, et W. Jacot, « Classification moléculaire des cancers du sein : utilité en clinique », *Médecine Nucl.*, vol. 34, n° 1, p. 32-43, janv. 2010, doi: 10.1016/j.mednuc.2009.11.004.
- [5] G. MacGrogan, G. Pérot, et H. Bonnefoi, « Détermination du statut de Her2 dans le cancer du sein : état des lieux en 2014 », p. 7, 2014.
- [6] F. Barlesi *et al.*, « Routine molecular profiling of patients with advanced non-small-cell lung cancer: results of a 1-year nationwide programme of the French Cooperative Thoracic Intergroup (IFCT) », *The Lancet*, vol. 387, n° 10026, p. 1415-1426, avr. 2016, doi: 10.1016/S0140-6736(16)00004-0.
- [7] Penault-Llorca F, Vincent-Salomon A, Bellocq JP et al. Mise à jour des recommandations du GEPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France. *Ann Pathol* 2010;30(5):357-73
- [8] A. Nkondjock et P. Ghadirian, « Facteurs de risque du cancer du sein », *médecine/sciences*, vol. 21, n° 2, p. 175-180, févr. 2005, doi: 10.1051/medsci/2005212175.
- [9] « Cancer du sein ». <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer> (consulté le 13 septembre 2022).
- [10] P. Merviel *et al.*, « Existe-t-il encore des facteurs de risque de survenue d'un cancer du sein ? », *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, vol. 39, n° 9, p. 486-490, sept. 2011, doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.10.015.

- [11] N. Ravanel, F. X. Brand, D. Pasquier, M. Mousseau, et A. S. Gauchez, « Cerb-B2 ou Her-2 : marqueur d'intérêt dans la prise en charge du cancer du sein ? », *Immuno-Anal. Biol. Spéc.*, vol. 20, n° 2, p. 92-95, avr. 2005, doi: 10.1016/j.immbio.2005.01.002.
- [12] M. Pluot, V. Cahn, et A. Ducarre, « C , ophtalmologique : inter& et lirnites », p. 11.
- [13] C. Hamard *et al.*, « IHC, FISH, CISH, NGS dans les cancers bronchiques non à petites cellules : quelles évolutions dans l'ère des biomarqueurs ? », *Rev. Pneumol. Clin.*, vol. 74, n° 5, p. 327-338, oct. 2018, doi: 10.1016/j.pneumo.2018.09.013.
- [14] C. Hamard *et al.*, « IHC, FISH, CISH, NGS dans les cancers bronchiques non à petites cellules : quelles évolutions dans l'ère des biomarqueurs ? », *Rev. Pneumol. Clin.*, vol. 74, n° 5, p. 327-338, oct. 2018, doi: 10.1016/j.pneumo.2018.09.013.
- [15] S. Dimassi, M. Tilla, et D. Sanlaville, « Anomalies chromosomiques », *J. Pédiatrie Puériculture*, vol. 30, n° 5-6, p. 249-270, nov. 2017, doi: 10.1016/j.jpp.2017.09.007.
- [16] M. W. Naim, « Présentée et soutenue publiquement le : 12/01/202 », p. 136.
- [17] A. Kallioniemi *et al.*, « Comparative Genomic Hybridization for Molecular Cytogenetic Analysis of Solid Tumors », *Science*, vol. 258, n° 5083, p. 818-821, oct. 1992, doi: 10.1126/science.1359641.
- [18] D. Pinkel *et al.*, « Pinkel D, Se Graves R, Sudar D, Clark S, Poole I, Kowbel D, Collins C, Kuo WL, Chen C, Zhai Y, Dairkee SH, Ljung BM, Gray JW, and Albertson DG. High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. Nat Genet 20: 207-211 », *Nat. Genet.*, vol. 20, p. 207-11, nov. 1998, doi: 10.1038/2524.
- [19] S. Solinas-Toldo *et al.*, « Matrix-based comparative genomic hybridization: Biochips to screen for genomic imbalances », *Genes. Chromosomes Cancer*, vol. 20, n° 4, p. 399-407, déc. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1098-2264(199712)20:4<399::AID-GCC12>3.0.CO;2-I.
- [20] G. A. Meijer, M. A. Hermsen, S. G. Meuwissen, et P. Baak, « L'hybridation g(nomique comparative ouvre de nouvelles perspectives dans l'exploration des modifications qui a c c o m p a g n e n t les I(sions (pr(-)malignes du tube digestif », *Acta Endosc.*, vol. 27, p. 11, 1997.

- [21] D. Sanlaville *et al.*, « La CGH microarray : principe et applications en pathologie constitutionnelle », *Arch. Pédiatrie*, vol. 12, n° 10, p. 1515-1520, oct. 2005, doi: 10.1016/j.arcped.2005.07.014.
- [22] A. Ferrarini, S. Jacquemont, M. B. Popovic, L. Bonafé, et D. Martinet, « Puce à ADN : pourquoi et pour qui ? », *Rev. Médicale Suisse*, p. 6, 2010.
- [23] F. Vialard et D. Molina Gomes, « Les nouvelles technologies d'analyse du génome : quelles utilisations en diagnostic prénatal », *Gynécologie Obstétrique Fertil.*, vol. 39, n° 1, p. 32-41, janv. 2011, doi: 10.1016/j.gyobfe.2010.09.006.
- [24] J. Andrieux, « Pucés à ADN (CGH-array) : application pour le diagnostic de déséquilibres cytogénétiques cryptiques », *Pathol. Biol.*, vol. 56, n° 6, p. 368-374, sept. 2008, doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.011.
- [25] S. Romana et V. Malan, « Cytogénétique moléculaire », p. 25.
- [26] J. G. Gall et M. L. Pardue, « FORMATION AND DETECTION OF RNA-DNA HYBRID MOLECULES IN CYTOLOGICAL PREPARATIONS », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 63, n° 2, p. 378-383, juin 1969, doi: 10.1073/pnas.63.2.378.
- [27] G. F. Saunders, T. C. Hsu, M. J. Getz, E. L. Simes, et F. E. Arrighi, « Locations of a Human Satellite DNA in Human Chromosomes », *Nature. New Biol.*, vol. 236, n° 69, p. 244-246, avr. 1972, doi: 10.1038/newbio236244a0.
- [28] K. W. Jones, J. Prosser, G. Corneo, et E. Ginelli, « The chromosomal location of human satellite DNA III », *Chromosoma*, vol. 42, n° 4, p. 445-451, 1973, doi: 10.1007/BF00399411.
- [29] M. E. Harper et G. F. Saunders, « Localization of single copy DNA sequences on G-banded human chromosomes by in situ hybridization », *Chromosoma*, vol. 83, n° 3, p. 431-439, juill. 1981, doi: 10.1007/BF00327364.
- [30] D. S. Gerhard, E. S. Kawasaki, F. C. Bancroft, et P. Szabo, « Localization of a unique gene by direct hybridization in situ. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 78, n° 6, p. 3755-3759, juin 1981, doi: 10.1073/pnas.78.6.3755.
- [31] N. Abdelmoula, M. Portnoi, F. Vialard, A. Amouri, J. Van den Akker, et J. Taillemite, « Les techniques de cytogénétique moléculaire : principes et progrès. », *médecine/sciences*, vol. 16, n° 12, p. 1405, 2000, doi: 10.4267/10608/1596.

- [32] D. Pinkel, T. Straume, et J. W. Gray, « Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 83, n° 9, p. 2934-2938, mai 1986, doi: 10.1073/pnas.83.9.2934.
- [33] D. Pinkel *et al.*, « Fluorescence in situ hybridization with human chromosome-specific libraries: detection of trisomy 21 and translocations of chromosome 4. », *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 85, n° 23, p. 9138-9142, déc. 1988, doi: 10.1073/pnas.85.23.9138.
- [34] T. Cremer *et al.*, « Detection of chromosome aberrations in the human interphase nucleus by visualization of specific target DNAs with radioactive and non-radioactive in situ hybridization techniques: diagnosis of trisomy 18 with probe L1.84 », *Hum. Genet.*, vol. 74, n° 4, p. 346-352, déc. 1986, doi: 10.1007/BF00280484.
- [35] A. Moter et U. B. Göbel, « Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms », *J. Microbiol. Methods*, vol. 41, n° 2, p. 85-112, juill. 2000, doi: 10.1016/S0167-7012(00)00152-4.
- [36] J.-P. Siffroi et S. Chantot-Bastaraud, « L'avenir de la cytogénétique après le séquençage du génome humain », *Morphologie*, vol. 88, n° 280, p. 19-23, avr. 2004, doi: 10.1016/S1286-0115(04)97993-3.
- [37] C. J. Harrison *et al.*, « Interphase molecular cytogenetic screening for chromosomal abnormalities of prognostic significance in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a UK Cancer Cytogenetics Group Study », *Br. J. Haematol.*, vol. 129, n° 4, p. 520-530, 2005, doi: 10.1111/j.1365-2141.2005.05497.x.
- [38] N. Santos, V. Fagundes, Y. Yonenaga-Yassuda, et M. De Souza Jose, « Comparative Karyology of Brazilian Vampire Bats *Desmodus Rotundus* and *Diphylla Ecaudata* (Phyllostomidae, Chiroptera): Banding Patterns, Base-Specific Fluorochromes and FISH of Ribosomal Genes », *Hereditas*, vol. 134, n° 3, p. 189-194, 2001, doi: 10.1111/j.1601-5223.2001.00189.x.
- [39] K. Pomianowski, M. Jankun, et K. Ocalewicz, « Detection of interstitial telomeric sequences in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) (Teleostei: Salmonidae) », *Genome*, vol. 55, n° 1, p. 26-32, janv. 2012, doi: 10.1139/g11-073.
- [40] E. J. Tawn, C. A. Whitehouse, D. Holdsworth, K. De Ruyck, K. Vandenbulcke, et H. Thierens, « mBAND analysis of chromosome aberrations in lymphocytes exposed

- in vitro* to α -particles and γ -rays », *Int. J. Radiat. Biol.*, vol. 84, n° 6, p. 447-453, janv. 2008, doi: 10.1080/09553000802078412.
- [41] S. W. Paddock, « Imaging techniques: Picture the world with kaleidoscope dyes », *Curr. Biol.*, vol. 7, n° 3, p. R182-R185, mars 1997, doi: 10.1016/S0960-9822(97)70084-8.
- [42] M. A. Micale, « Classical and Molecular Cytogenetic Analysis of Hematolymphoid Disorders », in *Hematopathology*, D. Crisan, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2011, p. 39-78. doi: 10.1007/978-1-60761-262-9_2.
- [43] F. Maude, P. Marie-Eléonore, et S. Delphine, « FISH Fluorescence in situ hybridization », p. 20.
- [44] L. Hammock, M. Lewis, C. Phillips, et C. Cohen, « Strong HER-2/neu protein overexpression by immunohistochemistry often does not predict oncogene amplification by fluorescence in situ hybridization1 1This manuscript consists of original material not previously accepted for publication by another journal. The manuscript does not include use of any investigational or “off-label” products. The authors do not have a financial or other relationship with any of the commercial enterprises whose products or services may be discussed in this original article. », *Hum. Pathol.*, vol. 34, n° 10, p. 1043-1047, oct. 2003, doi: 10.1053/S0046-8177(03)00409-X.
- [45] J. Anastasi, M. M. Le Beau, J. W. Vardiman, et C. A. Westbrook, « Detection of numerical chromosomal abnormalities in neoplastic hematopoietic cells by in situ hybridization with a chromosome-specific probe. », *Am. J. Pathol.*, vol. 136, n° 1, p. 131-139, janv. 1990.
- [46] C. Mckeown, « Rapid interphase FISH diagnosis of trisomy 18 on blood smears », *The Lancet*, vol. 340, n° 8817, p. 495, août 1992, doi: 10.1016/0140-6736(92)91823-Q.
- [47] V. R. Babu et A. Wiktor, « A fluorescence in situ hybridization technique for retrospective cytogenetic analysis », *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 57, n° 1, p. 16-17, 1991, doi: 10.1159/000133104.

- [48] R. E. Kibbelaar *et al.*, « Detection of trisomy 8 in hematological disorders by in situ hybridization », *Cytogenet. Genome Res.*, vol. 56, n° 3-4, p. 132-136, 1991, doi: 10.1159/000133069.
- [49] J. Anastasi, M. Le Beau, J. Vardiman, A. Fernald, R. Larson, et J. Rowley, « Detection of trisomy 12 in chronic lymphocytic leukemia by fluorescence in situ hybridization to interphase cells: a simple and sensitive method », *Blood*, vol. 79, n° 7, p. 1796-1801, avr. 1992, doi: 10.1182/blood.V79.7.1796.1796.
- [50] C. M. Price, « Fluorescence in situ hybridization », *Blood Rev.*, vol. 7, n° 2, p. 127-134, juin 1993, doi: 10.1016/S0268-960X(05)80023-2.
- [51] A. Kuwano *et al.*, « Molecular dissection of the Prader-Willi/Angelman syndrome region (15q11–13) by YAC cloning and FISH analysis », *Hum. Mol. Genet.*, vol. 1, n° 6, p. 417-425, 1992, doi: 10.1093/hmg/1.6.417.
- [52] J. A. Fantes, W. A. Bickmore, J. M. Fletcher, F. Ballesta, I. M. Hanson, et V. van Heyningen, « Submicroscopic deletions at the WAGR locus, revealed by nonradioactive in situ hybridization. », *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 51, n° 6, p. 1286-1294, déc. 1992.
- [53] M. B. K. Lambros, R. Natrajan, et J. S. Reis-Filho, « Chromogenic and fluorescent in situ hybridization in breast cancer », *Hum. Pathol.*, vol. 38, n° 8, p. 1105-1122, août 2007, doi: 10.1016/j.humpath.2007.04.011.
- [54] N. Douet-Guilbert, A. Basinko, M.-J. Le Bris, A. Herry, F. Morel, et M. De Braekeleer, « Stratégies d'identification des marqueurs chromosomiques surnuméraires en cytogénétique constitutionnelle », *Pathol. Biol.*, vol. 56, n° 6, p. 362-367, sept. 2008, doi: 10.1016/j.patbio.2008.03.012.
- [55] H. Marijon et F. André, « Her2 : un modèle de cible thérapeutique », *Bull. Cancer (Paris)*, vol. 98, n° 9, p. 1011-1017, sept. 2011, doi: 10.1684/bdc.2011.1379.
- [56] A. Conde-Perez *et al.*, « A caveolin-dependent and PI3K/AKT-independent role of PTEN in β -catenin transcriptional activity », *Nat. Commun.*, vol. 6, n° 1, p. 8093, nov. 2015, doi: 10.1038/ncomms9093.
- [57] R. Abdelmaksoud-Dammak, A. Saadallah-Kallel, I. Miladi-Abdennadher, A. Khabir, T. Sallemi-Boudawara, et E. R. Mokdad-Gargouri, « MUTATIONS DU GENE

KRAS CHEZ LES PATIENTS DU SUD TUNISIEN ATTEINT DE CANCER
COLORECTAL: SIGNIFICATION CLINIQUE », p. 6.

- [58] K. Lai, M. C. Killingsworth, et C. S. Lee, « Gene of the month: *PIK3CA* », *J. Clin. Pathol.*, vol. 68, n° 4, p. 253-257, avr. 2015, doi: 10.1136/jclinpath-2015-202885.
- [59] S. Ménard, E. Tagliabue, M. Campiglio, et S. Pupa, « Role of HER2 gene overexpression in breast carcinoma », *J. Cell. Physiol.*, vol. 182, p. 150-162, févr. 2000, doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200002)182:2<150::AID-JCP3>3.0.CO;2-E.
- [60] V. Diéras, « Nouvelles thérapeutiques ciblant le récepteur HER2 New anti-HER2 therapeutic strategies », *MISE AU POINT*, p. 5.
- [61] H.-S. Cho *et al.*, « Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab », *Nature*, vol. 421, n° 6924, p. 756-760, févr. 2003, doi: 10.1038/nature01392.
- [62] M. A. R. Afaf, « Cancer gastrique ou de la jonction oeso-gastrique metastatique Récepteur HER2 - Immunohistochimie - Thérapie ciblée JURY », p. 92.
- [63] B. Zhou, « Dysregulation of cellular signaling by HER2 in breast cancer », *Semin. Oncol.*, vol. 30, p. 38-48, oct. 2003, doi: 10.1053/j.seminoncol.2003.08.006.
- [64] N. E. Hynes et H. A. Lane, « ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 5, n° 5, p. 341-354, mai 2005, doi: 10.1038/nrc1609.
- [65] M. D. Marmor, K. B. Skaria, et Y. Yarden, « Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors », *Int. J. Radiat. Oncol.*, vol. 58, n° 3, p. 903-913, mars 2004, doi: 10.1016/j.ijrobp.2003.06.002.
- [66] D. Graus-Porta, « ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling », *EMBO J.*, vol. 16, n° 7, p. 1647-1655, avr. 1997, doi: 10.1093/emboj/16.7.1647.
- [67] B. Nawrocki-Raby, « Contrôle de la progression tumorale broncho-pulmonaire par FHIT : Implication du récepteur HER2 », p. 144.
- [68] M. A. Lemmon et J. Schlessinger, « Cell Signaling by Receptor Tyrosine Kinases », *Cell*, vol. 141, n° 7, p. 1117-1134, juin 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.06.011.

- [69] P. Blume-Jensen et T. Hunter, « Oncogenic kinase signalling », *Nature*, vol. 411, n° 6835, p. 355-365, mai 2001, doi: 10.1038/35077225.
- [70] M. J. Wieduwilt et M. M. Moasser, « The epidermal growth factor receptor family: Biology driving targeted therapeutics », *Cell. Mol. Life Sci.*, vol. 65, n° 10, p. 1566-1584, mai 2008, doi: 10.1007/s00018-008-7440-8.
- [71] S. Watson et C. Louvet, « Mutations activatrices de HER2 et oncogenèse : des mécanismes biologiques aux enjeux thérapeutiques », p. 5.
- [72] T. Holbro et N. E. Hynes, « ErbB Receptors: Directing Key Signaling Networks Throughout Life », *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, vol. 44, n° 1, p. 195-217, févr. 2004, doi: 10.1146/annurev.pharmtox.44.101802.121440.
- [73] N. Normanno *et al.*, « Epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling in cancer », *Gene*, vol. 366, n° 1, p. 2-16, janv. 2006, doi: 10.1016/j.gene.2005.10.018.
- [74] A. Citri, « The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3 », *Exp. Cell Res.*, vol. 284, n° 1, p. 54-65, mars 2003, doi: 10.1016/S0014-4827(02)00101-5.
- [75] N. V. Sergina et M. M. Moasser, « The HER family and cancer: emerging molecular mechanisms and therapeutic targets », *Trends Mol. Med.*, vol. 13, n° 12, p. 527-534, déc. 2007, doi: 10.1016/j.molmed.2007.10.002.
- [76] I. Vivanco et C. Sawyers, « The Phosphatidylinositol 3 Kinase AKT Pathway in human cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 2, p. 489-501, août 2002, doi: 10.1038/nrc839.
- [77] G. Song, G. Ouyang, et S. Bao, « The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival », *J. Cell. Mol. Med.*, vol. 9, n° 1, p. 59-71, janv. 2005, doi: 10.1111/j.1582-4934.2005.tb00337.x.
- [78] J. Avruch, « MAP kinase pathways: The first twenty years », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1773, n° 8, p. 1150-1160, août 2007, doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.11.006.
- [79] Z. Li *et al.*, « Leptin Induces Cyclin D1 Expression and Proliferation of Human Nucleus Pulposus Cells via JAK/STAT, PI3K/Akt and MEK/ERK Pathways », *PLoS ONE*, vol. 7, n° 12, p. e53176, déc. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0053176.
- [80] M. Wahl et G. Carpenter, « Selective phospholipase C activation », *BioEssays*, vol. 13, n° 3, p. 107-113, mars 1991, doi: 10.1002/bies.950130303.

- [81] J. R. Grandis et J. C. Sok, « Signaling through the epidermal growth factor receptor during the development of malignancy », *Pharmacol. Ther.*, vol. 102, n° 1, p. 37-46, avr. 2004, doi: 10.1016/j.pharmthera.2004.01.002.
- [82] E. B. Haura, J. Turkson, et R. Jove, « Mechanisms of Disease: insights into the emerging role of signal transducers and activators of transcription in cancer », *Nat. Clin. Pract. Oncol.*, vol. 2, n° 6, p. 315-324, juin 2005, doi: 10.1038/ncponc0195.
- [83] K. M. Quesnelle, A. L. Boehm, et J. R. Grandis, « STAT-mediated EGFR signaling in cancer », *J. Cell. Biochem.*, vol. 102, n° 2, p. 311-319, oct. 2007, doi: 10.1002/jcb.21475.
- [84] T.-H. Leu, « Functional implication of the interaction between EGF receptor and C-SRC », *Front. Biosci.*, vol. 8, n° 6, p. s28-38, 2003, doi: 10.2741/980.
- [85] M. Guarino, « Src signaling in cancer invasion », *J. Cell. Physiol.*, p. n/a-n/a, 2009, doi: 10.1002/jcp.22011.
- [86] J. D. Silva, « Présentée et soutenue publiquement par », p. 149.
- [87] N. Iqbal et N. Iqbal, « Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) in Cancers: Overexpression and Therapeutic Implications », *Mol. Biol. Int.*, vol. 2014, p. 1-9, sept. 2014, doi: 10.1155/2014/852748.
- [88] T. Holbro, « The ErbB receptors and their role in cancer progression », *Exp. Cell Res.*, vol. 284, n° 1, p. 99-110, mars 2003, doi: 10.1016/S0014-4827(02)00099-X.
- [89] « a-tuve-de-laboratoire-0.jpg (300×300) ».
https://www.hellopro.fr/images/page_conseil/4/7/8/a-tuve-de-laboratoire-0.jpg (consulté le 13 septembre 2022).
- [90] « 0ZAGF-02-03.jpg (800×737) ».
<https://www.dutscher.com/images/products/0ZAGF-02-03.jpg> (consulté le 13 septembre 2022).
- [91] HER2 IQFISH pharmDx Code K5731 , DAKO
- [92] M. Wesola et M. Jeleń, « A Comparison of IHC and FISH Cytogenetic Methods in the Evaluation of HER2 Status in Breast Cancer », *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 24, n° 5, p. 899-904, 2015, doi: 10.17219/acem/27923.

- [93] A. Medjdoub, Z. Tahari, T. Sahraoui, et F. Z. El Kebir, « Étude du profil d'expression de la protéine HER2 dans 50 cas de cancers mammaires dans la wilaya d'Oran », *J. Afr. Cancer Afr: J. Cancer*, vol. 1, n° 3, p. 127-129, août 2009, doi: 10.1007/s12558-009-0025-0.
- [94] T. Yano *et al.*, « Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer », *Oncol. Rep.*, janv. 2006, doi: 10.3892/or.15.1.65.
- [95] I. D. Odell et D. Cook, « Immunofluorescence Techniques », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 133, n° 1, p. 1-4, janv. 2013, doi: 10.1038/jid.2012.455.

Annexes

Annexe 1 : Présentation de cadre de travail

1. Laboratoire d'anatomopathologie et cytologie de l'hôpital Ibn Sina de Rabat

L'Hôpital Ibn Sina de Rabat, inauguré en 1954, fait partie intégrante du Centre Hospitalier Ibn Sina. Il a pour mission de dispenser les soins médicaux, d'effectuer des recherches scientifiques, de participer à l'enseignement clinique universitaire et de concourir à la réalisation des objectifs fixés en matière de Santé Publique. Le laboratoire d'anatomie cytopathologie fait partie de services de l'hôpital, il est localisé dans le rez de chaussée de l'hôpital a pour mission de faire les analyses d'anatomie cytopathologie sur des pièces opératoires et des biopsies de l'hôpital.

L'anatomie et cytologie pathologiques est une spécialité médicale qui étudie les modifications morphologiques, phénotypiques et moléculaires des tissus au cours de processus pathologiques divers. Par conséquent, cette discipline revêt une grande importance dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge globale des patients.

Elle se sert des connaissances fondamentales d'anatomie, d'histologie et de cytologie normales pour reconnaître des anomalies morphologiques liées à la maladie. Elle s'appuie sur des techniques de macroscopie, de microscopie, d'immunohistochimie, de cytogénétique... Cette spécialité médicale a pour mission d'établir un diagnostic et suivre le traitement d'un cancer. L'obtention d'un diagnostic histologique avant le traitement d'un cancer est indispensable.

2. Cheminement d'un échantillon dans le laboratoire

Chaque prélèvement que ce soit biopsie ou pièces opératoire doit passer par les étapes suivantes :

a. La réception

Chaque prélèvement de n'importe qu'il type de tissu doit passer premièrement par l'étape de la réception et doit être aussi fixé au formol à l'état frais, chaque prélèvement est menue d'une fiche qui porte les informations de patient (le nom, l'âge, le médecin

traitant, ...), par la suite les membres de la salle de réception écrivent un numéro d'identification propre au patient sur le prélèvement et même sur la fiche. Et enfin ils donnent un rendez-vous au patient pour avoir le résultat. Tous les échantillons reçus sont inscrits dans un registre d'admission.

b. Enregistrement des échantillons dans le système informatique du laboratoire

Au cours de l'enregistrement des échantillons dans le système informatique du laboratoire, un numéro d'identification est attribué. Ce numéro identifiera l'échantillon tout au long du processus.

c. La macroscopie et le lancement

- Si le prélèvement reçu est une pièce opératoire dans ce cas-là les médecins résidants qui font la macroscopie commence premièrement par la fixation des pièces reçu dans le formol à l'état frais pendant 24h à 48h, on note que chaque prélèvement doit passer par l'étape de la vérification de la concordance de l'identité du patient et le numéro ,qui est déjà donner par les membres de la réception , sur la fiche et sur l'échantillon. La pièce opératoire est ensuite déposer sur la hôte de la macroscopie (**figure 28**) et les médecins résidants doit photographier, noter le type de la pièce opératoire, prendre les mesures en cm et le pesée en g ou kg, observer s'il y a des lésions, nodules, tumeur ou quelques choses anormales en précisant la localisation tumorale, la taille de la tumeur, son poids, sa couleur, sa forme, sa délimitation, sa consistance, son aspect. Ensuite dans des cassettes les médecins résidants doit prendre un échantillon de tumeur, lésion ou de nodule et aussi de la limite chirurgicale et noter le numéro de la pièce sur la ou les cassettes le nombre de ces derniers doit être noté sur la fiche.
- Si le prélèvement reçu est une biopsie, qui est déjà fixé au formol, dans ce cas-là les techniciens qui font le lancement c'est-à-dire la position de la totalité de la biopsie dans une cassette ou bien dans des cassettes, si la biopsie est grande, après avoir noté les mesures, le nombre et le type de chaque biopsie et après vérification de la concordance de l'identité du patient et le numéro sur la fiche et sur le flacon.



Figure 28: l'hôte et les matériels de la macroscopie (prise dans la salle de macroscopie à LACP Ibn Sina, Rabat)

d. La circulation :

Les cassettes qui incluent l'échantillon passent à la suite par une étape de circulation dans l'appareil de circulation pendant toute la nuit (**figure 29**). Dans cette étape les cassettes vont prolanger dans une série de bain bien ordonnées par la suite :

2 bains de formol : pour bien fixer les échantillons.

4 bains d'alcool : permet d'extraire toute l'eau du tissu (déshydratation).

3 bains de toluène : permet de clarifier le tissu afin de remplacer l'agent déshydratant (alcool) par le *toluène*.

3bain de paraffine : c'est la dernière étape dans la circulation dans le but est d'imprégner les tissus dans la paraffine, cette dernière est la même utilisé dans l'étape suivante de l'enrobage.

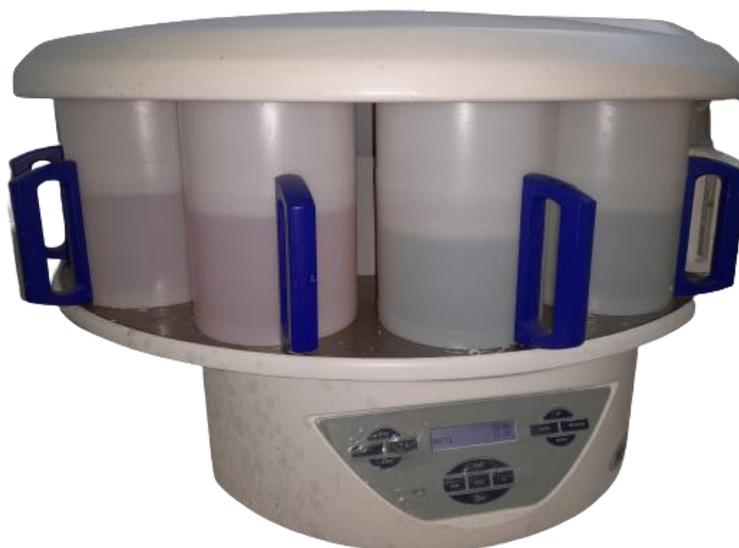


Figure 29: Appareil de circulation (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

e. L'enrobage :

Le but de l'enrobage (**figure 30**) c'est de confectionner les pièces et les biopsies dans des blocks de paraffine (**figure 31**) afin de faciliter la coupe au microtome et d'assurer une meilleure conservation du tissu par la suite. Dans cette partie, les cassettes sont mises en place dans une zone chaude, les fragments déjà mise dans des cassettes sont disposés selon leurs tailles dans des moules (**figure 32**) correspondants, le tout est ensuite rempli par la paraffine chaude. Les moules sont mise en places sur une plaque refroidissante puis démoulés afin d'obtenir le bloc.



Figure 30: Appareil de l'enrobage (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)



Figure 31: Blocks de paraffine prêts pour la coupe (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)



Figure 32: Les moules d'enrobage (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

f. Le triage

C'est le classement des blocs de biopsies et de pièces opératoire selon les fiches. Cette étape est nécessaire pour vérifier si le nombre de blocs est compatible avec le nombre indiqué dans la fiche.

g. La microtomie

Les blocs sont disposés dans un support au niveau du microtome (**figure**) 33, ce support doit être parallèle avec le support de lame de rasoir, en contrôlant ce dernier, puis on réalise des coupes de 3 μ m de plusieurs niveaux du fragment à l'aide de lame de rasoir. Ensuite on dépose la coupe sur une lame blanche, à l'aide d'un bain marie contient l'eau avec un peu de gélatine pour faire coller la coupe sur la lame, on enlève le bloc du microtome et on identifie les lames, et enfin on met ces dernier dans l'étuve à une température entre 100 et 120 C° pendant 10min en position horizontale et 10min en position verticale pour éliminer le paraffine qui entoure le tissu.



Figure 33: Microtome automatique (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

h. La coloration hématoxyline éosine (HE)

Coloration standard : Après le déparaffinage partiel dans l'étuve les lames sont prêtes pour la coloration de routine HE, la procédure de l'HE est la suivante :

Prolonger les lames dans 4 bain de toluène chacun pendant 10min pour bien déparaffiner les tissu - rincer les lames à l'eau courant de robinet – bien rincer les lames dans trois bains d'alcool (30 second pour chacun), Il convient de bien agiter les lames dans chaque bain et de les égoutter entre deux passages, particulièrement entre le 4^{ème} bain de toluène et le 1^{er} bain d'alcool, sans laisser sécher les coupes – lavage à l'eau de robinet - prolonger les lames dans le colorant d'hémalun pendant 3 à 7 min – lavage à l'eau de robinet – rinçage dans le carbonate de lithium pendant 30 second - rinçage à l'eau – rinçage dans l'alcool – et en fin les lames sont prolonger dans un bain de toluène pendant 10min.

Coloration spéciale : parfois les médecins anatomopathologistes demandent des colorations spéciales par exemple la coloration de Trichrome de Masson qui mettent en évidence les fibres conjonctives, PAS pour les glucides, le rouge Congo...



Figure 34: appareil contenant les bains de coloration HE (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

i. Le montage :

Le montage des lames consiste à appliquer une lamelle sur la lame à l'aide d'une colle aqueuse spécifique afin de protéger le tissu.

j. L'immunohistochimie :

L'immunohistochimie (IHC) est une technique de routine dans le laboratoire d'anatomie cytopathologie, permet de révéler l'expression de certaines protéines dans les cellules cancéreuses à l'aide d'une réaction antigène-anticorps. L'IHC se réalise en plusieurs étapes :

- Couper les blocs de 3 à 4µm à l'aide d'un microtome et les étaler sur les lames
- Laisser dans l'étude à 37° pendant toute la nuit
- Déparaffinage des coupes dans 2 bains de toluène, 10 min chacun
- Réhydratation dans 2 bains d'alcool, 5min chacun
- Rinçage à l'eau courant puis à l'eau distillé
- Démasquage des coupes par chaleur (imprégnation dans une solution de pectine pendant 1h et 10min à une température de 90°C)
- Blocage des peroxydes endogènes pour inhiber les sites antigéniques non spécifiques, en mettant 100µl d'une solution tamponnée contenant de peroxyde d'hydrogène, sur chaque lame pendant 10min
- Application d'un anticorps primaire : Couvrir les lames avec l'anticorps primaire spécifique, pendant 40 à 45 minutes à température ambiante, rincer avec le PBS.
- Application de l'anticorps secondaire: couvrir avec l'anticorps secondaire, incubé (20 à 30 minutes), rincer dans le PBS.
- Coloration et montage : déposer des gouttes d'hémalum pendant 1min et monter avec une lamelle.



Figure 35: appareil de l'immunohistochimie (prise dans LACP, Ibn Sina, Rabat)

k. Examens particuliers :

Immunofluorescence : L'immunofluorescence est une technique de microscopie, elle est utilisée en clinique pour diagnostiquer certaines maladies cutanées par la détection de complexes autoanticorps-antigène [95].

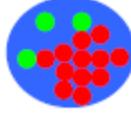
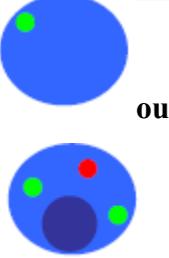
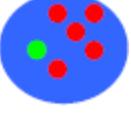
La cytologie : c'est l'étude morphologique et cytologique des tissus biologique afin de détecter les cellules normales ou pathologique. Qui peut être réalisé en plusieurs étapes :

- La réception de liquide biologique à analyser
- La description macroscopique du liquide
- Centrifugation
- Etalement sur la lame
- La coloration MGG (May-Grünwald Giemsa)
- montage

L'extemporané : c'est un examen histologique effectuer dès la réception de tissu, qui est prélever au cours d'une intervention chirurgicale, au laboratoire dont le médecin chirurgien demande un résultat immédiat qui peut orienter l'intervention ou le traitement.

Annexe 2 : Guide de décompte des signaux

Tableau 6: Guide de décompte des signaux [91]

1		Ne pas compter. Les noyaux se chevauchent, certaines zones des noyaux ne sont pas visibles.
2		Deux signaux verts, ne pas évaluer les noyaux avec des signaux d'une seule couleur.
3		Compter comme 3 signaux verts et 12 signaux rouges (estimation d'agrégat).
4		Compter comme 1 signal vert et 1 signal rouge. Deux signaux de même taille et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
5		Ne pas compter (noyaux surdigérés ou sous-digérés). Signaux manquants dans le centre des noyaux (noyaux en forme d'anneau).
6		Compter comme 2 signaux verts et 3 signaux rouges. Deux signaux de même taille et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal.
7		Compter comme 1 signal vert et 5 signaux rouges.
8		Compter comme 3 signaux verts (1 vert flou) et 3 signaux rouges.
9		Agrégat de signaux rouges cachant les signaux verts, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique ou ne pas compter.

Annexe 3 : les flacons de kit IQFISH pharmDx

Tableau 7: Les flacons de kit IQFISH pharmDx [91]

<p>Flacon 1 :</p> <p>Solution de prétraitement (20x)</p> <p>150 mL, concentrée 20x</p> <p>Tampon MES (acide 2-[N-morpholino]éthanesulphonique).</p>	
<p>Flacon 2A :</p> <p>Pepsine</p> <p>4 x 6,0 mL, prête à l'emploi</p> <p>Solution de pepsine, pH 2,0 ; contient un stabilisateur et un agent antimicrobien.</p>	
<p>Flacon 3 :</p> <p>Mélange de sondes HER2/CEN-17 IQISH</p> <p>0,2 mL, prêt à l'emploi</p> <p>Mélange de sondes ADN HER2 marquées au Texas Red et de sondes PNA CEN-17 marquées à la fluorescéine ; fourni dans un tampon d'hybridation IQISH.</p>	
<p>Flacon 4 :</p> <p>Tampon de lavage stringent (20x)</p> <p>150 mL, concentré 20x</p> <p>Tampon SSC (solution saline/citrate de sodium) avec un détergent (Tween-20).</p>	

<p>Flacon 5 :</p> <p>Milieu de montage pour la fluorescence</p> <p>0,4 mL, prêt à l'emploi</p> <p>Milieu de montage pour la fluorescence avec 500 µg/L de DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole).</p>	
<p>Flacon 6 :</p> <p>Tampon de lavage (20x) Wash buffer</p> <p>500 mL, concentré 20x</p> <p>Tampon Tris/HCl.</p>	
<p>Flacon 7 :</p> <p>Étanchéisant pour lamelle de protection</p> <p>1 tube, prêt à l'emploi</p> <p>Solution pour un vernissage supprimable des lamelles de protection.</p>	