



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



Année 2022

N°MM522022

## MEMOIRE DE MASTER

MASTER DE « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »  
OPTION « BIOMEDICALE »

Intitulé

**Statut mutationnel de L'*EGFR*, L'*HER2* et le  
*BRAF* dans le cancer bronchique non à petites  
cellules au Maroc.**

Soutenu le 25 juillet 2022, par :

**Mlle. ZAROUK AHLAM**

Devant le jury composé de

Pr. AANNIZ Tarik

Professeur à la FMPR

Président de jury

Dr. EL MZIBRI Mohammed

Chef DSV à CNESTEN-RABAT

Encadrant

Pr. BENSAID Mounia

ERSSM, HMIMV à RABAT

Examinatrice

## **REMERCIEMENTS**

*Je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné la santé et la volonté d'entamer et de terminer ce mémoire.*

*Tout d'abord, j'adresse mes remerciements à **Pr. OUADGHIRI Mouna** professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de RABAT et coordonnatrice du master, pour son soutien et son encouragement tout au long de cette formation.*

*Je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements à mon encadrant **Dr. EL MZIBRI Mohammed** chef DSV à CNESTEN-RABAT. Je vous remercie pour le temps que vous avez bien voulu me consacrer, pour vos conseils et votre disponibilité permanente. Veuillez trouver dans ce travail le témoignage de ma reconnaissance, ma haute considération et mes sentiments les plus distingués.*

*Ma profonde gratitude et inestimable respect à ma Co-encadrante **Dr. CHAOUI Imane** Chercheur au sein de CNESTEN-RABAT. Je vous remercie pour votre patience, votre disponibilité et surtout pour vos judicieux conseils, veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.*

***Pr. AANNIZ Tarik** c'est un grand honneur que vous me faites en présidant le jury de l'évaluation de mon travail. Veuillez professeur, trouver l'expression de ma profonde reconnaissance et ma haute considération.*

*Je remercie **Dr. BENSALD Mounia** d'avoir acceptée de lire, critiquer et instruire ce travail. Vous trouverez ici l'expression de mon infinie reconnaissance.*

*Je tiens à remercier spécialement **Mr. EL FOUNINI Younes** doctorant au sein de CNESTEN-RABAT, ce travail ne serait pas aussi riche sans*

*votre aide. Merci pour la qualité de votre orientation exceptionnelle, pour votre patience et votre disponibilité durant la préparation de ce mémoire.*

*Je remercie tout particulièrement Mlle. EL AZZOUI Meryem doctorante au sein de CNESTEN-RABAT. Merci pour votre aide pratique, votre soutien moral et vos encouragements.*

*Merci à mes collègues HADDIOUI Lina, ESSAJI Souhaïla et AIT KHOUYA Younes.*

*Mes remerciements s'adressent également à tous mes professeurs pour leurs générosités et la grande patience dont ils ont su faire preuve malgré leurs charges académiques et professionnelles.*

## **DÉDICACE**

*A ma chère mère LAAROUSI FATIHA*

*Sans toi, je ne serai être ce que je suis aujourd'hui. Ce travail est le fruit de tes acharnements et des longues années de sacrifices auxquels tu as consenti, j'espère que j'ai pu te rendre fière de moi. Que Dieu te préserve et t'accorde santé, bonheur et longue vie.*

*A ma chère grand-mère BAHAR MANSOURA*

*Tu as été et tu seras toujours un exemple pour moi par tes qualités humaines et ta persévérance. Tu m'as appris le sens du travail, de l'honnêteté et de la responsabilité. Je ne pourrai jamais assez te remercier pour tout ce que tu as fait pour moi.*

*A mon grand-père LAAROUSI Mohammed*

*Je te remercie pour tout le soutien et amour que vous me portez depuis mon enfance et j'espère que votre bénédiction m'accompagnera toujours.*

*A ERRAHMOUNI Wafae*

*Je te remercie énormément pour ton soutien quotidien, je te souhaite une vie pleine de bonheur.*

*A LAAROUSSI Wafae, LAAROUSI Malak, EL MAKI Anas, EL MAKI Rania ET LAAROUSI Barae*

*Je vous dédie ce modeste travail et je prie Dieu qu'il vous garde.*

*A ma chère sœur EL MZIBRI Wiam*

*Tu es ma sœur, mon amie et ma confidente. Tu as toujours su m'encourager et tu as eu confiance en moi.*

*Tu as beaucoup contribué à la réussite de ce travail par ton soutien, ta compréhension et ton affection sans limites. Que ce travail soit pour toi le témoignage de mon amour et ma reconnaissance.*

*A Dr. BOULLAICH SARA*

*TATA SARA, je te considère comme une deuxième mère, un exemple du courage et de volonté. Que ce travail soit pour toi le témoignage de ma reconnaissance et mes profonds respects pour toi et j'espère avoir été digne de ta confiance.*

*A EL MZIBRI DOUAË ET EL MZIBRI Mohammed AMINE*

*C'est avec amour et affection que je vous dédie ce travail. Je vous souhaite un avenir meilleur et une vie prospère.*

*A KAMOUN Aïcha*

*Puisse ce travail être le reflet de notre amitié sincère et de nos beaux souvenirs en commun. Que Dieu te garde et t'omble de santé et de prospérité.*

*A tous les membres de la famille LAAROUSI*

## Résumé

**Titre :** Statut mutationnel de L'*EGFR*, L'*HER2* et le *BRAF* dans le cancer bronchique non à petites cellules au Maroc.

**Auteur :** ZAROUK Ahlam

**Mots clés :** Cancer du poumon, cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC), thérapie ciblée, inhibiteurs de la tyrosine kinase, biomarqueurs, *EGFR*, *BRAF*, *HER2*.

Le cancer du poumon (CP) est le deuxième cancer le plus répandu et la première cause de mortalité par cancer dans le monde. Le type histologique le plus fréquent est le cancer bronchique non à petites cellules représentant 85% des cas. Le cancer du poumon constitue un problème majeur de santé publique à cause de son diagnostic tardif, sa prise en charge lourde et de son incidence qui ne cessent d'augmenter d'une année à l'autre.

Des cibles potentielles de diagnostics, pronostiques et thérapeutiques sont déterminées à travers l'exploration des altérations moléculaires de cancer du poumon à l'aide des outils de biologie moléculaire.

Notre projet a porté sur l'étude du statut mutationnel de trois biomarqueurs du CBNPC à savoir l'*EGFR*, l'*HER2* et le *BRAF* chez 30 patients marocains atteints d'un cancer du poumon primitif et qui sont hospitalisés au service de chirurgie thoracique du Centre Hospitalier Universitaire Ibn Rochd Casablanca (CHU Ibn Rochd). Moyennant une Polymerase Chain Reaction (PCR) conventionnelle suivie d'un séquençage de Sanger, nous avons pu explorer l'absence ou la présence des mutations les plus répertoriées et les plus impliquées dans la réponse aux traitements via les inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK). Les résultats du séquençage ont révélé la présence d'une mutation au niveau de l'exon 19 du gène *EGFR*, il s'agit de la délétion E746\_A750 ; c'est la mutation la plus fréquente de cet exon qui joue un rôle important dans l'amélioration de la prise en charge des patients représentant cette altération. Aucune mutation n'a été détectée au niveau des autres exons du gène *EGFR* ni au niveau des gènes *BRAF* et *HER2*.

Le travail sera poursuivi sur un large panel pour l'identification des mutations dans les gènes étudiés afin d'établir le paysage moléculaire des patients atteints du CP et leur éligibilité à la thérapie ciblée.

## **Abstract**

**Title :** Mutation status of EGFR, HER2 and BRAF in non-small cell lung cancer.

**Author :** ZAROUK AHLAM

**Keywords :** Lung cancer, non-small cell lung cancer (NSCLC), targeted therapy, tyrosine kinase inhibitors, biomarkers, *EGFR*, *BRAF*, *HER2*.

Lung cancer (LC) is the second most common cancer and the leading cause of cancer death worldwide. The most common histological type is non-small cell lung cancer, representing 85% of cases. Lung cancer is a major public health problem because of its late diagnosis, its heavy care and its incidence which continues to increase from one year to the next.

Potential diagnostic, prognostic and therapeutic targets are established through the exploration of molecular alterations in lung cancer using molecular biology tools.

Our investigation focused on the study of the mutational status of three NSCLC biomarkers, namely EGFR, HER2 and BRAF in 30 Moroccan patients with primary lung cancer who were hospitalized in the thoracic surgery department of the University Hospital Center Ibn Rochd Casablanca (CHU Ibn Rochd). Using conventional Polymerase Chain Reaction (PCR) followed by Sanger sequencing, we were able to explore the absence or presence of the most listed mutations and the most involved in the response to treatment via Tyrosine Kinase inhibitors. The sequencing results revealed the presence of a mutation in exon 19 of the EGFR gene namely the E746\_A750 deletion which is the most frequent mutation of this exon and has a significant role in improving the management of patients representing this alteration. No mutations were detected neither in the other exons of the EGFR gene nor in the BRAF and HER2 genes.

The work is in progress on a large panel for the identification of mutations in the target genes to establish the molecular landscape of Moroccan patients with PC and their eligibility for targeted therapy.

## ملخص

**العنوان:** حالة طفرة EGFR و HER2 و BRAF في سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة في المغرب.

**المؤلف:** زروق أحلام

**الكلمات المفتاحية:** سرطان الرئة، سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة (NSCLC) ، العلاج الموجه، مثبطات التيروسين كينيز، المؤشرات الحيوية، EGFR، BRAF، HER2.

سرطان الرئة (LC) هو ثاني أكثر أنواع السرطانات شيوعاً والسبب الرئيسي للوفاة من السرطان في جميع أنحاء العالم. النوع النسيجي الأكثر شيوعاً هو سرطان الرئة ذو الخلايا غير الصغيرة ويمثل 85٪ من الحالات. يعتبر سرطان الرئة مشكلة صحية عامة كبرى بسبب التشخيص المتأخر، والعناية الشديدة به ونسبة حدوثه التي تستمر في الزيادة من عام إلى آخر.

يتم تحديد الأهداف التشخيصية والإنذارية والعلاجية المحتملة من خلال استكشاف التغيرات الجزيئية في سرطان الرئة باستخدام أدوات البيولوجيا الجزيئية.

ركز مشروعنا على دراسة حالة الطفرة لثلاثة مؤشرات حيوية لـ NSCLC ، وهي EGFR و HER2 و BRAF في

30 مريضاً مغربياً مصابين بسرطان الرئة الأولي الذين تم إدخالهم إلى المستشفى في قسم جراحة الصدر في مركز المستشفى الجامعي ابن رشد الدار البيضاء (CHU) ابن رشد . (عن طريق تفاعل البلمرة المتسلسل التقليدي (PCR) متبوعاً بتسلسل Sanger، تمكنا من استكشاف غياب أو وجود الطفرات الأكثر إدراجاً والأكثر مشاركة في الاستجابة للعلاج عبر مثبطات التيروسين كيناز (TKIs). كشفت نتائج التسلسل عن وجود طفرة في exon 19 من جين EGFR ، وهذا هو حذف E746\_A750؛ إنها الطفرة الأكثر شيوعاً لهذا exon والتي تلعب دوراً مهماً في تحسين إدارة المرضى الذين يمثلون هذا التغيير. لم يتم الكشف عن أي طفرات في exons الأخرى من جين EGFR أو في جينات BRAF و HER2.

سيستمر العمل على لوحة كبيرة لتحديد الطفرات في الجينات المدروسة من أجل تحديد المشهد الجزيئي لمرضى الكمبيوتر الشخصي وأهليتهم للعلاج الموجه



# LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1</b> : Anatomie des poumons humains .....	- 4 -
<b>Figure 2</b> : Les composants d'un alvéole .....	- 6 -
<b>Figure 3</b> : Etapes de la cancérogenèse.....	- 7 -
<b>Figure 4</b> : Répartition des décès selon le type de cancer, tous sexes confondus en 2020....	- 8 -
<b>Figure 5</b> : Répartition des nouveaux cas des différents cancers dans le monde tous sexes confondus en 2020 .....	- 8 -
<b>Figure 6</b> : Répartition des cas du cancer du poumon dans le monde .....	- 9 -
<b>Figure 7</b> : Taux d'incidence mondiale du cancer du poumon chez les hommes et les femmes.....	- 9 -
<b>Figure 8</b> : Répartition des différents cancers au Maroc .....	- 10 -
<b>Figure 9</b> : Taux d'incidence et de mortalité des cancers au Maroc en 2020.....	- 11 -
<b>Figure 10</b> : Taux d'incidence par sexe pour les 10 principaux cancers au Maroc en 2020	- 11 -
<b>Figure 11</b> : Gènes fréquemment mutés dans le CBNPC et leurs fréquences .....	- 19 -
<b>Figure 12</b> : Localisation du gène EGFR et les mutation fréquentes dans le CBNPC. ....	- 22 -
<b>Figure 13</b> : Structure du récepteur EGFR et mécanisme de dimérisation.....	- 23 -
<b>Figure 14</b> : Voies de signalisation de l'EGFR .....	- 23 -
<b>Figure 15</b> : Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK.....	- 24 -
<b>Figure 16</b> : Mutation du gène EGFR détectées dans le CBNPC.....	- 26 -
<b>Figure 17</b> : Localisation du gène HER2 sur le chromosome 17 .....	- 27 -
<b>Figure 18</b> : Voies de signalisation activée par l'HER2 .....	- 28 -
<b>Figure 19</b> : Localisation du gène BRAF sur le chromosome 7 .....	- 29 -
<b>Figure 20</b> : Les régions conservées des protéines de la famille RAF .....	- 29 -
<b>Figure 21</b> : Voie de signalisation avec la BRAF normal (A) et la BRAF lésionnelle(B)..	- 30 -
<b>Figure 22</b> : Répartition des patients selon le sexe. ....	- 41 -
<b>Figure 23</b> : Répartition des patients selon l'âge. ....	- 41 -
<b>Figure 24</b> : Répartition des patients selon le tabagisme.....	- 42 -
<b>Figure 25</b> : Répartition des patients selon le type histologique. ....	- 42 -
<b>Figure 26</b> : Distribution des patients selon le stade tumoral. ....	- 43 -
<b>Figure 27</b> : Exemple de résultat de dosage d'un ADN extrait. ....	- 44 -
<b>Figure 28</b> : Exemple d'électrophorèse des produits PCR GAPDH (MTM : marqueur de taille moléculaire, TN : témoin négatif). ....	- 44 -

<b>Figure 29</b> : Exemple de résultat d'électrophorèse des produits PCR de l'exon 20 du gène EGFR (MTM : marqueur de taille moléculaire, TN : témoin négatif).....	- 45 -
<b>Figure 30</b> : Aspect de la mutation E746_A750 de l'exon 19 du gène EGFR sur le BLAST.....	- 46 -
<b>Figure 31</b> : Aspect de l'exon 19 du gène EGFR sur le BLAST.....	- 46 -
<b>Figure 32</b> : Aspect de la mutation E746_A750 de l'exon 19 du gène EGFR au niveau de l'électrophérogramme. ....	- 46 -
<b>Figure 33</b> : Aspect de l'exon 19 du gène EGFR sauvage au niveau de l'électrophérogramme....	- 47 -

# LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau I</b> : Les signes les plus fréquentes d'un CB .....	- 14 -
<b>Tableau II</b> : Classification TNM 2017.....	- 16 -
<b>Tableau III</b> : Les stades TNM du CBNPC .....	- 17 -
<b>Tableau IV</b> : Les amorces du gène GAPDH.....	- 35 -
<b>Tableau V</b> : Concentrations et volumes utilisés pour la PCR.....	- 35 -
<b>Tableau VI</b> : Programme de la PCR pour le gène GAPDH.....	- 36 -
<b>Tableau VII</b> : Amorces et tailles des amplicons du gène EGFR .....	- 37 -
<b>Tableau VIII</b> : Programme de la PCR pour les gènes : EGFR, HER2 et BRAF.....	- 38 -
<b>Tableau IX</b> : Réactifs utilisés dans la réaction de séquence. ....	- 39 -
<b>Tableau X</b> : Programme de la réaction de séquence .....	- 39 -
<b>Tableau XI</b> : Exemples de résultats du dosage de l'ADN par Nano Drop.....	- 43 -
<b>Tableau XII</b> : Résultats des mutations recherchées dans le cadre de notre étude.....	- 45 -

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ADC** : Adénocarcinome

**ADN** : Acide DésoxyriboNucléique

**ALK** : Anaplastic Lymphoma Kinase

**BET** : bromure d'éthydiuim dilués

**BLAST** : Basic Local Alignment Search Tool

**BRAF** : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.

**CB** : Cancer bronchique

**CBNPC** : Cancer bronchique non à petites cellules

**CBPC** : Cancer bronchique à petites cellules

**CE** : Carcinome épidermoïde

**CGC** : Carcinome à grandes cellules

**CHU** : Centre Hospitalier Universitaire

**CNESTEN** : Centre National de l'Energie, des Sciences et des Techniques Nucléaires

**CNRST** : Centre National pour la Recherche Scientifique et Technique

**DO** : Densité optique

**CP** : Cancer du poumon

**CR1** : Conserved region 1

**CR2** : Conserved region 2

**CR3** : Conserved region 3

**CRD** : Cysteine rich domain

**ddNTP** : Didésoxyribonucléotide tri-phosphate

**dNTP** : Désoxyribonucléotide tri-phosphate

**EDTA** : Acide éthylène-diamine-tétracétique

**EGF** : Facteur de croissance épidermique

**EGFR** : Epidermal Growth Factor Receptor

**EMA** : European Medicines Agency

**EML4** : Microtubules d'Echinoderme

**ERBB2** : Erb-B2 Récepteur tyrosine kinase 2

**ERK** : Extracellular-signal-regulated kinase

**EtOH** : Ethanol

**FDA** : Food and Drug Administration

**F** : Forward

**GAPDH** : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

**GRB2** : Growth factor receptor-bound protein 2

**HER** : Human Epidermal Growth Factor

**HER1** : Human epidermal growth factor receptor-1

**HER2** : Human epidermal growth factor receptor-2

**IASLC** : International Association For The Study Of Lung Cancer

**ITK** : Inhibiteurs de tyrosine kinase

**JAK** : Janus kinases

**KRAS** : Kristen Ras Sarcoma

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MEK** : Mitogen activated protein kinase kinase

**mTOR** : Mammalian target of rapamycin

**NCBI** : National Center for Biotechnology Information

**NRAS** : Neuroblastoma Rat Sarcoma

**PCR** : Polymerase Chain Reaction

**PIK3** : Phosphonositide-3-Kinase

**PIK3CA** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-Kinase catalytic submit alpha

**RAF** : Rapidly accelerated fibrosarcoma

**RAS** : Rat Sarcoma

**RBD** : Ras binding domaine

**R** : Reverse

**ROS1** : Ros proto oncogene 1

**SH2** : Src Homology 2

**SOS** : Son of Sevenless

**STAT** : Signal transducer and activator of

**TBE** : Tris Borate EDTA

**TDM** : Technique d'examen tomidensitométrie.

**TGF $\alpha$**  : Transforming growth factor alpha

**TNM** : Tumeur, Nodules, Métastases.

**TYK2** : Tyrosine kinase 2

**URMB** : Unité de Recherches Médicales et Biologiques

**UV** : Ultraviolet

**VATS** : lobectomie par thoracoscopie vidéo assistée

# TABLE DES MATIÈRES

Introduction.....	- 1 -
Partie bibliographique.....	- 2 -
I. Anatomie et histologie du poumon .....	- 4 -
1. Anatomie du poumon .....	- 4 -
2. Fonction du poumon .....	- 5 -
3. Histologie du tissu pulmonaire .....	- 5 -
II. Histoire naturelle du cancer .....	- 6 -
III. Epidemiologie du cancer de poumon .....	- 7 -
1. Au niveau mondial .....	- 7 -
2. Au Maroc .....	- 10 -
IV. facteurs de risques du cancer de poumon .....	- 11 -
1. Tabagisme .....	- 11 -
2. Facteurs environnementaux.....	- 12 -
3. Expositions professionnelles.....	- 12 -
4. Antécédents familiaux et personnels .....	- 12 -
5. Certains compléments alimentaires .....	- 13 -
V. Diagnostic du cancer de poumon .....	- 13 -
VI. Traitement du cancer de poumon .....	- 14 -
VII. Classification TNM du cancer de poumon .....	- 15 -
VIII. Classification histologique du cancer de poumon .....	- 17 -
1. Cancer bronchique non à petites cellules.....	- 18 -
A. Adénocarcinomes .....	- 18 -
B. Carcinomes épidermoïdes.....	- 18 -
C. Carcinomes à grandes cellules .....	- 18 -
2. Cancer bronchique à petites cellules .....	- 18 -
IX. Etude moléculaire du cancer du poumon non à petites cellules.....	- 19 -
1. Gènes de la famille <i>RAS</i> .....	- 19 -
2. <i>ALK</i> .....	- 20 -
3. <i>PIK3CA</i> .....	- 20 -
4. <i>ROS1</i> .....	- 21 -
5. Gènes <i>RAF</i> .....	- 21 -
X. Epidermal growth factor receptor « <i>EGFR</i> » .....	- 22 -
1. Le gène <i>EGFR</i> .....	- 22 -

2.	Voies de signalisation.....	- 23 -
A.	Voie Ras/Raf/MEK/ERK.....	- 24 -
B.	Voie JAK/STAT.....	- 25 -
C.	Voie PI3K/AKT.....	- 25 -
3.	Mutations d' <i>EGFR</i> dans le CBNPC.....	- 25 -
4.	Les inhibiteurs d' <i>EGFR</i> .....	- 26 -
XI.	Human epidermal growth factor receptor-2 ( <i>her2</i> ).....	- 27 -
1.	Le gène <i>HER2</i> .....	- 27 -
2.	Voies de signalisation.....	- 27 -
3.	<i>HER2</i> et CBNPC.....	- 28 -
4.	Les inhibiteurs de <i>HER2</i> .....	- 28 -
XII.	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.....	- 29 -
1.	Le gène <i>BRAF</i> .....	- 29 -
2.	Voies de signalisation.....	- 29 -
3.	<i>BRAF</i> et CBNPC.....	- 30 -
4.	Inhibiteurs de <i>BRAF</i> .....	- 31 -
I.	Matériel et méthodes.....	- 33 -
1.	Echantillonnage et population d'étude.....	- 33 -
A.	Population d'étude.....	- 33 -
B.	Matériel biologique.....	- 33 -
2.	Méthodes.....	- 33 -
A.	Extraction d'ADN.....	- 33 -
B.	Dosage d'ADN.....	- 34 -
C.	Contrôle de la qualité de l'ADN extrait par amplification du gène <i>GAPDH</i> .....	- 34 -
3.	Etude du statut mutationnel des gènes.....	- 36 -
A.	Amplification par PCR.....	- 36 -
B.	Migration sur gel.....	- 38 -
C.	Purification des produits PCR.....	- 38 -
D.	Réaction de séquence.....	- 38 -
E.	Purification de réaction de séquence par Sephadex G50.....	- 39 -
F.	Détermination de la séquence.....	- 40 -
G.	Analyse bio-informatique.....	- 40 -
II.	Résultats.....	- 41 -
1.	Description de la population d'étude.....	- 41 -
2.	Résultats anatomopathologiques.....	- 42 -
3.	Dosage d'extrait d'ADN.....	- 43 -

4.	Résultat du test de qualité d'ADN par PCR du GAPDH.....	- 44 -
5.	Résultats du statut mutationnel des gènes EGFR, HER2 et BRAF .....	- 44 -
III.	Discussion .....	- 48 -
	Conclusion et perspectives.....	- 49 -



## Introduction

Le cancer bronchique (CB) est un des fléaux contemporains en continuelle augmentation occasionnant d'importants ravages à travers le monde avec une incidence de plus d'un million de nouveaux cas par an. Les cancers du poumon (CPs) également nommés cancers bronchiques (CB) ou cancers broncho-pulmonaires sont définis comme un ensemble de proliférations de tumeurs malignes primitives ou secondaires développées aux dépens du poumon.

Le cancer du poumon représente le deuxième cancer le plus fréquent ainsi que la principale cause de mortalité par cancer dans le monde. Au Maroc, il est classé le deuxième cancer le plus répandu après le cancer du sein et la troisième cause de décès par cancer.

Grace a l'appui de données épidémiologiques analytiques, le comportement tabagique est identifié comme le facteur de risque principal et incontestable des CB. De plus, l'exposition professionnelle et environnementale (l'amiante, le radon, le nickel, le chrome, l'arsenic, le plomb, les radiations) peut causer ce cancer. Ces facteurs environnementaux sont reconnus, agissant souvent comme facteurs synergiques avec le tabac.

Toutefois, la présence de certains ou même de tous ces facteurs de risque ne débouche pas nécessairement sur l'apparition du CB. A titre d'exemple, seulement <20 % des fumeurs développent un CB, en plus du groupe des non-fumeurs qui meurent à cause d'un CB.

Les avancées de la génétique et des techniques de biologie moléculaire ont montré que certaines personnes ont une plus grande probabilité de développer un CB à cause de leur configuration génétique. De plus, l'existence d'un antécédent familial de CB ou d'autres types de cancer augmentent le risque de développer ce cancer. Chez les personnes qui sont génétiquement prédisposées, le tabagisme et d'autres facteurs environnementaux augmentent ultérieurement le risque ; cela suggère que le CB est une maladie multifactorielle qui résulte d'interactions complexes avec de nombreux facteurs génétiques et environnementaux.

Sur le plan histologique deux types des cancers bronchiques (CB) sont distingués : le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC) représentant 80 à 85% des cas et le cancer bronchique à petites cellules représentant 15 à 20% des cas. La plupart des patients atteints du CBNPC sont asymptomatiques, le diagnostic se fait souvent tardivement ou après métastase, cela rend la prise en charge des patients atteints d'un CP l'une des tâches les plus difficiles pour le système de santé.

La prise en charge thérapeutique est multidisciplinaire, elle est basée sur des traitements locorégionaux (chirurgie et radiothérapie) et systématiques (chimiothérapie et thérapie ciblée). Les techniques de la biologie moléculaire ont permis de développer les thérapies ciblées qui ont

révolutionné la stratégie de traitement chez les patients atteints de CBNPC, ces thérapies ciblées sont attribuées en fonction du profil mutationnel des patients. C'est dans ce contexte que nous avons réalisé cette étude prospective afin d'établir le profilage moléculaire des patients atteints de CBNPC, nous nous sommes particulièrement intéressés aux mutations génétiques dans les gènes *EGFR*, *BRAF* et *HER2* et leurs implications thérapeutiques chez les patients atteints du CP.

*Partie*  
*Bibliographique*

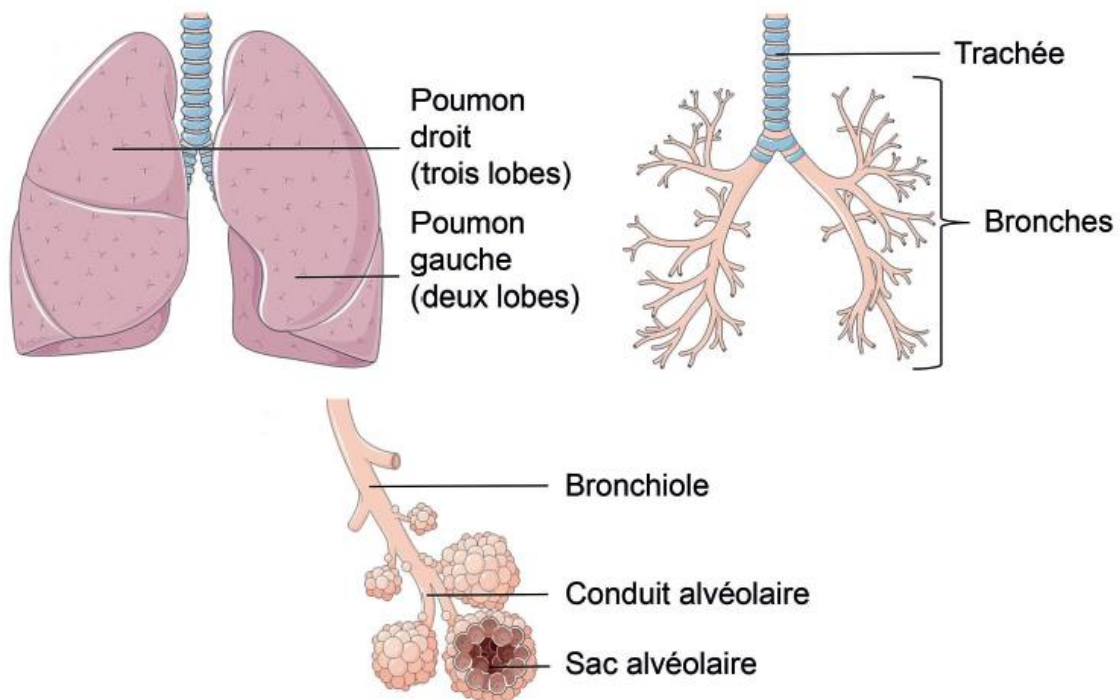
# I. ANATOMIE ET HISTOLOGIE DU POUMON

## 1. Anatomie du poumon

Les poumons sont les organes de la respiration. L'homme possède deux poumons situés dans la cage thoracique, protégés par les côtes et séparés par le médiastin.

Les poumons sont divisés en lobes, trois à droite et deux à gauche. Ils sont enveloppés par la plèvre qui est constituée de deux feuillets : interne ou viscérale et externe ou pariétale. Le liquide pleural se trouve entre les feuillets et provoque leurs glissements ainsi que les mouvements pulmonaires lors de la ventilation.

Chaque poumon est relié à la trachée qui se divise en deux bronches principales droite et gauche, les divisions successives des bronches conduisent à la formation de l'arbre bronchique qui se termine par les bronchioles terminales et les canaux alvéolaires. Les espaces alvéolaires contiennent les conduits alvéolaires et les alvéoles qui possèdent une forme ronde et représentent les lieux d'échange (**Figure1**) [1].



*Figure 1 : Anatomie des poumons humains [1]*

## 2. Fonction du poumon

Les poumons assurent des fonctions essentielles :

- La respiration externe pulmonaire permet l'inhalation de l'air par les cavités nasales et buccales, il arrive aux poumons après acheminement dans le pharynx, le larynx et la trachée. L'air est expiré en reprenant le même chemin en sens inverse.
- La respiration interne où l'oxygène et le dioxyde de carbone s'échangent entre les tissus, la circulation sanguine et les alvéoles pulmonaires.
- Les poumons jouent également le rôle de défenseur du corps contre les substances nuisibles présentes dans l'air, comme la fumée, la pollution, les bactéries et les virus.
- La synthèse du surfactant, (agent tensio-actif de la stabilité alvéolaire) [1].

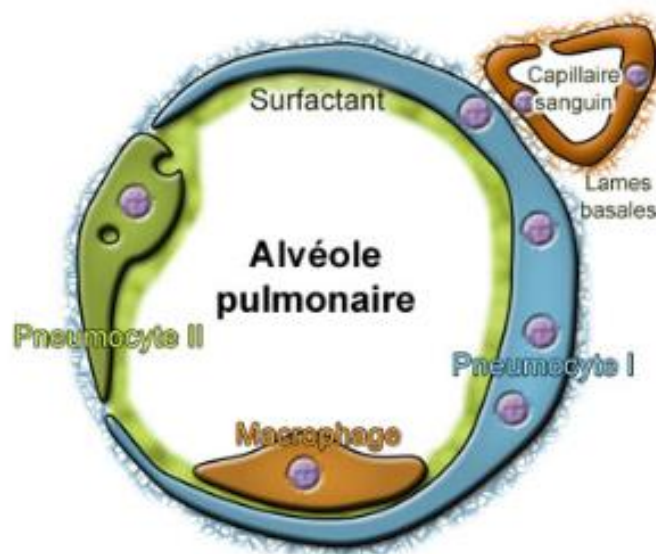
## 3. Histologie du tissu pulmonaire

Avant d'arriver aux bronchioles l'air est humidifié, réchauffé et filtré par le mucus puis arrive aux alvéoles où la respiration proprement dite se déroule. Les alvéoles sont tapissés d'une paroi très fine contenant les capillaires. L'épithélium alvéolaire est composé de trois principaux types cellulaires les pneumocytes I, les pneumocytes II et les macrophages [2].

Les pneumocytes I représentent 95% de la surface interne de chaque alvéole, ils sont aplatis, minces et idéaux pour les échanges gazeux. Ils sont reliés entre eux par des jonctions serrées, cela permet la formation d'une barrière qui limite l'infiltration du liquide dans les alvéoles. La membrane basale est une structure en commun entre les pneumocytes I et l'endothélium capillaire pulmonaire c'est là où se produisent les échanges gazeux tout en formant une barrière air-sang.

Les pneumocytes II se situent entre les pneumocytes I, ils couvrent 5% de la surface épithéliale de l'alvéole. Ce sont de grandes cellules cubiques avec des microvillosités produisant et sécrétant le surfactant qui permet de réduire la tension superficielle, empêchant les alvéoles de s'effondrer. Ils servent également dans la régénération de l'épithélium alvéolaire après une blessure [3].

Les macrophages sont dérivés des monocytes sanguins, ils éliminent les matières indésirables (poussières, bactéries ...) par la phagocytose. Ils se situent au niveau des espaces alvéolaires et inter-alvéolaires (**Figure 2**) [2].



**Figure 2 :** Les composants d'un alvéole [4]

## II. HISTOIRE NATURELLE DU CANCER

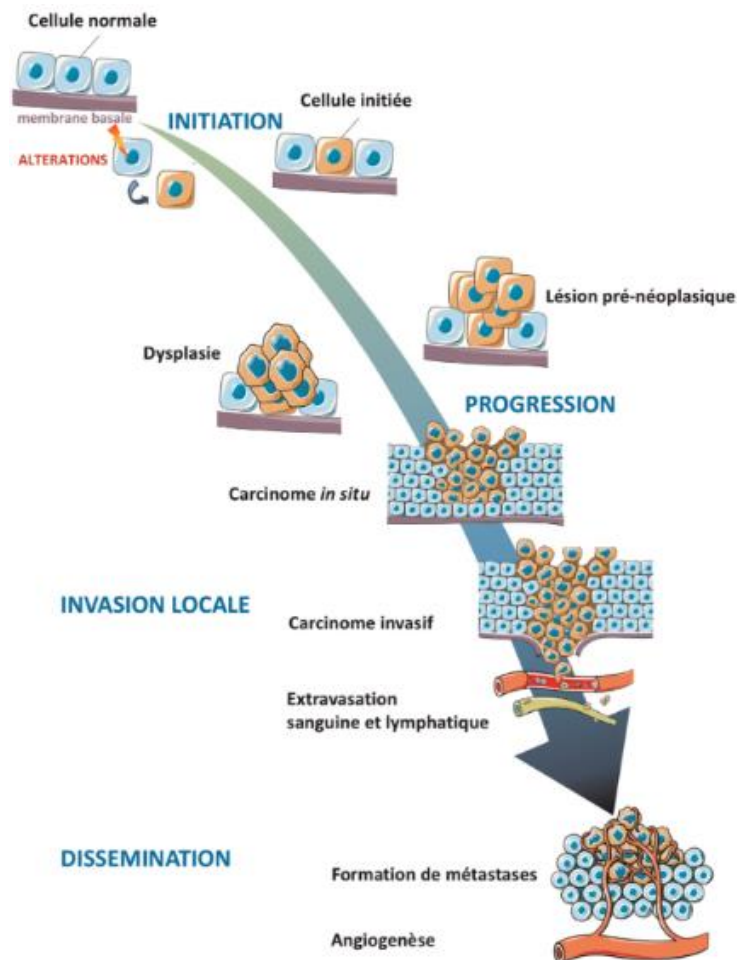
Une cellule est considérée comme cancéreuse quand elle atteint l'autonomie de croissance. Les modifications génétiques au sein de la cellule et à travers la sécrétion de certains facteurs tels que les cytokines et les facteurs de croissance provoquent l'acquisition de nouvelles fonctionnalités ce qui aboutit à une transformation cancéreuse.

La tumorigenèse est constituée d'une succession d'étapes qui transforment une cellule normale en une cellule cancéreuse. Suite à une réponse aux facteurs induisant une ou plusieurs altérations irréversibles d'ADN (Acide DésoxyriboNucléique), la cellule va obtenir la capacité de prolifération autonome : dysplasie légère, modérée puis sévère. Les dysplasies sont des troubles acquis de l'homéostasie cellulaire résultant d'anomalies génétiques qui altèrent le contrôle de la prolifération et la maturation cellulaire.

La progression tumorale est une étape qui peut durer plusieurs années, elle se caractérise par l'expansion clonale de la cellule initiée, la multiplication cellulaire est exponentielle et rapide. L'architecture tissulaire est tout de même respectée et le chorion n'est pas encore envahi : c'est le stade carcinome *in situ* (**Figure 3**).

D'une manière irréversible, les cellules vont dépasser la membrane basale, puis le stroma tumoral va se former permettant ainsi à la tumeur d'acquérir un phénotype néoplasique, se caractérisant par une croissance cellulaire rapide et la capacité à envahir les tissus environnants et à former des métastases, il s'agit du stade : carcinome invasif.

Le cancer du poumon donne surtout des métastases pulmonaires, hépatiques, surrenaliennes, cérébrales et osseuses [5].



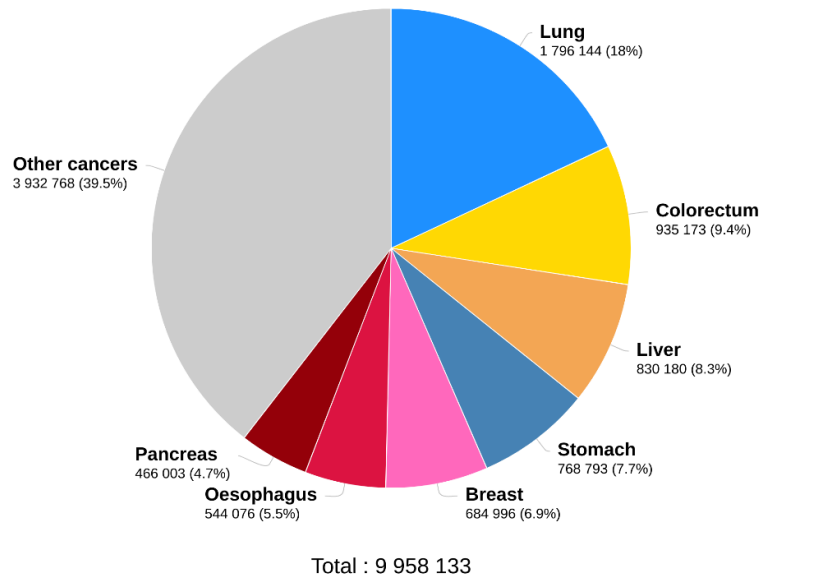
*Figure 3 : Etapes de la cancérogenèse [5]*

### III. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DE POUMON

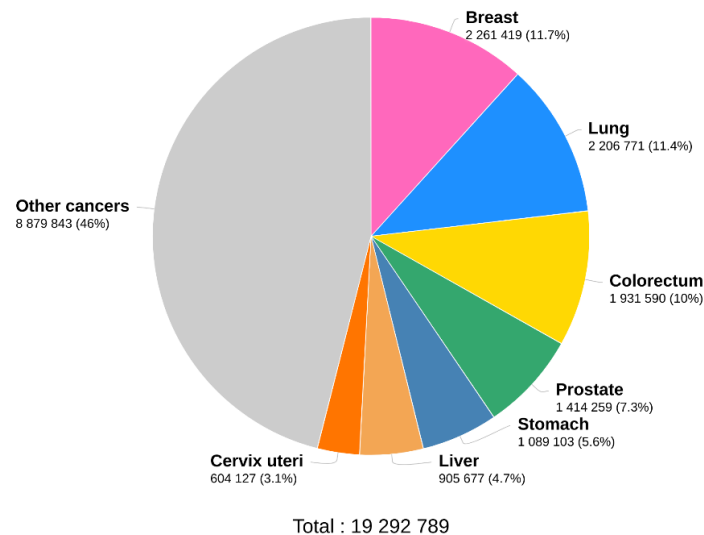
#### 1. Au niveau mondial

Le cancer du poumon (CP) est la principale cause du décès par cancer dans le monde, 1.80 million décès en 2020 (**Figure 4**). Cela est dû en grande partie au tabagisme dont le nombre de fumeurs augmente d'une année à une autre, les non-fumeurs peuvent aussi développer ce cancer à cause d'autres facteurs de risques mais le pourcentage reste faible par rapport aux fumeurs. Il est ainsi le deuxième cancer incident le plus fréquent après le cancer du sein dans le monde, dans la même année plus de 2.206 millions de nouveaux CP sont diagnostiqués (**Figure 5**) [6].

Il existe une variation significative entre les pays concernant l'incidence du CP, cela est influencé par le taux de consommation de la cigarette qui est différent d'un pays à l'autre. Les taux d'incidence les plus élevés sont dans l'Asie avec un pourcentage de 59,6%, et les plus faibles dans l'Océanie avec un pourcentage de 0.77% (**Figure 6**) [7].

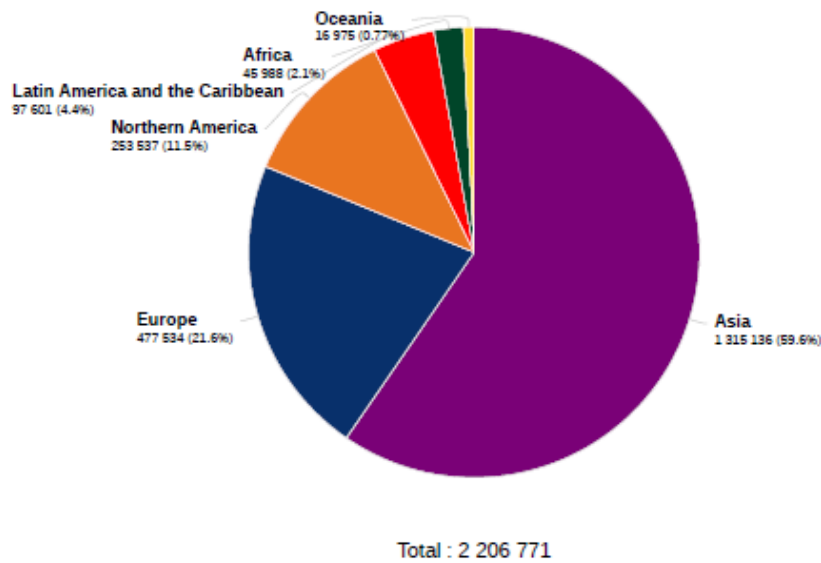


*Figure 4 : Répartition des décès selon le type de cancer, tous sexes confondus en 2020 [7]*



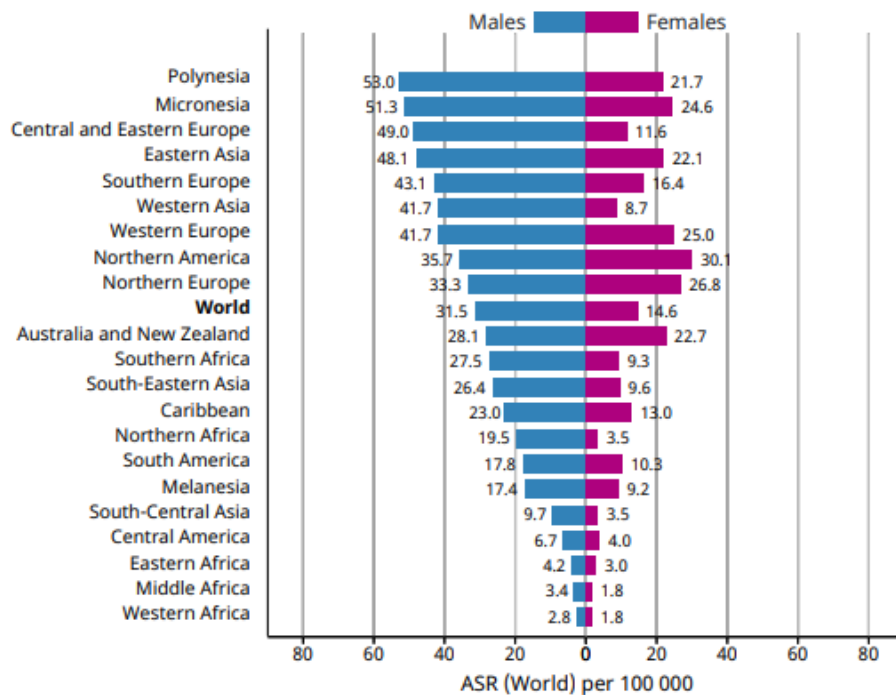
*Figure 5 : Répartition des nouveaux cas des différents cancers dans le monde tous sexes confondus en 2020 [7]*





**Figure 6 :** Répartition des cas du cancer du poumon dans le monde [7]

Le CP est plus répandu chez les hommes que chez les femmes. Cependant ces dernières années les femmes développent de plus en plus le CP (**Figure 7**) [7].



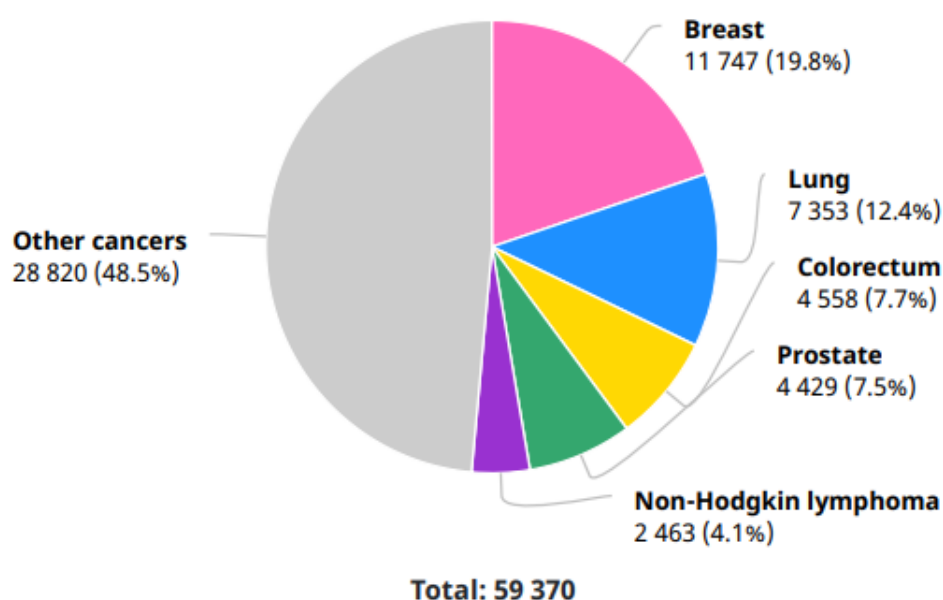
**Figure 7 :** Taux d'incidence mondiale du cancer du poumon chez les hommes et les femmes [7]

## 2. Au Maroc

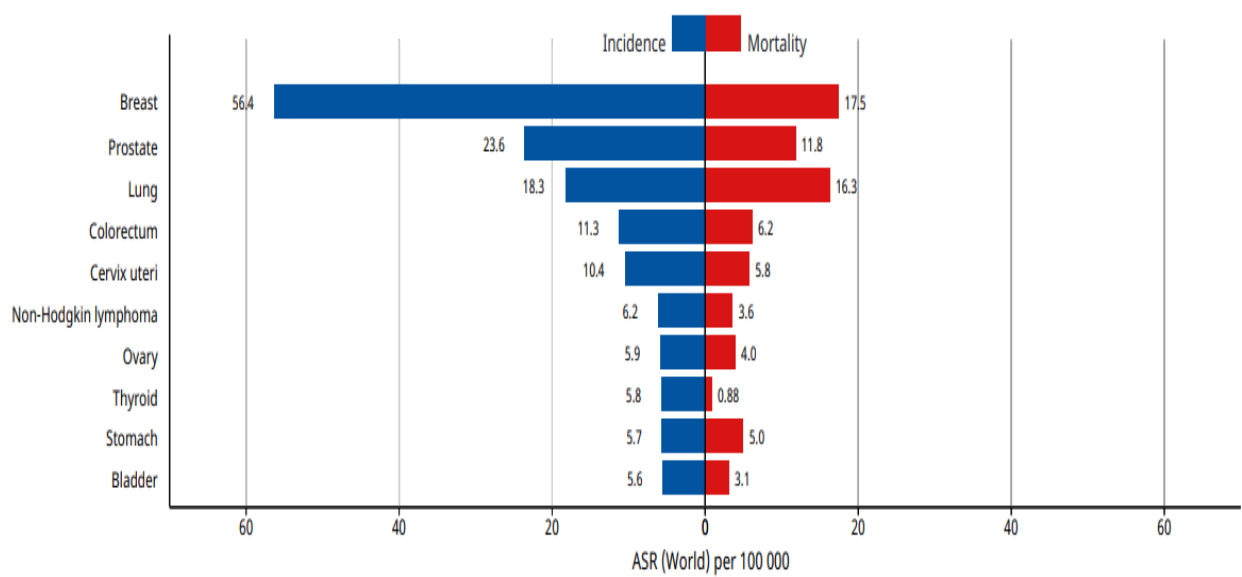
Le CP est le deuxième cancer le plus répandu après le cancer de sein par un taux de 12.4% (**Figure 8**). En 2020, le nombre de nouveaux cas au Maroc était de 7353 (GLOBOCAN, 2020).

Il est classé comme étant le troisième cancer le plus mortel après le cancer du sein et de la prostate avec un taux de mortalité de 16.3% (**Figure 9**). En 2020, 35256 morts dus aux CP ont été recensés (GLOBOCAN, 2020).

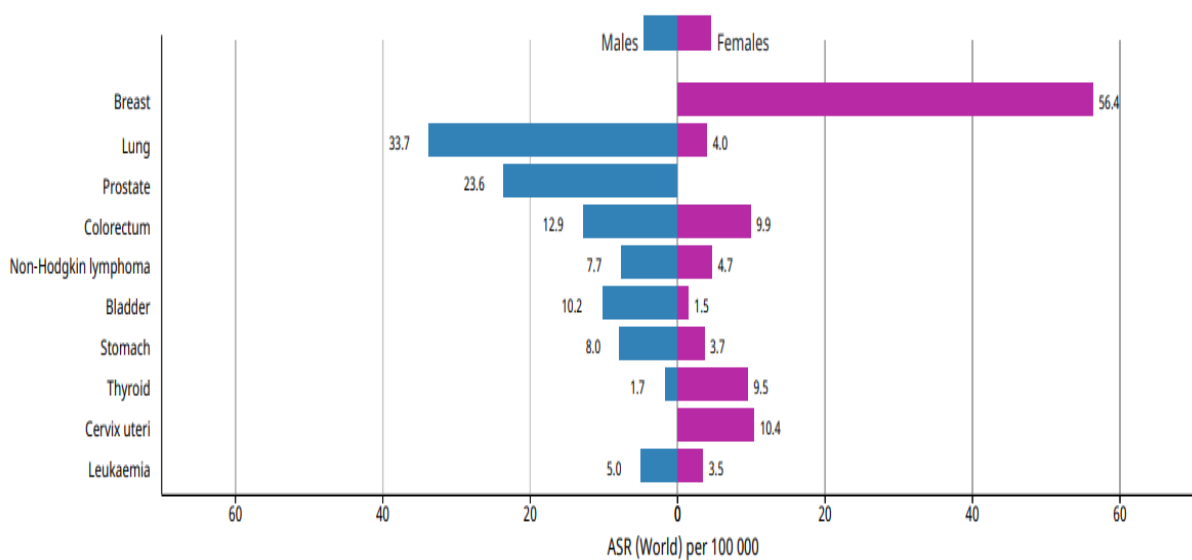
Selon les statistiques de 2020 les hommes et les femmes atteintes d'un CP représentaient 33.7% et 4% respectivement (**Figure 10**).



**Figure 8:** Répartition des différents cancers au Maroc (GLOBOCAN, 2020)



**Figure 9 : Taux d'incidence et de mortalité des cancers au Maroc en 2020 (GLOBOCAN, 2020)**



**Figure 10 : Taux d'incidence par sexe pour les 10 principaux cancers au Maroc en 2020 (GLOBOCAN, 2020)**

#### **IV. FACTEURS DE RISQUES DU CANCER DE POUMON**

Le cancer est une pathologie multifactorielle, le tabagisme est le facteur de risque le plus important.

##### **1. Tabagisme**

Le risque du CP augmente chez les fumeurs plus que chez les non-fumeurs. Le tabac contient de nombreuses substances chimiques dont plusieurs sont cancérigènes.

L'exposition répétée à la fumée du tabac peut entraîner des altérations génétiques qui perturbent la croissance et la régulation cellulaire normale, ce qui mène à l'apparition du cancer. Ce risque augmente en fonction de la durée du tabagisme, et avec l'exposition d'autres facteurs de risques [8, 9].

L'usage du tabac après le diagnostic d'un CP continue à produire des dommages cellulaires ce qui aggrave le pronostic [9].

La fumée secondaire ou le tabagisme involontaire risque de donner le CP, à cause de l'inhalation des substances chimiques mutagènes. C'est un facteur de risque important chez les non-fumeurs [8].

Il est vrai que 90% des décès par le CP sont liés au tabagisme. Pourtant, tous les grands fumeurs, ne développent pas de CP au cours de leur vie. Ceci a été expliqué par le fait que chez certains fumeurs, les cellules qui tapissent les poumons semblent moins susceptibles que d'autres de muter avec le temps, ce qui leur confèrent une certaine prévention par rapport aux autres patients [10].

## **2. Facteurs environnementaux**

Le radon est un gaz radioactif naturel incolore, inodore et sans goût, résulte de la décomposition de l'uranium dans le sol et dans les roches. Il est parmi les facteurs de risques principales du CP chez les non-fumeurs, cela dépend de la durée d'exposition et la quantité de la substance à laquelle les personnes sont exposées.

Les personnes qui travaillent avec de l'amiante ont beaucoup de risques de développer un CP, ce risque augmente encore plus si ces personnes sont des fumeurs [11].

## **3. Expositions professionnelles**

Certains lieux de travail comprennent des substances cancérigènes qui peuvent causer le CP. Parmi ces substances, on cite le cadmium, l'arsenic, le béryllium, la silice et les gaz d'échappement. L'exposition aux radiations s'ajoute à ces substances [11].

Les personnes déjà atteintes du CP risquent de rechuter suite à une exposition à un de ses agents [8].

## **4. Antécédents familiaux et personnels**

Les antécédents familiaux augmentent le risque de développer un CP aussi bien chez les fumeurs que chez les non-fumeurs. Ce risque augmente si c'est la famille du premier degré qui est touchée (père, mère, frère et sœur), ou s'il y a une association entre les facteurs génétiques et d'autres facteurs de risques tel que le tabagisme ou les facteurs environnementaux. [12]

## 5. Certains compléments alimentaires

Le bêta-carotène est un antioxydant qui lors d'une forte consommation (>20 mg/jour) associée à l'exposition à la fumée de tabac augmente le risque de développer un CP [13].

## V. DIAGNOSTIC DU CANCER DE POUMON

La plupart des CPs sont diagnostiqués à un stade avancé ou métastatique, car la plupart des patients sont asymptomatiques. Un diagnostic précoce permet de reconnaître les modalités de la maladie ainsi que la réduction du délai de la prise en charge.

Il existe des signes fréquents chez les personnes atteintes du cancer bronchique (CB) (**Tableau I**).

Le diagnostic histologique et la stadification TNM (Tumeur, Nodules, Métastase) servent pour diagnostiquer le CP. Le diagnostic est multidisciplinaire.

La technique d'examen tomodensitométrique (TDM) thoracique (tomodensitométrie) est un examen de première intention qui informe sur la taille de la tumeur et la présence des ganglions. Des résultats normaux n'éliminent pas le diagnostic de cancer bronchique [14].

L'endoscopie bronchique est un examen sensible dans le diagnostic des tumeurs pulmonaires, surtout pour celles périphériques qui sont moins de deux centimètres. Il s'effectue sous anesthésie locale ou sédation. Pendant cet examen, plusieurs prélèvements peuvent se réaliser à l'aide d'une mini-sonde échographique telles que les biopsies et les lavages pulmonaires.

La cytologie permet aussi dans certains cas de diagnostiquer le cancer bronchique à l'aide de l'examen anatomocytologique en examinant soit l'expectoration, le liquide pleural ou les biopsies pleurales. Les biopsies guidées sous scanner ou échographie sont utilisées aussi dans le diagnostic [15].

Dans certains cas, l'intervention chirurgicale est obligatoire pour prélever des échantillons de la tumeur et des tissus voisins pour poser le diagnostic [15].

**Tableau I : Les signes les plus fréquentes d'un CB [14]**

Signes fonctionnels	Fréquence (%)
Généraux	
Perte de poids	0-68
Fièvre	0-20
Faiblesse	0-10
Thoraciques	
Toux	8-75
Dyspnée	3-60
Douleur thoracique	20-49
Hémoptysie	6-35
Généraux	
Douleur osseuse	6-25
Dysphagie	0-2
Syndrome cave supérieur	0-4

## VI. TRAITEMENT DU CANCER DE POUMON

Le CP est traité essentiellement par la chirurgie, la radiothérapie (traitements locorégionaux) et les traitements médicamenteux systématiques (chimiothérapie, immunothérapie et thérapies ciblées), ces traitements sont utilisés seuls ou bien associés les uns aux autres.

- **La chirurgie :** dépend de la taille, la localisation de la tumeur et l'extension aux ganglions. Ce traitement est lié au stade ; les stades I, II et IIIA se traitent par une résection chirurgicale complète s'il n'existe pas une contre-indication.

La procédure optimale à un stade précoce du CBNPC est la lobectomie ou la pneumonectomie. Bien que ces deux techniques aient montré un taux de survie plus élevé que la résection limitée, ces approches restent complexes et uniques pour chaque patient.

- **La radiothérapie :** permet d'endommager l'ADN des cellules cancéreuses à travers des faisceaux à haute énergie, ce traitement peut améliorer la qualité de vie chez certains patients qui ne répondent pas à la chirurgie et la chimiothérapie.
- **La chimiothérapie :** consiste à l'utilisation de médicaments pour détruire les cellules cancéreuses, les empêcher de se développer et de proliférer. Le sous-type histologique

permet la détermination des médicaments recommandés pour la chimiothérapie. Les effets indésirables de cette thérapie dépendent de la personne et de la dose utilisée [16].

- **L'immunothérapie** : est un traitement qui utilise le système de défense de l'organisme pour détruire les cellules cancéreuses. Cette thérapie permet la stimulation du système immunitaire pour qu'il puisse cibler les cellules cancéreuses et éviter les métastases [16].
- **Thérapie ciblée** : le profilage moléculaire a révolutionné le traitement des patients atteints du CBNPC portant des altérations génomiques, à travers des thérapies ciblées des voies d'addictions oncogéniques les plus fréquentes comme *l'EFGR, BRAF, HER2, ALK, ROS1* et autres. Cette thérapie a contribué à une amélioration de la survie de plusieurs patients [16].

## **VII. CLASSIFICATION TNM DU CANCER DE POUMON**

Le système de stadification employé pour le CP repose sur la classification TNM qui permet de déterminer la démarche thérapeutique

Cette classification est établie par l'IASLC (International Association For The Study Of Lung Cancer), la dernière version est élaborée en 2017 dans sa huitième édition. (**Tableau II et III**).

*Tableau II : Classification TNM 2017 [17]*

**Tumeur primitive (T)**

Tx : Tumeur ne peut être évaluée sans visualisation de la tumeur par des examens endoscopiques ou d'imagerie.

T0 : Pas d'évidence de tumeur primitive.

Tis : Carcinome in situ.

T1 : Tumeur  $\leq$  3 cm dans sa plus grande dimension, viscérale, sans évidence.

T1a : Tumeur  $\leq$  1 cm dans sa plus grande dimension.

T1b : Tumeur  $>$  1 cm, mais  $\leq$  2 cm dans sa plus grande dimension.

T1c : Tumeur  $>$  2 cm, mais  $\leq$  3 cm dans sa plus grande dimension.

T2 : Tumeur  $>$  3 cm, mais  $\leq$  5 cm dans sa plus grande dimension,

T2a : Tumeur  $>$  3 cm, mais  $\leq$  4 cm dans sa plus grande dimension.

T2b : Tumeur  $>$  4 cm, mais  $\leq$  5 cm dans sa plus grande dimension.

T3 : Tumeur  $>$  5 cm, mais  $\leq$  7 cm.

T4 : Tumeur  $>$  7 cm avec :

- Présence d'un ou plusieurs nodules tumoraux distincts dans un lobe homolatéral (différent de celui de la tumeur primitive).

- Envahissement direct d'une des structures suivantes : diaphragme, médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf récurrent, œsophage, corps vertébral, carène.

**Envahissement ganglionnaire (N)**

Nx : L'envahissement ganglionnaire n'a pas pu être évalué.

N0 : Absence d'envahissement ganglionnaire.

N1 : Métastase aux ganglions péribronchiques et/ou hilaires homolatéraux.

N2 : Métastase aux ganglions médiastinaux et/ou aux ganglions sous-caténaux.

N3 : Métastase aux ganglions médiastinaux controlatéraux et/ou aux ganglions sus-claviculaire, homo et controlatéraux.

**Métastases à distance (M)**

Mx : les métastases à distance n'ont pas pu être évaluées.

M0 : Absence de métastase à distance.

M1 : Présence de métastase(s) à distance.

M1a : Nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans un lobe controlatéral ;

M1b : Métastase extrathoracique unique.

M1c : Métastases extrathoraciques multiples, intéressant un ou plusieurs organes.



**Tableau III : Les stades TNM du CBNPC [17].**

<b>Stade</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
<b>Carcinome occulte</b>	Tx	N0	M0
<b>Stade 0</b>	Tis	N0	M0
<b>Stade IA1</b>	T1a	N0	M0
<b>Stade IA2</b>	T1b	N0	M0
<b>Stade IA3</b>	T1c	N0	M0
<b>Stade IB</b>	T2a	N0	M0
<b>Stade IIA</b>	T2b	N0	M0
<b>Stade IIB</b>	T1a-c	N1	M0
	T2a	N1	M0
	T2b	N1	M0
	T3	N0	M0
<b>Stade IIIA</b>	T1a-c	N2	M0
	T2a-b	N2	M0
	T3	N1	M0
	T4	N0-1	M0
<b>Stade IIIB</b>	T1a-c	N3	M0
	T2a-b	N3	M0
	T3	N2	M0
	T4	N2	M0
<b>Stade IIIC</b>	T3	N3	M0
	T4	N3	M0
<b>Stade IVA</b>	Tout T	Tout N	M1a
	Tout T	Tout N	M1b
<b>Stade IVB</b>	Tout T	Tout N	M1c

## **VIII. CLASSIFICATION HISTOLOGIQUE DU CANCER DU POUMON**

Selon la classification histologique qui repose sur la taille et l'aspect des cellules tumorales observées au microscope, les CBs se subdivisent en deux groupes : le CB non à petites cellules (CBNPC) et le CB à petites cellules (CBPC). Le CBNPC représente 85% de l'ensemble des cancers du poumon, alors que 15% est représenté par le CBPC [18].

## **1. Cancer bronchique non à petites cellules**

Le CBNPC regroupe plusieurs sous-types dont les principaux sont : les adénocarcinomes (ADC), les carcinomes épidermoïdes (CE) et les carcinomes à grandes cellules (CGC).

### **A. Adénocarcinomes**

Les ADC représentent 38.5% des cancers du poumon, c'est le type le plus courant de CBNPC. Il s'agit d'une tumeur épithéliale maligne à différenciation glandulaire qui est détectable par l'expression de certains marqueurs immunohistochimiques comme le facteur de transcription thyroïdien (TTF1) ou la napsine, ou bien par coloration à la mucine [18]. Ils peuvent se classer selon la forme des cellules tumorales en :

- ADC acineux : les cellules sont en forme de petits sacs
- ADC papillaires : les cellules prennent la forme de doigt de gant, quand ces cellules sont de petite taille ils sont appelés micropapillaires.
- ADC solides : quand il s'agit de cellules épaisses [19].

### **B. Carcinomes épidermoïdes**

Les CE représentent 20 à 30% des cancers du poumon, ils se développent à partir des cellules basales qui n'expriment pas le facteur de transcription thyroïdien, mais possèdent comme marqueur immunohistochimique le p40 ou le p63. Ce carcinome est fortement lié à la consommation de tabac, et se caractérise par la synthèse de kératine [20].

### **C. Carcinomes à grandes cellules**

Les CGC représentent 2.9% des cancers du poumon, ils ne présentent pas de marqueurs immunohistochimiques ni de signes histologiques de différenciations glandulaires, épidermoïdes ou à petites cellules. Il s'agit plutôt d'un diagnostic d'exclusion [18].

## **2. Cancer bronchique à petites cellules**

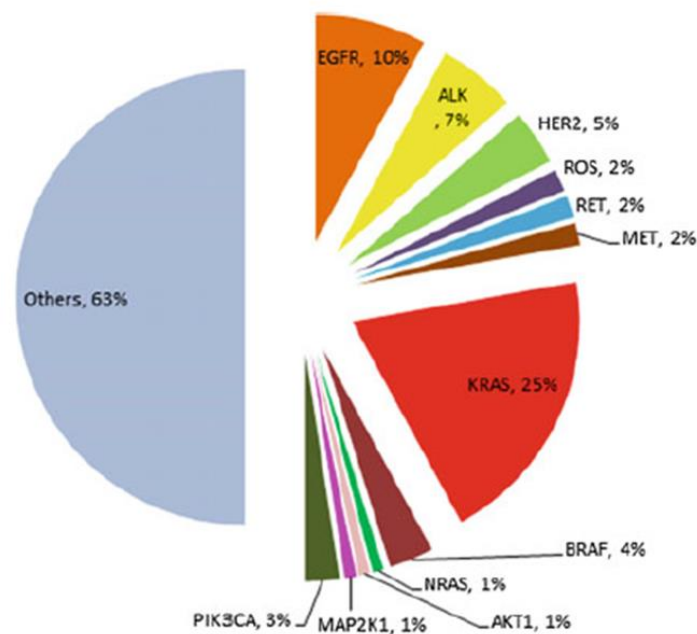
Le CBPC représente 13 à 15% des cancers du poumon. Il se caractérise par une progression très agressive, un taux de croissance rapide, une angiogenèse accrue et un potentiel métastatique élevé. C'est le type histopathologique le plus agressif du cancer du poumon, la plupart des patients au moment du premier diagnostic sont déjà métastatiques. C'est un type de cancer difficile à traiter.

De point de vue histologique, il s'agit d'une tumeur épithéliale maligne constituée de petites cellules avec des bordures cellulaires mal définies, une chromatine nucléaire finement granuleuse, des nucléotides absents ou discrets avec peu de cytoplasme [21].

## IX. ETUDE MOLECULAIRE DU CANCER DU POU MON NON A PETITES CELLULES

Les études moléculaires ont révolutionné la prise en charge du cancer bronchique. Ces études moléculaires permettent de chercher des biomarqueurs spécifiques, ces biomarqueurs peuvent renseigner sur le risque de développer un cancer, le détecter à un stade précoce, et établir son pronostic et vérifier l'éligibilité à la thérapie ciblée.

La prise en charge repose essentiellement sur l'exploitation des mutations oncogéniques qui sont considérés comme biomarqueurs de ce type de cancer [22].



**Figure 11** : Gènes fréquemment mutés dans le CBNPC et leurs fréquences [18]

Les Gènes les plus étudiés sont :

### 1. Gènes de la famille RAS

La famille des proto-oncogènes *Rat Sarcoma (RAS)* comprend trois gènes bien caractérisés : *KRAS (Kristen Ras Sarcoma)*, *NRAS (Neuroblastoma Rat Sarcoma)* et *HRAS (Harvey Rat sarcoma virus)*. Ils jouent un rôle dans la signalisation cellulaire à travers la synthèse des protéines GTPases associées à la membrane. Toute dérégulation dans les voies de signalisation RAS peut être à l'origine d'un état pathologique humain, des mutations de ces gènes peuvent être des moteurs importants de la tumorigenèse [23].

Chez les patients atteints du CBNPC, les mutations portent particulièrement sur les gènes *KRAS* (*Kristen Ras Sarcoma*) et *NRAS* (*Neuroblastoma Rat Sarcoma*) (**Figure 11**).

#### ➤ **KRAS**

Le *KRAS* est un oncogène situé sur le chromosome 12 (12p12), c'est le gène le plus fréquemment muté (environ 25%) de la famille *RAS* dans différents cancers [24]. Il est muté de 20 à 30% chez les patients atteints du CBNPC surtout ceux avec le sous-type histologique ADC, ces mutations touchent le codon 12 ou 13 et développent la croissance tumorale en activant les voies de signalisation y compris la voie tyrosine kinase [25]. Plusieurs types de mutations du *KRAS* sont détectés, mais la mutation la plus commune est la G12C qui est trouvée surtout chez les fumeurs, cette mutation augmente le risque du décès et donc pourrait être une cible thérapeutique [24].

#### ➤ **NRAS**

Le *NRAS* est un oncogène situé sur le chromosome 1 (1p13.2) il est muté de 8% dans différents cancers et de 0.7 à 1.2% chez les patients atteints de CBNPC. La plupart de ces mutations sont observés dans le codon 61 (Q61) au niveau de l'exon 3 [26].

## **2. ALK**

L'*Anaplastic Lymphoma Kinase* (*ALK*) est un oncogène situé sur le chromosome 2 (2p23). Dans les cancers humains, il est activé par des fusions, une amplification des gènes ou par des mutations ponctuelles. Ce gène est muté de 3 à 5% chez les patients atteints du CBNPC.

Le partenaire prédominant dans le CP positif à la fusion *ALK* implique la protéine like 4 associées aux microtubules d'Echinoderme (*EML4*). Le gène de fusion *EML4-ALK* est généré par une inversion paracentrique [inv (2) (p21 p23)], dont plusieurs variants oncogènes contenant les exons 20 à 29 d'*ALK* sont décrits (V1, V2, V3). Cette fusion permet l'activation de plusieurs voies de signalisation comme la voie de la protéine kinase activée par les mitogènes et la kinase régulée par le signal extracellulaire (*MAPK/ERK*) ce qui provoque une prolifération cellulaire accrue et une survie cellulaire [27, 28].

## **3. PIK3CA**

La voie de signalisation *PIK3* (*Phosphonositide-3-Kinase*) contrôle la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose. Dans de nombreux cancers, cette voie est activée, elle est liée à l'oncogénèse et à la progression tumorale en assurant la croissance et la survie cellulaire [29]. Le gène *PIK3* se divise en plusieurs classes, la classe IA constitue une sous-

unité catalytique p110 $\alpha$  qui est codé par la *Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-Kinase catalytic submit alpha (PIK3CA)* [28].

Le *PIK3CA* est situé sur le chromosome 3 (3q26), il est muté chez 1 à 4% des patients atteints du CBNPC. La mutation la plus fréquente est la H1047R au niveau de l'exon 20, d'autres mutations sont communes telles que la E542K et la E545K au niveau de l'exon 19 [28].

#### **4. ROS1**

Le *Ros proto oncogene 1, receptor tyrosine kinase ROS1* est situé sur le bras long du chromosome 6 (6q22), il code pour un récepteur tyrosine kinase. Les CBNPC à fusion *ROS1* positive représentent 1 à 2%, chez des patients jeunes, de sexe féminin, sans antécédents significatifs du tabagisme qui présentent comme sous-type histologique ADC.

L'expression des gènes de fusion entraîne une autophosphorylation de la tyrosine kinase *ROS1* initiant une cascade de signalisation via la voie MAPK ce qui entraîne la prolifération tumorale [30].

#### **5. Gènes RAF**

Les *Rapidly accelerated fibrosarcoma (RAF)* sont des kinases qui codent pour des protéines qui jouent un rôle dans la transduction du signal cellulaire à travers la signalisation de la voie *RAS*, ce sont des effecteurs des *RAS* GTPases. Les membres de la famille *RAF* comportent un domaine de liaison *RAS* « *Ras binding domaine* » *RBD* au niveau de leur région N-terminale.

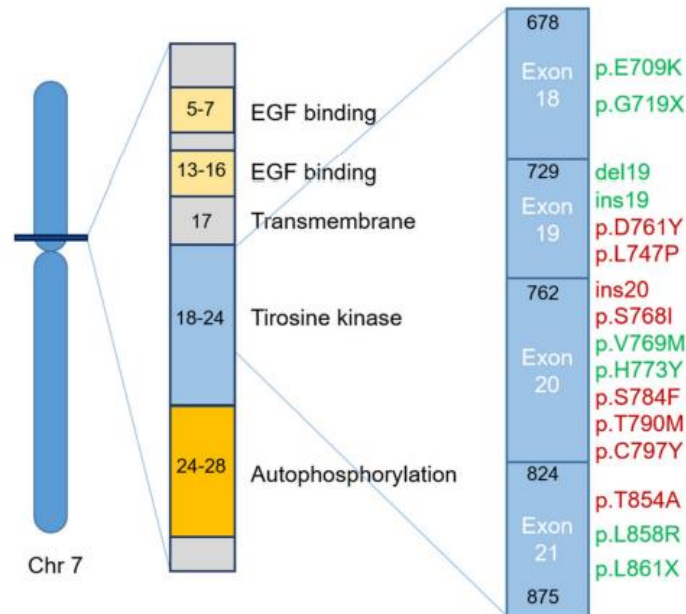
La dérégulation de l'activité de *RAF* à cause des mutations est observée dans plusieurs cancers humains notamment le CP. [5] le gène *BRAF* (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog *B*) est le membre le plus muté de la famille *RAS* dans le CBNPC.

Dans notre étude nous nous sommes intéressés à trois gènes impliqués dans le CBNPC, il s'agit de l'*EGFR*, l'*HER2* et le *BRAF*.

## X. EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR « *EGFR* »

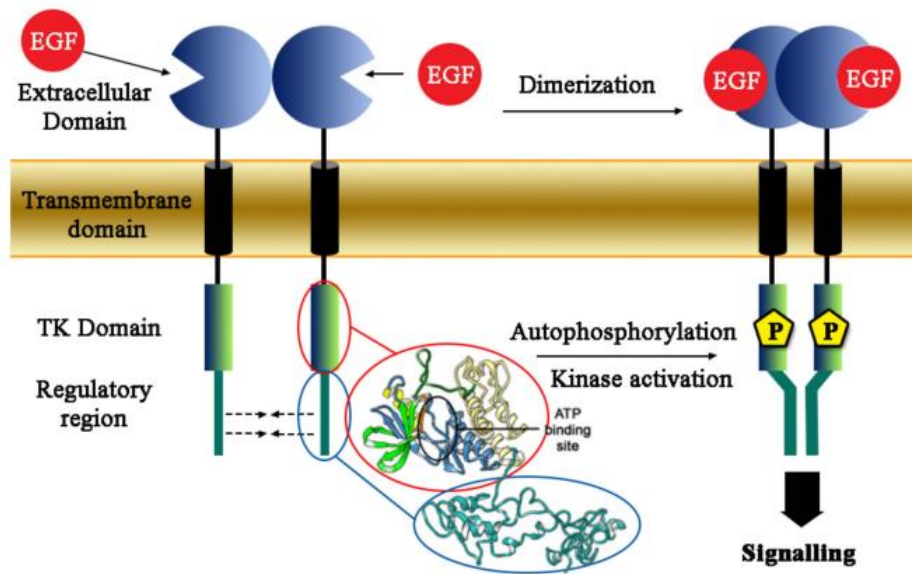
### 1. Le gène *EGFR*

Le gène *EGFR* est situé sur le chromosome 7 [7p11.2] (**Figure 12**).



**Figure 12** : Localisation du gène *EGFR* et les mutations fréquentes dans le CBNPC [31].

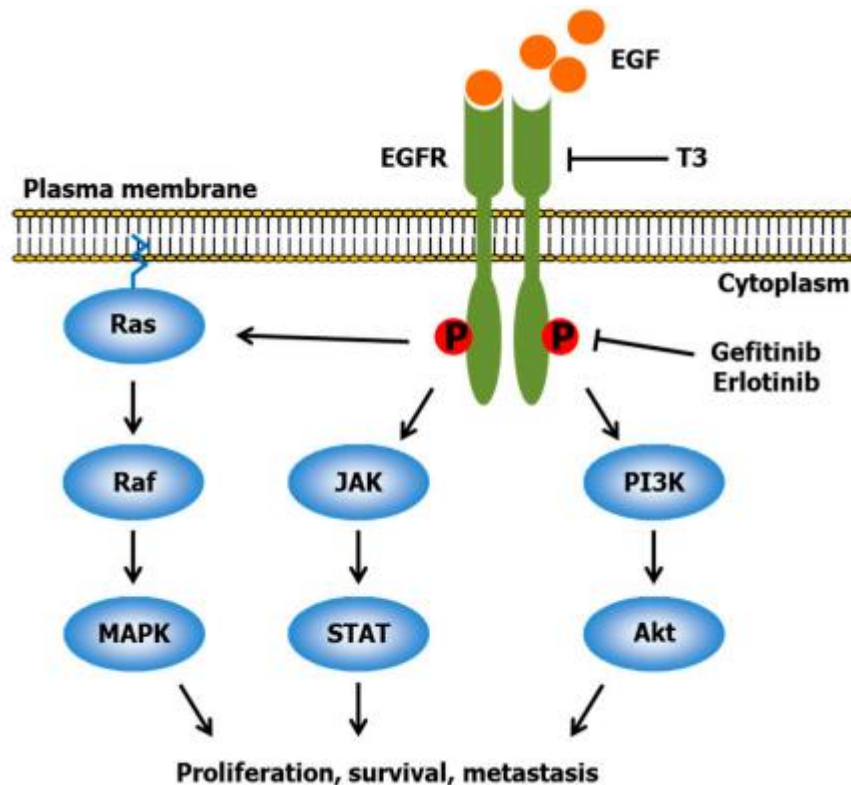
Il code pour un récepteur tyrosine kinase transmembranaire « *EGFR* » appartenant à la famille *Human Epidermal Growth Factor [HER] (HER1 / ErbB1)* qui est constitué de 3 domaines : extracellulaire, intramembranaire et intracellulaire. La protéine *EGF (Facteur de croissance épidermique)* se lie sur le récepteur via le domaine extracellulaire ce qui entraîne son activation, cela induit l'homodimérisation avec un autre récepteur *EGFR* ou l'hétérodimérisation avec d'autres protéines de la famille des récepteurs du facteur de croissance épithélial, conduisant à l'autophosphorylation des domaines intracellulaire et donc la production de protéines assurant la différenciation et la prolifération cellulaire (**Figure 13**) [32]. Ce gène est muté chez 10% des patients avec un CBNPC (**Figure 11**).



*Figure 13 : Structure du récepteur EGFR et mécanisme de dimérisation [32]*

## 2. Voies de signalisation

Lors de la stimulation de l'EGFR, tout un réseau de signalisation s'active entraînant la prolifération, la croissance, la différenciation et la migration cellulaire (**Figure 14**).

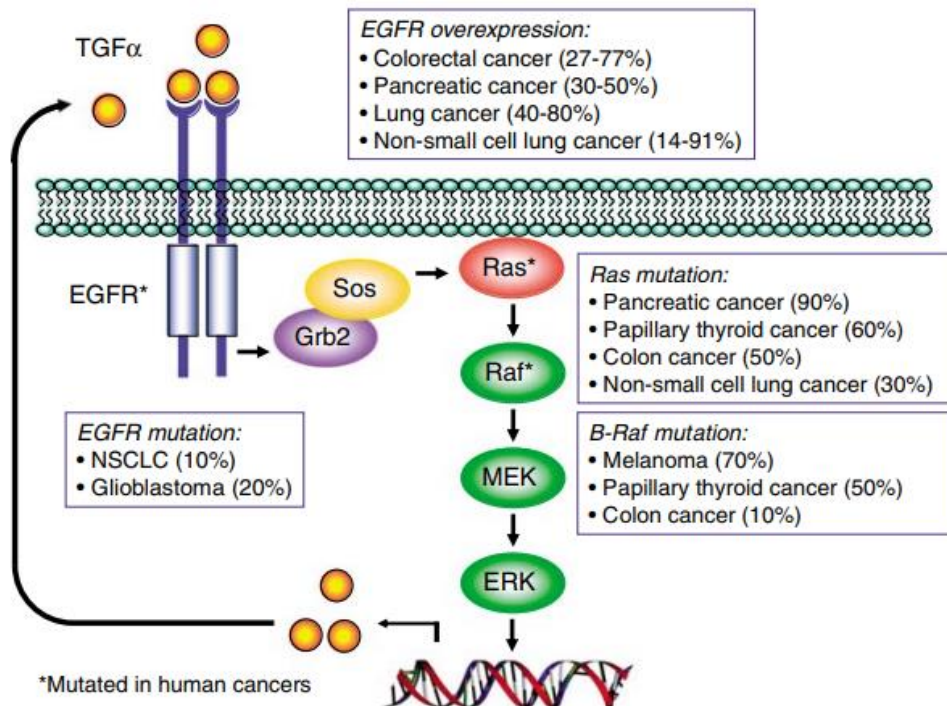


*Figure 14 : Voies de signalisation de l'EGFR [33]*

## A. Voie Ras/Raf/MEK/ERK

Cette voie se déclenche avec l'activation du récepteur EGFR via la fixation des ligands extracellulaires tel que l'*EGF*, ce qui active l'activité tyrosine kinase. La phosphorylation du récepteur permet l'activation de la protéine *GRB2* (*Growth factor receptor-bound protein 2*) à travers son domaine *SH2* (*Src Homology 2*), elle se lie au facteur d'échange nucléotide *SOS* (*Son of Sevenless*) qui s'active et active un membre de la sous-famille *Ras* (*KRAS, NRAS...*) qui à son tour active l'activité tyrosine kinase d'une kinase *Raf* (*BRAF, CRAF...*). Le *Raf* phosphoryle le *MEK* (*Mitogen activated protein kinase kinase*) qui elle-même active l'*ERK* (*Extracellular signal-regulated kinase*), une protéine qui favorise la transcription des gènes qui assurent la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire (**Figure 15**).

Une rétroaction autocrine médiée par certains facteurs activé par ERK comme le *TGF $\alpha$*  (*transforming growth factor alpha*) peuvent stimuler l'activité de l'EGFR donc de la voie Ras/Raf/MEK/ERK (**Figure 15**). La régulation aberrante de cette cascade et la mutation de ces intermédiaires contribuent au cancer dont le CBNPC fait partie [34].



**Figure 15 :** Voie de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK [34]



## B. Voie JAK/STAT

*Janus kinases (JAK)* sont des protéines qui appartiennent à une famille tyrosines kinases intracellulaires qui comprennent quatre membres *JAK1*, *JAK2*, *JAK3* et la tyrosine kinase 2 (*TYK2*), alors que (*STAT*) *Signal transducer and activator of transcription* sont des transducteurs du signal qui comprennent sept membres *STAT1*, *STAT2*, *STAT3*, *STAT4*, *STAT5a/b* et *STAT6*.

Suite à la fixation des facteurs de croissance sur le récepteur tyrosine kinase EGFR il s'active et active les *JAKs* qui eux-mêmes activent les *STATs* entraînant leurs translocations vers le noyau (**Figure 14**). Cette voie active les facteurs de transcription qui ont pour rôle la différenciation et la prolifération cellulaire, ainsi que les protéines qui exercent un rétrocontrôle négatif sur la voie *JAK-STAT* elle-même. Au niveau des cellules cancéreuses du CBNPC, la surexpression de *STAT3* entraîne l'expression accrue des gènes qui augmentent la prolifération et la survie cellulaire, même les effets biologiques de l'inhibition de cette voie dans ce cancer sont variables [35].

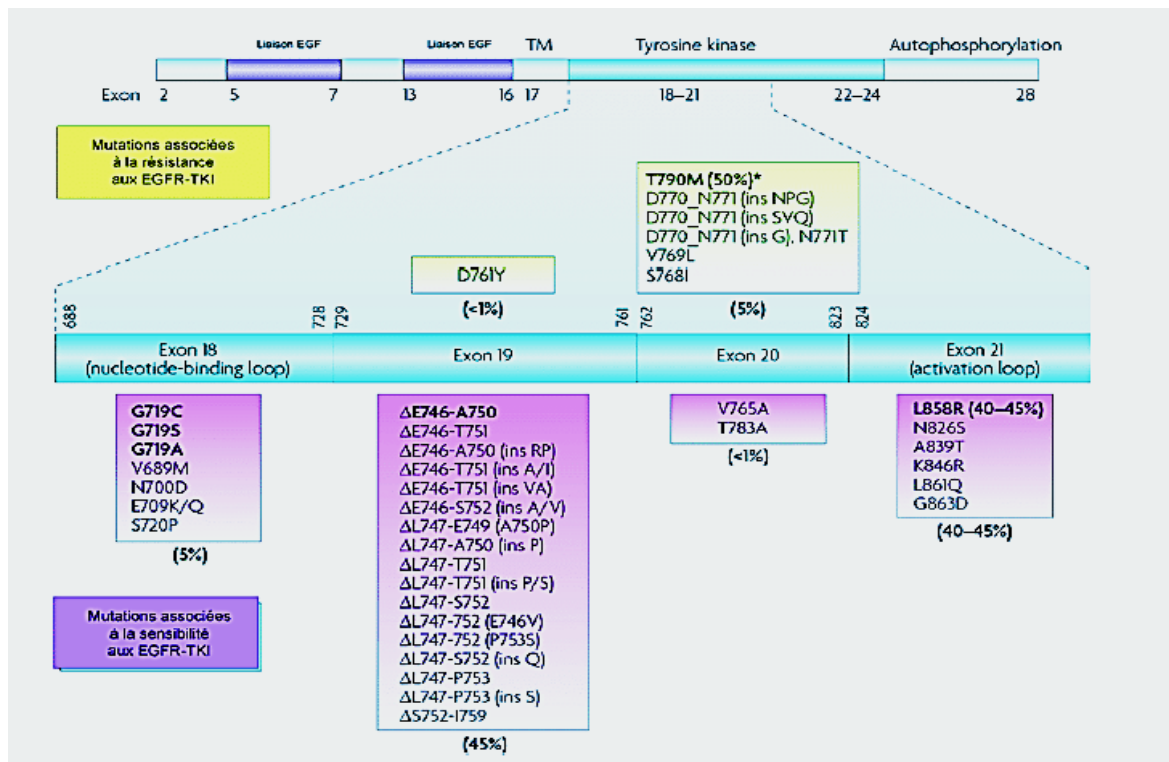
## C. Voie PI3K/AKT

Cette voie contrôle le métabolisme, la prolifération, la survie cellulaire et l'apoptose. *PIK3CA* est la molécule de signalisation qui s'active via les récepteurs de facteurs de croissance tels que l'EGFR elle-même phosphoryle l'AKT qui active la mTOR (*mammalian target of rapamycin*) un contrôleur de la croissance, la survie et la prolifération (**Figure 14**).

Dans le cancer cette voie est hyperactivée en raison de mutation de *PIK3CA* ou de l'*EGFR* [28].

### 3. Mutations d'*EGFR* dans le CBNPC

Au sein des quatre premiers exons du domaine tyrosines kinases (les exons 18 à 21) du gène *EGFR*, des mutations ponctuelles et des indel (insertions – délétions) sont répertoriées chez les patients atteints du CBNPC. Les mutations de l'exon 19 constituent 45%, suivies de mutations ponctuelles dans l'exon 21 qui constituent 40% à 45% dont la mutation L858R est la mutation ponctuelle la plus fréquente. Les mutations de l'exon 18 et l'exon 20 constituent chacune 5% (**Figure 16**).



**Figure 16 :** Mutation du gène *EGFR* détectées dans le *CBNPC* [36]

#### 4. Les inhibiteurs d'*EGFR*

A ce jour, trois générations des inhibiteurs de Tyrosine Kinase (ITK) sont proposées pour les patients *EGFR* positifs :

- ITK de première génération : Le Gécitinib, l'Erlotinib et l'Icotinib constituent la première génération d'*EGFR*-TKI, qui sont tous réversibles. Le Gécitinib a été approuvé comme médicament de première intention par la Food and Drug Administration (FDA) en 2015. Ces médicaments oraux se fixent sur la poche de fixation de l'ATP ce qui induit l'inhibition de l'autophosphorylation ainsi que les voies en aval (**Figure 14**). Chez des patients présentent le sous-type ADC avec des mutations au niveau de l'*EGFR*, ces deux molécules ont montré une activité antitumorale puissante, les études ont montré également le bénéfice de l'association des ITK avec la chimiothérapie chez ses patients [35].
- Inhibiteurs de Tyrosine Kinase de deuxième génération : la première génération d'inhibiteurs de l'*EGFR* a été bénéfique pour les patients, jusqu'à ce que les patients ont commencé à développer une résistance. Les inhibiteurs de l'*EGFR* de deuxième génération sont des médicaments irréversibles qui ont davantage des cibles que la première génération, ce qui entraîne des effets secondaires plus importants.

L'Afatinib et le Dacomitinib ont été approuvés comme médicaments de première intention.

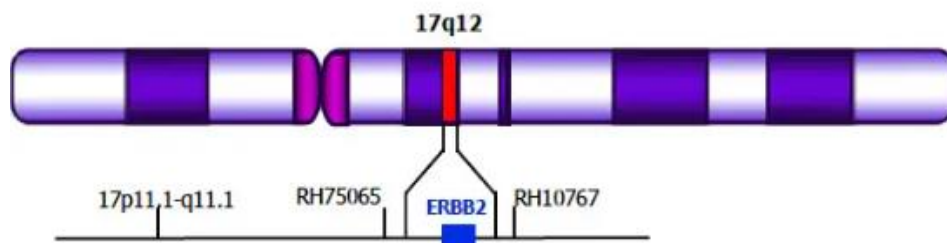
- Inhibiteurs de Tyrosine Kinase de troisième génération : avec l'utilisation des inhibiteurs de première et de deuxième génération, une résistance aux médicaments est apparue chez la plupart des patients, principalement en raison de la mutation T790M (exon 20). L'Osimertinib est un inhibiteur irréversible de la tyrosine kinase qui inhibe les mutations T790 M. Il présente une efficacité élevée et une faible toxicité [35].

## XI. HUMAN EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR-2 (*HER2*)

### 1. Le gène *HER2*

Le *HER2* (*Human epidermal growth factor receptor-2*) connue aussi sous le nom de *ERBB2* (*Erb-B2 Récepteur tyrosine kinase 2*) est un proto-oncogène situé sur le chromosome 17 [17q12] (**Figure 17**), il code pour un récepteur tyrosine kinase *HER2* situé au niveau de la membrane plasmique et composé de trois domaines : extracellulaire qui fixe le ligand, transmembranaire et intracytoplasmique. Il est homologue de *HER1* (*Human epidermal growth factor receptor-1*) qui code pour le récepteur EGFR.

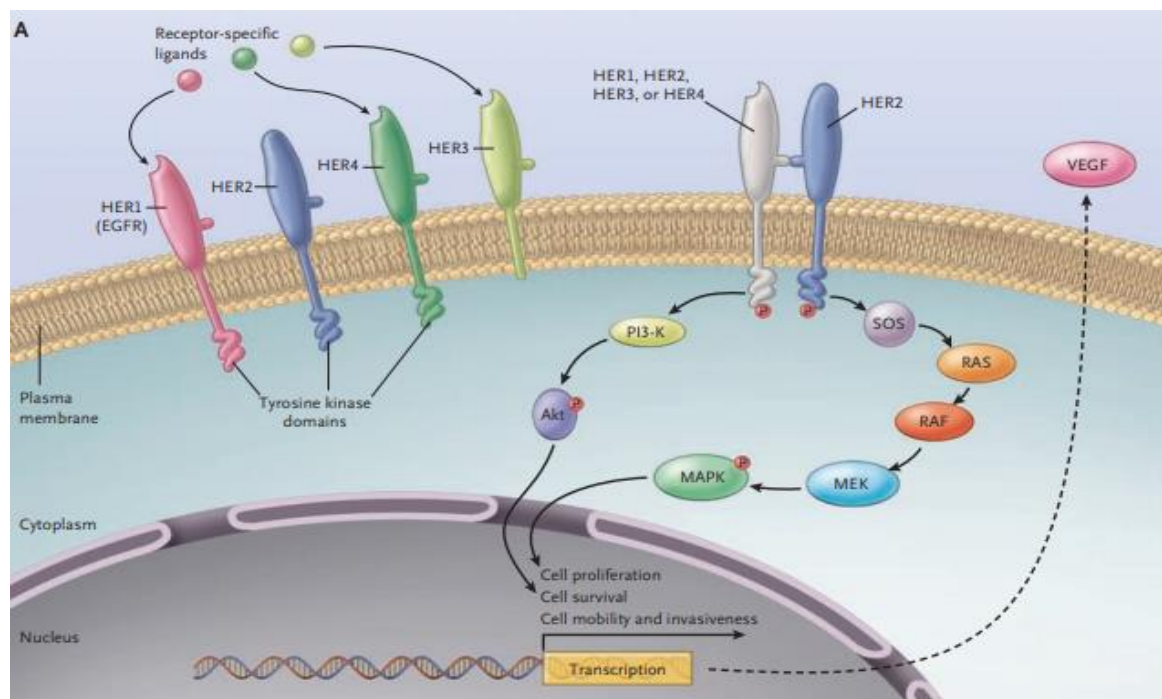
L'*HER2* augmente l'affinité des ligands pour des protéines *HER* activées induisant l'amplification des voies de signalisation *HER2* [37].



**Figure 17 :** Localisation du gène *HER2* sur le chromosome 17 [38]

### 2. Voies de signalisation

La fixation du ligand sur le domaine extracellulaire entraîne l'homodimérisation du récepteur *HER2* s'il est très exprimé ou l'hétérodimérisation avec d'autres familles *HER* surtout avec l'EGFR, induisant la phosphorylation de son domaine tyrosine kinase donc l'activation de deux voies de signalisation : la voie *PI3K/AKT* et la voie *RAS/RAF/MEK/ERK* (détaillées précédemment). Cela active la transcription de gènes responsables de la différenciation, la prolifération et la survie cellulaire (**Figure 18**).



**Figure 18 : Voies de signalisation activée par l'HER2 [39]**

### 3. HER2 et CBNPC

L'HER2 joue un rôle dans le développement et la progression du CBNPC à travers l'amplification des voies de signalisation cela en formant un hétérodimère avec l'EGFR ou bien un homodimère avec un autre récepteur HER2 . Des altérations au niveau de ce gène sont distinguées dans 2 à 4% des cas de CBNPC. Les mutations constituent 1 à 4%, les amplifications génétiques 2 à 5% et la surexpression 2 à 30%. Au niveau du domaine tyrosine kinase, l'insertion de 3 à 12 paires de bases (pb) au niveau de l'exon 20 est la mutation la plus fréquente (96%), elle conduit à la duplication des acides aminés YVMA au niveau du codon 775 [A775-G776 ins YVMA], des mutations ponctuelles sont aussi détectées telle que la L755S et la D769Y dans l'exon 19. D'autres mutations au niveau du domaine transmembranaire dans différents exons peuvent se présenter chez certains patients [G660D, R678Q, E693K et Q709L]. Ces mutations sont généralement observées chez des femmes asiatiques non-fumeuses qui présentent le sous-type histologique ADC [37].

### 4. Les inhibiteurs de HER2

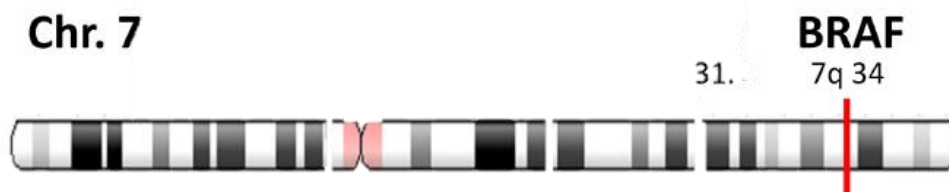
Plusieurs études ont montré l'efficacité des anti-HER2 chez des patients atteints du CBNPC. Les conjugués anticorps-médicaments présentent des taux de réponse élevés et des résultats de survie meilleurs, ils sont des agents antitumoraux qui perturbent la dimérisation des récepteurs tyrosines kinases, ces résultats s'améliorent encore plus avec l'association de la chimiothérapie.

Le Poziotinib et le Pyrotinibe sont des ITK inhibent l'autophosphorylation et l'homodimérisation du récepteur HER2 ou sa dimérisation avec le récepteur l'EGFR, l'activité de ces médicaments s'ajoute avec l'association de la chimiothérapie [40].

## XII. V-RAF MURINE SARCOMA VIRAL ONCOGENE HOMOLOG B

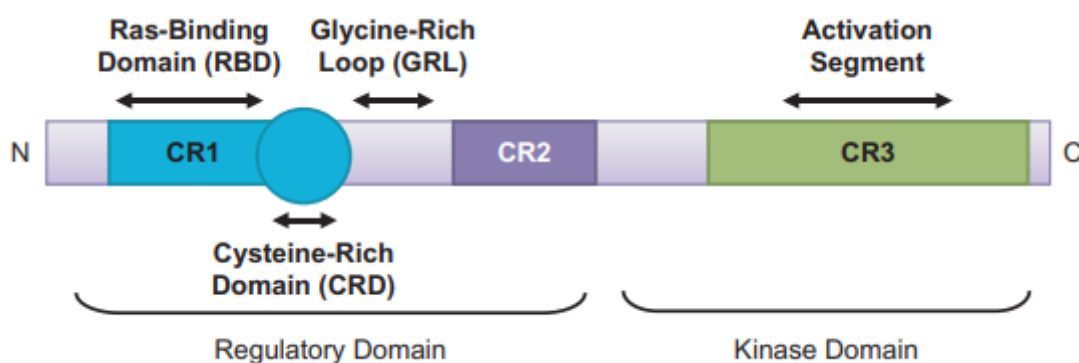
### 1. Le gène *BRAF*

Le *BRAF* est un proto-oncogène de la famille *RAF* situé au niveau du bras long du chromosome 7 (7q34), il code pour une protéine sérine/thréonine kinase « BRAF » (**Figure 19**).



**Figure 19** : Localisation du gène *BRAF* sur le chromosome 7 [41]

Les protéines de la famille *RAF* (*ARAF*, *BRAF* et *CRAF*) partageant trois régions conservées *CR1* (conserved region 1), *CR2* (conserved region 2) situés sur le domaine régulateur et *CR3* (conserved region 3) situé sur le domaine kinase ; ils contiennent respectivement le domaine de liaison *RAS RBD* (*Ras binding domain*) et un domaine riche en cystéine *CRD* (*cysteine rich domain*) [*CR1*], les sites de phosphorylation [*CR2*], un domaine de liaison [*CR3*] (**Figure 20**) [42].

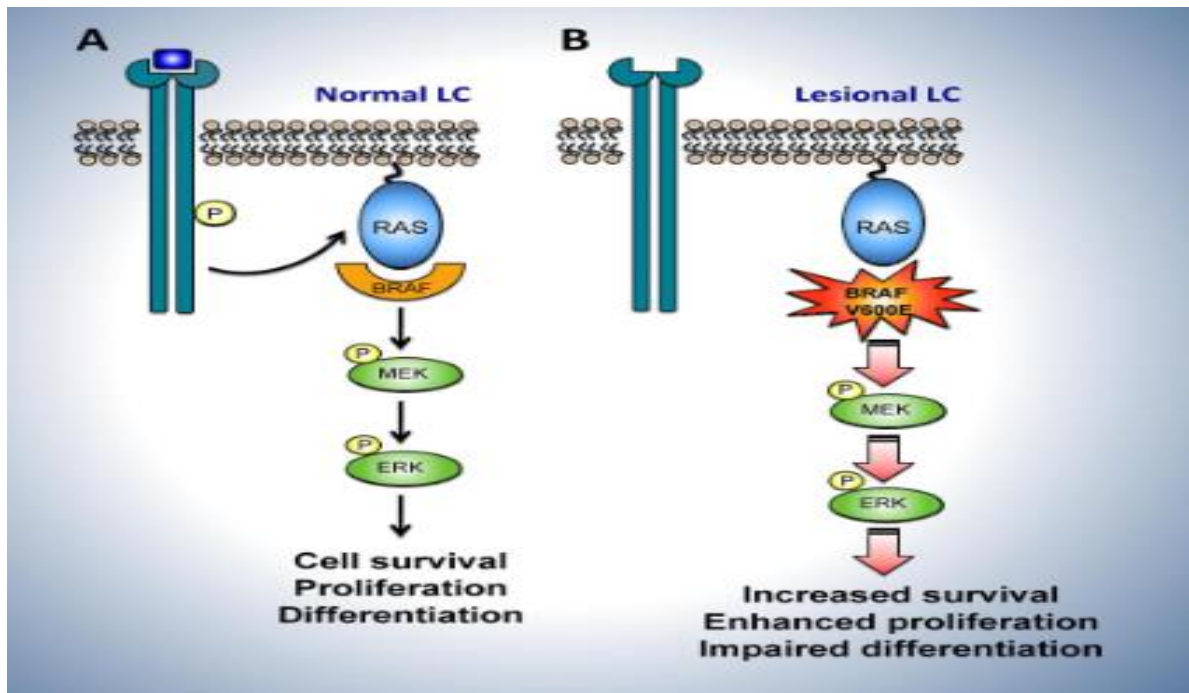


**Figure 20** : Les régions conservées des protéines de la famille *RAF* [42]

### 2. Voies de signalisation

La protéine *BRAF* joue un rôle majeur dans la transduction de signal au niveau de la voie tyrosine kinase *RAS/RAF/MEK/ERK* qui est essentielle pour la prolifération, la différenciation, la croissance et la survie cellulaire. La stimulation cellulaire d'un récepteur tyrosine kinase (*EGFR*, *HER2*...) par un facteur de croissance comme l'*EGF* active la cascade

de signalisation dont la BRAF constitue une protéine élémentaire de la famille *RAF* au niveau de cette voie (**Figure 21**) [43].



**Figure 21** : Voie de signalisation avec la *BRAF* normale (A) et la *BRAF* lésionnelle (B) [43]

### 3. *BRAF* et CBNPC

Dans différents types de cancers, des mutations du gène *BRAF* ont été trouvées, elles sont détectées dans 1 à 3% des CBNPC. La mutation prédominante est la V600E au niveau de l'exon 15 et est observée majoritairement dans le sous-type histologique ADC (1 à 2%) chez des patients non-fumeurs ou chez des fumeurs légers, elle est très remarquable chez les femmes que chez les hommes. Les personnes portant cette mutation ont montré une faible réponse à la chimiothérapie.

Les mutations oncogènes *BRAF* sont mutuellement exclusives avec ceux de *EGFR* provoquent un accroissement de la fonction kinase à travers l'activation de la voie RAS/RAF/MEK/ERK induisant la prolifération, la différenciation et la survie de la cellule cancéreuse (**Figure 21**) [44].

#### **4. Inhibiteurs de *BRAF***

La détermination des mutations de *BRAF* et leurs implications dans la tumorigenèse a permis le développement des inhibiteurs compétitifs de l'ATP inhibant ainsi l'autophosphorylation. Le Vémurafénib et le Dabrafénib sont des médicaments approuvés par l'EMA (European Medicines Agency) et la FDA, ils ont montré de bons résultats chez plusieurs patients atteints du CBNPC surtout ceux présentant la mutation V600E. l'association du Dabrafenib et du Trametinib a montré des résultats plus efficaces que la monothérapie [44].

La résistance à ces inhibiteurs est observée chez plusieurs patients, cela peut être dû à :

- L'activation de la voie MAPK via des voies de signalisations alternatives.
- La réactivation de ERK à travers la voie MAPK.
- Les mécanismes inconnus [44].

# *Volet Expérimental*



## **I. MATERIEL ET METHODES**

### **1. Echantillonnage et population d'étude**

#### **A. Population d'étude**

Notre population est constituée de 30 patients atteints d'un cancer primitif de poumon, ayant été hospitalisés au Service de chirurgie thoracique relevant du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) Ibn Rochd Casablanca, et qui ont subi soit : une bronchoscopie rigide, une médiastinoscopie, une lobectomie ou pneumonectomie par VATS (lobectomie par thoracoscopie vidéo assistée).

Critères d'inclusion : Les cas inclus dans notre étude sont des patients ayant un cancer broncho-pulmonaire primitif confirmé histologiquement.

Critères d'exclusion : Nous avons exclu de notre étude les patients porteurs de tumeurs suspectes d'être secondaires et les carcinomes probables retenus dans un contexte clinique, radiologique et endoscopique évocateur avec une cytologie objectivant des signes de malignité.

#### **B. Matériel biologique**

Dans le cadre de cette étude prospective, des biopsies fraîches de tumeurs bronchiques ont été collectées depuis 2019 à ce jour.

Le comité pour la Recherche et l'Ethique du Centre Hospitalier Ibn Rochd a donné l'accord pour la réalisation de cette étude.

Les échantillons ont été placés dans des tubes stériles contenant du RNAlater et acheminés au laboratoire de l'URMB (l'Unité de Recherches Médicales et Biologiques) /CNESTEN (Centre National de l'Energie des Sciences et des Techniques Nucléaires), où sont conservés à -80 °C jusqu'à utilisation.

### **2. Méthodes**

#### **A. Extraction d'ADN**

L'extraction d'ADN génomique a été effectuée selon la méthode classique « phénol-chloroforme » qui est du type liquide-liquide. Cette technique permet l'obtention de deux phases : la phase organique constituée de protéines et de débris cellulaires, et la phase aqueuse qui comporte les acides nucléiques.

La biopsie a été découpée en petits fragments à l'aide d'une lame stérile, puis en utilisant un mortier elle a été broyée à température ambiante jusqu'à homogénéisation. Elle a été ensuite transférée dans un tube eppendorf où va se produire la lyse cellulaire tout en ajoutant 300 µl du

tampon de lyse (1 ml Tris 1M pH, 8,20 ml EDTA 0,5 M pH 8, 2,5 ml SDS 20%-H<sub>2</sub>O qsp 100 ml) et 30 µl de protéinase K (20 mg/ml), le mélange a été incubé à 42 °C toute la nuit sous agitation. Après la digestion protéique, le « Phénol chloroforme » (300 µl) a été ajouté, l'ensemble a été agité et centrifugé pendant 15 min à 13000 rpm. Le surnageant a été récupéré auquel a été ajouté le même volume de l'isopropanol et 2/5 du volume de l'acétate d'ammonium. Par la suite l'ADN apparaît sous forme d'une méduse au sein de la solution après vortex, les tubes sont ensuite stockés à -20 °C pendant toute la nuit.

Après une centrifugation durant 15 min à 13000 rpm afin d'éliminer l'excès de l'isopropanol et d'acétate d'ammonium, un lavage d'ADN par l'éthanol 70% (500 µl) a été effectuée, une autre centrifugation avait lieu pendant 15 min à 12000 rpm. Le surnageant a été éliminé et le culot a été séché pendant 1 heure à température ambiante ou bien 20 min à 37 °C pour éliminer les traces de l'alcool. L'ADN a été reconstitué dans 50 µl d'eau (RNase/DNase Free), suivi d'une dissolution à 4 °C pendant 24h. L'échantillon a été ensuite conservé à -20 °C jusqu'à utilisation.

## **B. Dosage d'ADN**

À l'aide du Nano-drope (2000 spectrophotomètres UV-Visible ; Thermo-Scientific), on procède à une évaluation quantitative et qualitative de l'ADN extrait. Cet appareil calcule les ratios suivants :

- **Le ratio 260/280** : indique la pureté de l'ADN qui est considérée comme pur si la valeur du ratio est comprise entre 1.8 et 2, une valeur inférieure prouve la contamination de l'extrait par des protéines, du phénol ou d'autres contaminants qui absorbent à 280 nm.
- **Le ratio 260/230** : mesure la pureté secondaire de l'ADN, une valeur comprise entre 2 et 2.2 indique sur cette pureté, alors qu'une valeur inférieure veut dire que l'extrait est contaminé par des contaminants qui absorbent à 230 nm.

## **C. Contrôle de la qualité de l'ADN extrait par amplification du gène *GAPDH***

Le *Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase* « *GAPDH* » est un gène de ménage situé sur le chromosome 12, il joue un rôle dans la viabilité et le maintien des cellules et s'utilise très souvent comme gène de référence pour l'analyse de l'expression génique. Le *GAPDH* présente une expression tissulaire spécifique pour chaque organe [45].

L'amplification de ce gène par Polymerase Chain Reaction (PCR) a été utilisée pour le contrôle qualitatif de l'ADN extrait.

### **i. Amorces**

Les amorces utilisées dans la PCR sont présentées dans le **tableau IV** :

**Tableau IV : Les amorces du gène GAPDH**

	<b>Amorces (5' → 3')</b>	<b>Tm</b>	<b>Taille du produit</b>
<b>GAPDH (F)</b>	GAA GGT GAA GGT CGG AGT C	60 °C	226 pb
<b>GAPDH (R)</b>	GAA GAT GGT GAT GGG ATT TC		

### **ii. Protocole PCR**

Le volume réactionnel est fixé de 22 µl, dont les différents constituants du mélange réactionnel sont donnés dans le **tableau V** :

**Tableau V : Concentrations et volumes utilisés pour la PCR.**

<b>Réactifs</b>	<b>Concentrations</b>	<b>Volumes (en µl)</b>
<b>H2O (DNase,RNase free)</b>	-	14.7
<b>Tampon (Dream Taq Buffer)</b>	10 X	2
<b>DNTPs</b>	10 mM	2
<b>Amorces sens (F)</b>	10 µM	0.6
<b>Amorce anti-sens (R)</b>	10 µM	0.6
<b>Dream Taq polymérase</b>	5 U/µl	0.1
<b>ADN</b>	50 à 100 ng/µl	2

Les tubes qui comportent le mélange réactionnel ont été ensuite placés dans un thermocycleur « Gene Amp PCR System 9700 » de la compagnie « Applied Biosystems », l'amplification s'effectue selon le programme suivant (**Tableau VI**) :

*Tableau VI : Programme de la PCR pour le gène GAPDH.*

Cycles	Température	Temps
Dénaturation initiale	95 °C	3 min
40 cycles	Dénaturation	95 °C
	Hybridation	60 °C
	Elongation	72 °C
Elongation finale	72 °C	5 min
Conservation	4 °C	∞

### iii. Migration sur gel d'électrophorèse

Les résultats de la PCR ont été visualisés par une électrophorèse sur gel d'agarose (2%).

#### ➤ Préparation du gel d'agarose

Le gel préparé est de 2% : un volume de 100 ml de Tris Borate EDTA (TBE) 0.5 X a été ajouté à 2g d'agarose, le mélange a été chauffé jusqu'à dissolution. Après refroidissement, 6 µl de bromure d'éthidium dilué (BET) ont été ajoutés, le mélange a été coulé dans le moule à gel puis laissé refroidir jusqu'à solidification.

#### ➤ Migration

Dans une cuve à électrophorèse contenant du TBE (0.5 X) le gel a été placé, il contenait des puits portants chacune un mélange de produits PCR (7 µl) avec le tampon de charge (3 µl) « bleu de bromophenol et glycérol ». Le marqueur de taille moléculaire allant de 100 pb à 1000 pb a été ajouté avec un volume de 6 µl dans un puit du gel. L'électrophorèse a été effectuée suite à un voltage de 100V pendant 40 min.

Après migration, le gel a été visualisé sous lumière UV à l'aide de l'appareil « Vilbert Lourmat » puis traité par le logiciel « GelSmart ».

## 3. Etude du statut mutationnel des gènes

### A. Amplification par PCR

Les gènes : *EGFR* [exons 18, 19, 20, 21], *HER2* [exon 20] et *BRAF* [exon 15] ont été amplifiés par PCR, puis séquencé afin d'étudier leur statut mutationnel chez des patients atteints d'un cancer bronchique. Les séquences des amorces utilisées ainsi que la taille des amplicons générés sont présentées dans le tableau suivant :

**Tableau VII : Amorces et tailles des amplicons du gène EGFR**

Gènes	Orientation	Séquence (5'→ 3')	Tm	Taille de l'amplicon
<b>HER2 Exon 20</b>	Sens (F)	CTC TCA GCG TAC CCT TGT CC	60 °C	273 pb
	Anti-Sens (R)	CCT AGC CCC TTG TGG ACA TA		
<b>EGFR Exon 18</b>	Sens (F)	CAA ATG AGC TGG CAA GTG CCG TGT C	60 °C	400 pb
	Anti-Sens (R)	GAG TTT CCC AAA CAC TCA GTG AAA C		
<b>EGFR Exon 19</b>	Sens (F)	GCA ATA TCA GCC TTA GGT GCG GCT C	58 °C	372 pb
	Anti-Sens (R)	CAT AGA AAG TGA ACA TTT AGG ATG TG		
<b>EGFR exon 20</b>	Sens (F)	CCA TGA GTA CGT ATT TTG AAA CTC	60 °C	408 pb
	Anti-Sens (R)	CAT ATC CCC ATG GCA AAC TCT TGC		
<b>EGFR Exon 21</b>	Sens (F)	CTA ACG TTC GCC AGC CAT AAG TCC	58 °C	415 pb
	Anti-Sens (R)	GCT GCG AGC TCA CCC AGA ATG TCT GG		
<b>BRAF Exon 15</b>	Sens (F)	TCA TAA TGC TTG CTC TGA TAG GA	55 °C	227 pb
	Anti-Sens (R)	GGC CAA AAA TTT AAT CAG TGG A		

La préparation du mélange réactionnel de chaque fragment cible pour amplification PCR a été faite selon le protocole décrit précédemment (**Tableau V**). Les tubes ont été placés dans le thermocycleur afin d'amplifier la séquence cible, chaque exon possède une température d'hybridation qui lui est spécifique.

**Tableau VIII : Programme de la PCR pour les gènes : EGFR, HER2 et BRAF**

	<b>Cycles</b>	<b>Temps</b>	<b>Températures</b>
	<b>Dénaturation initiale</b>	3 min	96 °C
	<b>Dénaturation</b>	30 sec	96 °C
<b>40 cycles</b>	<b>Hybridation</b>	30 sec	60 °C – 58 °C – 55 °C
	<b>Elongation</b>	30 sec	72 °C
	<b>Elongation finale</b>	7 min	72°C

### **B. Migration sur gel**

La migration a été faite sur un gel d'agarose de 2% suivant les étapes décrites auparavant.

### **C. Purification des produits PCR**

Les produits de PCR amplifiés ont été purifiés pour éliminer l'excès des amorces, dNTPs et de l'ADN polymérase. Un kit de purification ExoSAP-IT (Applied Biosystems) qui est composé de deux enzymes : une exonucléase qui dégrade les ADN simple brin (EXO), et une phosphatase alcaline (SAP) a été utilisé. 1µl d'ExoSAP-IT a été ajouté dans un tube contenant 6µl de produit PCR amplifié, le mélange a été ensuite incubé dans un thermocycleur selon le programme suivant :

- Activation de l'enzyme  37°C pendant 4 min
- Désactivation de l'enzyme  90°C pendant une minute

Les produits ont été ensuite conservés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

### **D. Réaction de séquence**

La réaction de séquence utilisée est basée sur le principe de la méthode de SANGER. Pour cela un seul brin d'ADN a été amplifié en utilisant soit l'amorce sens ou antisens. Au niveau du mélange réactionnel 4 didésoxyribonucléotides (ddNTPs) marqués différemment émettent une fluorescence après incorporation de chaque nucléotide, ainsi qu'avec les dNTPs ils arrêtent la réaction de séquence à différents endroits en fonction des brins néosynthétisés cela permet la génération de produits de séquences de différentes tailles.

Le kit BigDye ® Terminator v3.1 fournit les composants nécessaires pour la réaction de séquence qui nécessite la préparation d'un mélange réactionnel d'un volume de 10 µl dont les réactifs sont présentés dans le tableau suivant :

*Tableau IX : Réactifs utilisés dans la réaction de séquence.*

Réactifs	Volume en $\mu$ l
Eau distillée stérile	6.5
Amorce sens ou anti-sens (10 $\mu$ M)	0.5
Big Dye <sup>®</sup> Terminator v3.1	1
Produit PCR positifs	2

Ce mélange a été transféré dans une plaque de 96 puits, qui a été ensuite incubé dans le thermocycleur selon le programme suivant :

*Tableau X : Programme de la réaction de séquence*

Cycles	Température	Temps
<b>Dénaturation initiale</b>	96°C	1 min
25 Cycles	<b>Dénaturation</b>	96°C 10 sec
	<b>Elongation</b>	50°C 5 sec
	<b>Hybridation</b>	60°C 4 min
<b>Hybridation finale</b>	60°C	5 min

## **E. Purification de réaction de séquence par Sephadex G50**

Les produits de réactions de séquence ont été purifiés pour éliminer l'excès des ddNTPs, des amorces et tous autres molécules qui peuvent diminuer la qualité de la séquence ou erronée les résultats.

### **i. Principe**

Il s'agit d'une chromatographie d'exclusion qui va permettre le piégeage de particules de bas poids moléculaire sur une colonne Sephadex G50 constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (ici de 20 à 50 $\mu$ m). Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et sont piégées. A l'inverse, les grosses vont passer autour et vont être éluées très rapidement. La réaction de séquence est purifiée par chromatographie pour piéger les ddNTPs libres, en excès. En effet ces ddNTPs libres non incorporés lors de la réaction pourraient parasiter les signaux de fluorescence spécifiques. Les sels éventuellement présents

sont piégés de la même manière que les ddNTPs. La limite d'exclusion de la résine G50 est d'environ 20 bases.

## **ii. Méthodes**

**Préparation des colonnes :** La purification se fait sur colonnes de résine Sephadex® G50 dans les plaques MultiScreen : la résine sèche Sephadex® G-50 est chargée dans les puits d'une plaque MultiScreen HV, format HTS en utilisant le chargeur de colonne comme suit : La résine de Sephadex a été déposée dans chaque puits du chargeur de colonne, l'excès de résine est retiré avec la raclette. Par la suite, la plaque MultiScreen HV a été placée à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et l'ensemble a été retourné. L'évacuation de la résine vers la plaque se fait par tapage sur le chargeur. Un volume de 300 µl d'eau ultra pure a été ajouté dans chaque puits contenant de la résine, la plaque a été fermée avec son couvercle et incubée pendant 1h30 à température ambiante. Une fois les mini-colonnes sont gonflées dans la plaque MultiScreen, elles peuvent être utilisées immédiatement ou stockées à 4 °C jusqu'à 24h.

**Purification d'ADN par gel-filtration sur colonne de Sephadex® G50 :** La plaque MultiScreen HV a été placée sur une plaque de micro-titration au format standard 96 puits, l'ensemble a été centrifugé pendant 5 minutes à 2500 rpm pour éliminer l'eau et compacter les mini-colonnes. La plaque MultiScreen HV a été par la suite placée sur une plaque de polypropylène au format standard 96. Les produits de la réaction de séquence auxquels un volume de 15µl d'eau a été ajouté, sont déposés délicatement au centre des mini-colonnes, l'ensemble a été centrifugé pendant 5 min 2500 rpm. Les filtrats contiennent les produits purifiés dans l'eau.

## **F. Détermination de la séquence**

Au cours d'une électrophorèse capillaire, les échantillons vont migrer selon leurs tailles, ils passent devant une cellule de détection émettant un faisceau laser vers la fin des capillaires. Ce passage provoque la libération des photons qui se traduit par la fluorescence des fluorophores fixés au dNTPs. Cette fluorescence se transforme en données informatiques à l'aide d'une cellule photoélectrique, qui à l'aide d'un logiciel (Sequencing analysis version 5.4) vont se présenter sous- forme d'électrophérogramme.

## **G. Analyse bio-informatique**

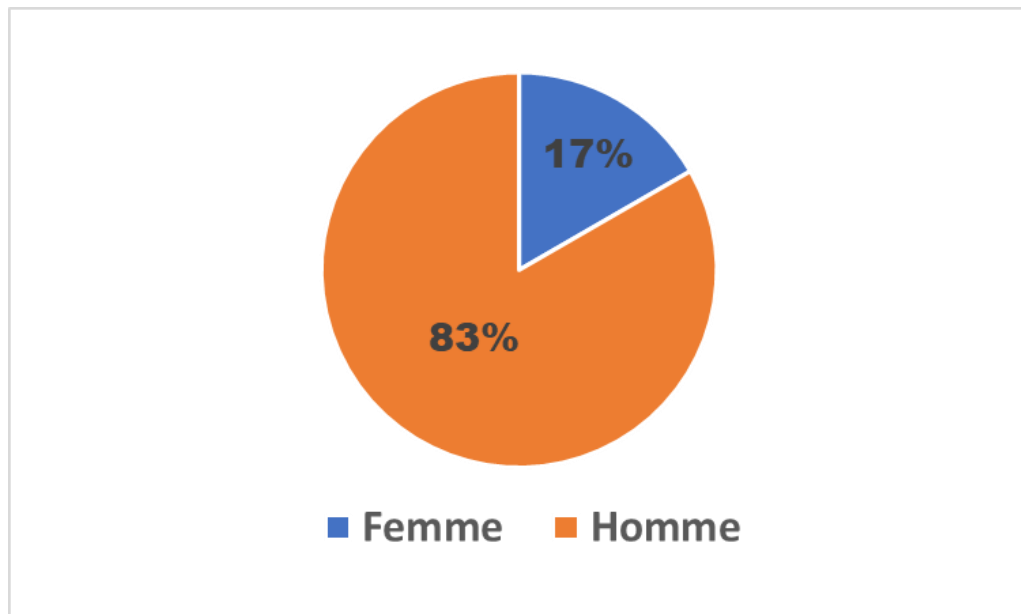
Les séquences obtenues sous forme FASTA sont alignés au niveau de la base de données NCBI (National Center for Biotechnology Information) à l'aide du logiciel BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) qui aide à déterminer le ou les acides aminés modifiés et leur position à travers l'identification des régions similaires avec la séquence de référence.



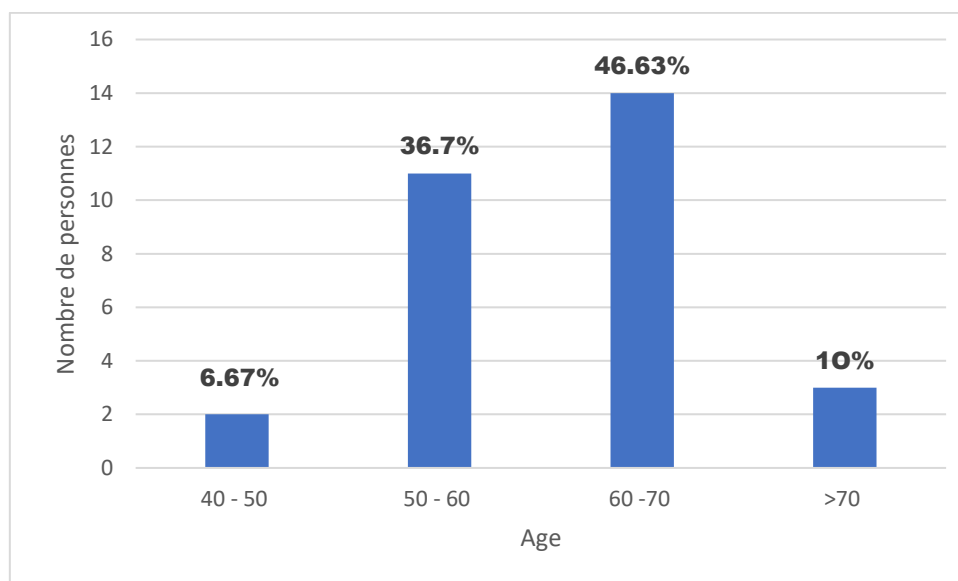
## II. RESULTATS

### 1. Description de la population d'étude

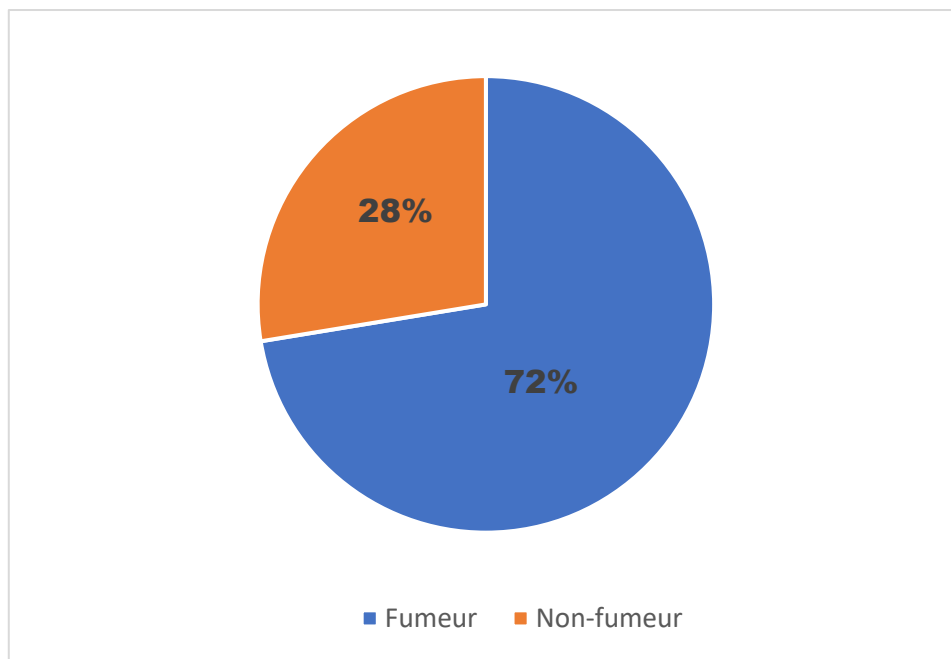
Grace au dossier médical des patients, nous avons pu les répartir selon le sexe, l'âge et le statut tabagique. Notre population comporte 83% d'hommes et 17% de femmes, le sexe ration étant de 5 : 00 (**Figure 22**), leur âge se répartit entre 40 et 78 ans (**Figure 23**). Toutes les femmes sont non fumeuses alors que 84% d'hommes sont des fumeurs (**Figure 24**). Ainsi 72% de l'ensemble des patients d'étude sont tabagiques qualifie le tabac comme facteur de risque du CP.



*Figure 22 : Répartition des patients selon le sexe.*



*Figure 23 : Répartition des patients selon l'âge.*

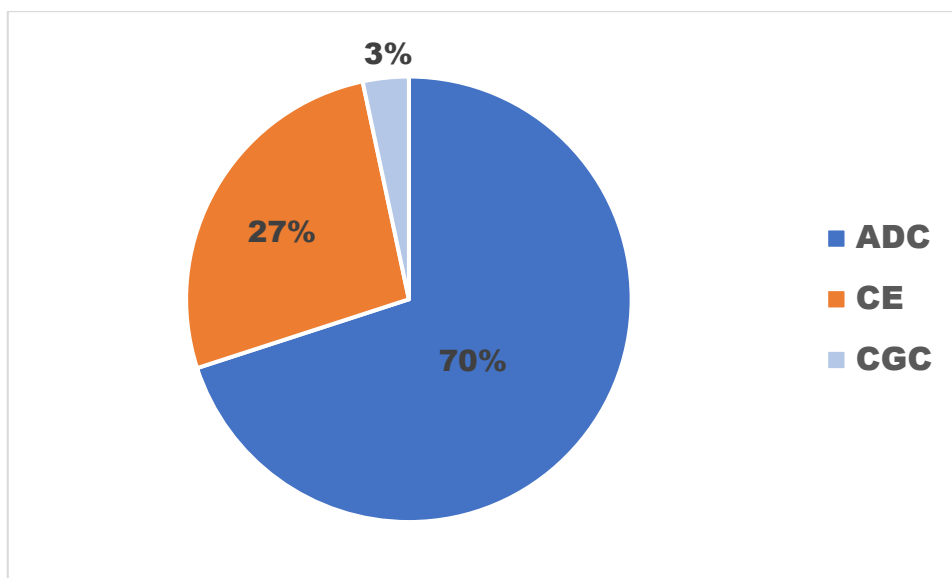


*Figure 24 : Répartition des patients selon le tabagisme.*

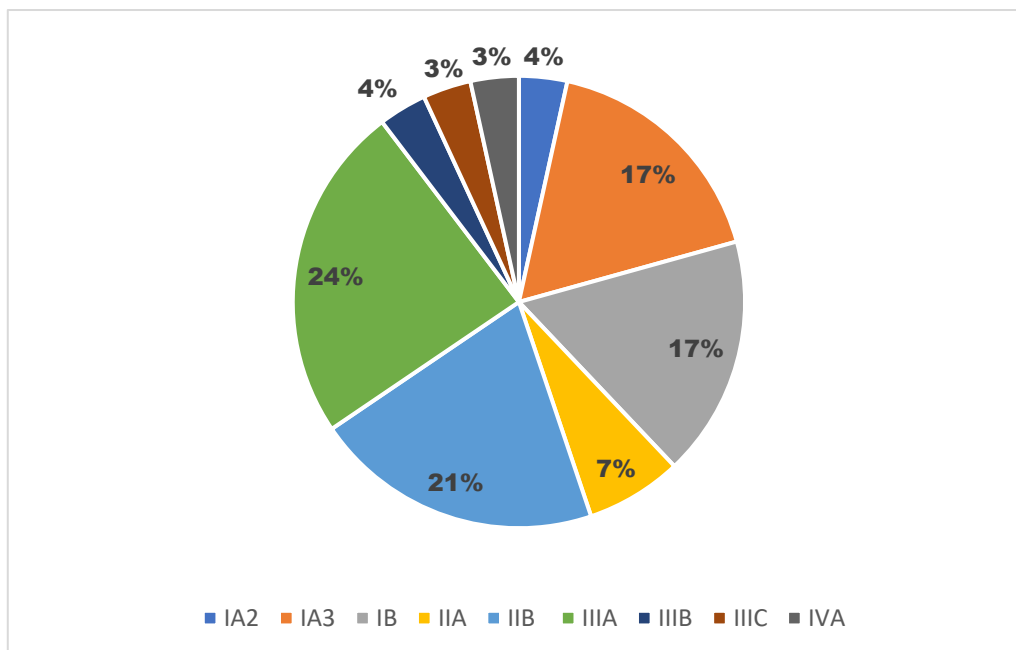
## 2. Résultats anatomopathologiques

Les résultats anatomopathologiques ont montré que 70% des patients ont un ADC, alors que 27% ont un CE. Le type histologique CGC ne représente que 3% (**Figure 25**).

L'évaluation du stade des tumeurs selon la classification TNM a montré les résultats présentés dans la **figure 26**.



*Figure 25 : Répartition des patients selon le type histologique.*



*Figure 26 : Distribution des patients selon le stade tumoral.*

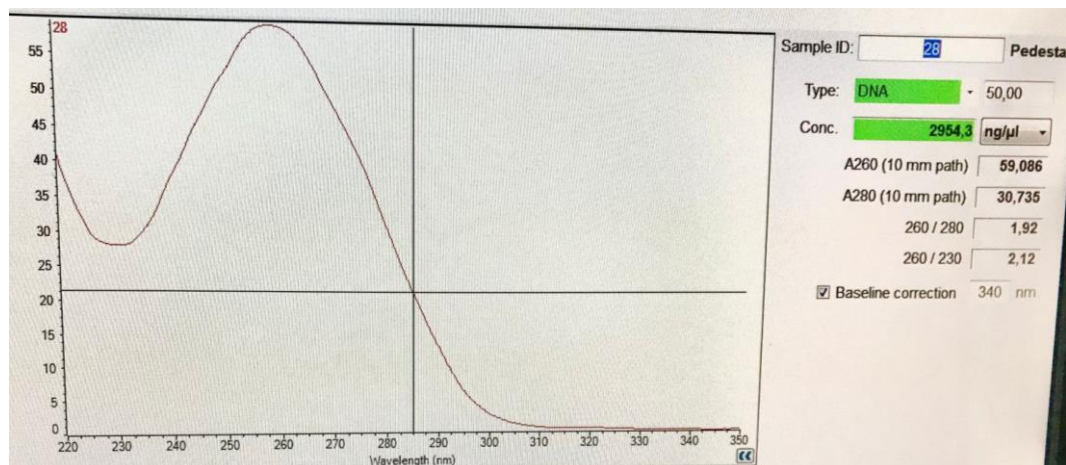
### 3. Dosage d'extrait d'ADN

Le dosage des extraits d'ADN a donné des concentrations qui varient de 563.1 à 4202.4. Les extraits sont parfaits pour la réalisation de la PCR.

*Tableau XI : Exemples de résultats du dosage de l'ADN par Nano Drop.*

ID	Concentration d'ADN (en ng/μl)	Rapport 260/280	Rapport 260/230
1	1707	1.87	2.2
2	563.1	1.85	2.14
3	3389.8	1.88	2.18
4	3084.8	1.91	2.13
6	3704.2	1.97	1.41
7	1447	1.95	2
8	2290.4	1.87	2.2
9	4308	1.96	1.97
10	4202.2	1.87	1.83
11	4202.4	1.93	2

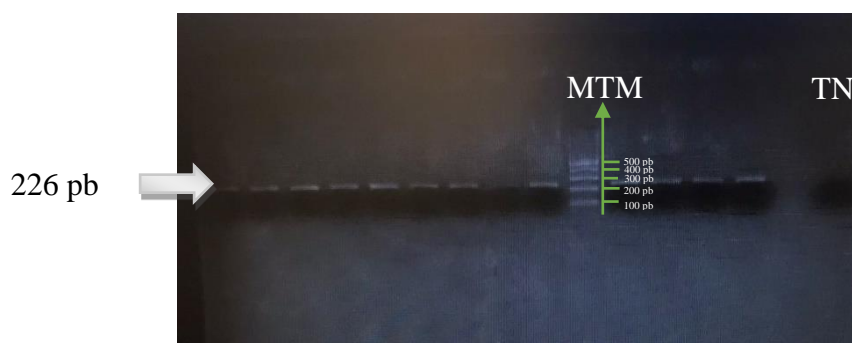
Un exemple du résultat du dosage par le « NanoDrop » est présenté dans la figure suivante :



*Figure 27 : Exemple de résultat de dosage d'un ADN extrait.*

#### **4. Résultat du test de qualité d'ADN par PCR du GAPDH**

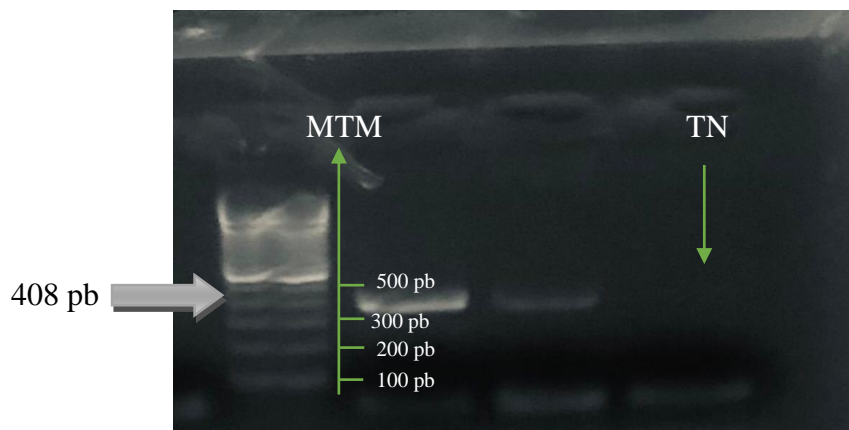
Dans l'ADN de toutes les biopsies incluses dans cette étude des bandes de 226 pb sont révélés par électrophorèse pour les produits PCR de GAPDH. Cela valide la qualité de notre ADN extrait et son intégrité pour les manipulations en aval. Un exemple des résultats de l'électrophorèse de la PCR-GAPDH est présenté dans la **figure 28**.



*Figure 28 : Exemple d'électrophorèse des produits PCR GAPDH (MTM : marqueur de taille moléculaire, TN : témoin négatif).*

#### **5. Résultats du statut mutationnel des gènes EGFR, HER2 et BRAF**

L'amplification de l'ADN des 30 échantillons pour les trois gènes de notre étude est révélé par électrophorèse et visualisé sous UV. Nos produits PCR sont de bonne qualité, un exemple des résultats d'électrophorèse est montré dans la **figure 29** :



**Figure 29** : Exemple de résultat d'électrophorèse des produits PCR de l'exon 20 du gène *EGFR* (MTM : marqueur de taille moléculaire, TN : témoin négatif).

La lecture des résultats de séquençage par le logiciel *Sequencing Analysis version 5.4* permet la visualisation des pics d'électrophérogramme et l'obtention de la forme FASTA de chaque séquence nucléotide. La forme FASTA est utilisée pour l'alignement de nos séquences nucléotidiques avec la séquence de référence (Human RefSeq-gene) au niveau du BLAST sur la base de données NCBI.

Le **tableau XII** représente l'ensemble des résultats des mutations recherchées.

**Tableau XII** : Résultats des mutations cherchées dans le cadre de notre étude.

Gènes	Exons	Mutations recherchées	Pourcentage
<b><i>EGFR</i></b>	Exon 18	E709X, G719X, V689M	0%
	Exon 19	E746-A750	3.33%
	Exon 20	T790M, D770_N771	0%
	Exon 21	L858R	0%
<b><i>HER2</i></b>	Exon 20	A775_G776	0%
<b><i>BRAF</i></b>	Exon 15	V600E	0%

Les résultats du séquençage ont révélé la présence d'une seule mutation chez une patiente au niveau de l'exon 19 du gène *EGFR*, il s'agit de la délétion E746\_A750 (**Figure 30 et 31**). Les autres exons du même gène ainsi que l'exon 20 du gène *HER2* et l'exon 15 du gène *BRAF* ne sont pas mutés chez nos patients.

```

CDS: Putative 1      1                               G L W I
Query               73  CCATCTCACAATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCC 132
                   |||
Sbjct               160644 CCATCTCACAATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCC 160703
CDS:epidermal growth 729  ~~~~~ G L W I

CDS: Putative 1      5  P E G E K V K I P V A I K T S
Query               133  CAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCTCGTATCAAG-----ACATGTC 177
                   |||
Sbjct               160704  CAGAAGGTGAGAAAGTTAAAATTCCTCGTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATGTC 160763
CDS:epidermal growth 733  P E G E K V K I P V A I K E L R E A T S

CDS: Putative 1      20  P K A N K E I L D
Query               178  CAAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGTCCATGG 237
                   |||
Sbjct               160764  CGAAAGCCAACAAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGTCCATGG 160823
CDS:epidermal growth 753  P K A N K E I L D ~~~~~

```

**Figure 30 :** Aspect de la mutation E746\_A750 de l'exon 19 du gène EGFR sur le BLAST.

```

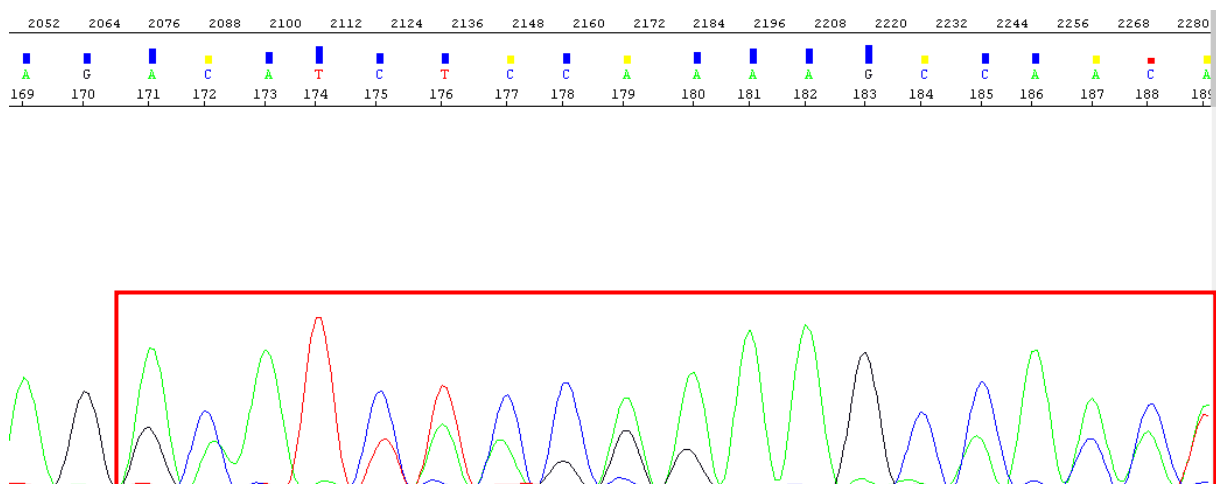
CDS: Putative 1      1                               G L W I P E G
Query               85  AATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTG 144
                   |||
Sbjct               160653  AATTGCCAGTTAACGTCTTCCTTCTCTCTGTCATAGGGACTCTGGATCCCAGAAGGTG 160712
CDS:epidermal growth 729  ~~~~~ G L W I P E G

CDS: Putative 1      8  E K V K I P V A I K L R E A T S P K A
Query               145  AGAAAGTTAAAATTCCTCGTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCA 204
                   |||
Sbjct               160713  AGAAAGTTAAAATTCCTCGTATCAAGGAATTAAGAGAAGCAACATCTCCGAAAGCCA 160772
CDS:epidermal growth 736  E K V K I P V A I K L R E A T S P K A

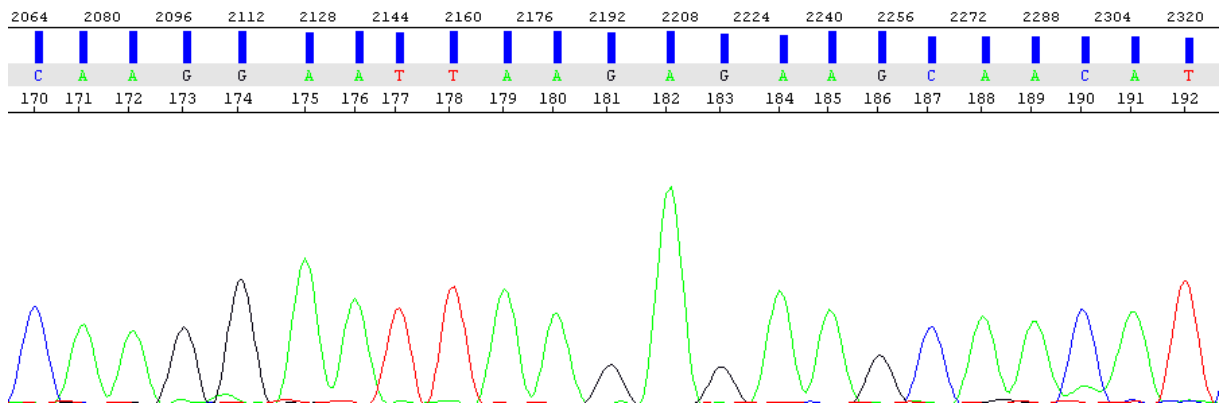
CDS: Putative 1      28  N K E I L D
Query               205  ACAAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGTCCATGGCTCTGAACC 264
                   |||
Sbjct               160773  ACAAGGAAATCCTCGATGTGAGTTTCTGCTTTGCTGTGTGGGGTCCATGGCTCTGAACC 160832
CDS:epidermal growth 756  N K E I L D ~~~~~

```

**Figure 31 :** Aspect de l'exon 19 du gène EGFR sur le BLAST.



**Figure 32 :** Aspect de la mutation E746\_A750 de l'exon 19 du gène EGFR au niveau de l'électrophérogramme.



**Figure 33 :** Aspect de l'exon 19 du gène *EGFR* sauvage au niveau de l'électrophérogramme.

Les figures 30 et 31 représentent l'aspect de la mutation E746\_A750 de l'exon 19 du gène *EGFR*. Sur le BLAST la mutation est caractérisée par la délétion de 15 nucléotides et de 5 acides aminés, chose qui n'est pas observés chez le type sauvage (Figure 31).

Au niveau d'électrophorégramme la mutation se caractérise par la superposition de deux pics (Figure 32) ; un pic représente le nucléotide sauvage, l'autre s'agit du nucléotide sauvage après la délétion on parle donc d'une mutation hétérozygote.

### III. DISCUSSION

A travers le monde, le CP est le plus fréquent en termes d'incidence et de mortalité [46]. Sa prise en charge est un processus complexe. La chirurgie, la chimiothérapie associée ou non à la radiothérapie constituent les différentes modalités du traitement du CP, cependant leur impact thérapeutique sur la survie des patients est modeste et le pronostic demeure obscure.

En effet, la connaissance des bases moléculaires de la carcinogénèse a contribué au développement de la thérapie ciblée majoritairement par les ITK chez les patients présentant des mutations oncogéniques spécifiques [47]. C'est dans ce contexte que notre étude a porté sur les altérations moléculaires en l'occurrence les mutations affectant l'EGFR, le BRAF et l'HER2.

Notre population d'étude est caractérisée par une prédominance masculine associée au tabagisme chez 70% des patients ce qui confirme l'implication de ce facteur dans le développement du CP.

La classe majoritaire de nos patients présente un ADC (70%), suivi par le CE (27%) puis le CGC (3%), cette répartition est similaire à celle décrite dans plusieurs études qui montrent que le type histologique prédominant dans le monde est l'ADC [48].

La découverte des mutations activatrices de l'EGFR permis de mettre en évidence un groupe spécifique de patients, qui peuvent être éligibles aux thérapies ciblées anti-EGFR. La majorité de ces mutations sont identifiés dans les exons 18 à 21. Dans notre étude, nous n'avons pas détecté de mutations dans les exons 18, 20 et 21 alors qu'au niveau de l'exon 19, une mutation a été détectée chez seulement une femme non fumeuse, âgé de 62 ans et présentant le type histologique ADC, il s'agit de la mutation la plus fréquente de cet exon : la délétion E746\_A750.

Plusieurs études ont reporté que dans le CP, les mutations de l'*EGFR* sont plus communes chez les patients atteints du type histologique ADC, chez les femmes et les non-fumeurs [49]. Le statut mutationnel de l'EGFR a montré une pertinence clinique pour la prise de décision thérapeutique des patients avec CP. Cependant, la fréquence des mutations *EGFR* dépend de l'origine ethnique ; le taux le plus élevé est enregistré chez la population asiatique (49%) alors que chez les patients Africano-Américains, cette fréquence est comprise entre 2 et 14% Au Maroc, leurs fréquences différentes d'une étude à une autre (vers les 20%) [51, 52].

Au Maroc, la thérapie ciblée par les ITK n'est accessible que pour très peu de patients présentant un CBNPC. A ce jour, il n'y a aucune publication à l'échelle nationale qui décrit le résultat de



ce traitement et la survie médiane des patients. Par contre à l'échelle mondiale, l'utilisation des ITK a montré une efficacité thérapeutique et une survie considérable chez des patients après administration de ces molécules pendant une période bien définie. La survie médiane des patients dépendait de la localisation de la mutation et le type histologique [51], les patients avec la délétion au niveau de l'exon 19 traités avec les ITK ont une survie médiane de 38 mois alors que pour les autres mutations dans les autres exons elle est de 17 mois [52].

L'HER2 est un oncogène appartenant à la famille de l'EGFR. Les mutations de l'HER2 ont été identifiées dans approximativement 2 à 3% des CBNPC, principalement sur l'exon 20 et semblent jouer un rôle essentiel dans la carcinogenèse bronchique. Dans cette cohorte aucun des patients ne portait une mutation au niveau de l'exon 20 de ce gène.

Les études ont montré que généralement les patients qui présentent des mutations de l'HER2 sont des patients ayant un ADC avec un état avancé ou métastatique, non-fumeurs et de sexe féminin [53]. Il s'agit dans la plupart des cas d'une insertion au niveau du codon 775 [A775-G776] de l'exon 20. Les mutations HER2 aient tendance à s'exclure mutuellement des autres facteurs oncogènes [54].

Par ailleurs, des études antérieures ont révélé que la survie globale médiane des patients ayant reçu une thérapie ciblée anti-HER2 était de 2.09 ans, contre 1.37 ans pour les patients ayant reçu un traitement non ciblé. En comparaison, la survie des patients avec HER2 de type sauvage était de 2.62 ans. Cela confirme que la mutation dans ce gène provoque une diminution de la survie globale des patients. De part ces résultats, il est devenu essentielles de cibler l'HER2 comme étant un gène impliqué dans les thérapies ciblées et ayant un potentiel d'amélioration de la survie des patients au sein des populations de tumeurs bronchiques [55].

Des mutations activatrices de BRAF ont été rapportées dans 2 à 3% des CBNPC, uniquement dans le sous-type ADC et préférentiellement chez les fumeurs. Bien que peu fréquentes, les mutations BRAF représentent une cible potentielle valable, car de nombreux inhibiteurs de la kinase RAF sont disponibles. Contrairement au CBNPC, La mutation BRAF V600E est plus fréquente dans les mélanomes (70%) dans le cancer ovarien (30%), thyroïdien (30-50%) et colorectal (10-15%) [56]. Nos patients ne présentaient pas de mutation au niveau de l'exon 15 du gène BRAF.

Plusieurs études ont montré que les patients avec le gène BRAF muté possèdent d'autres mutations dans d'autres gènes, il s'agit souvent du KRAS, EGFR et TP53. Ils sont souvent des fumeurs présentant généralement un stade avancé de la maladie. La mutation V600E est très étudiée puisque les réponses thérapeutiques ont été largement confinée à ce sous-type [57].

Les mutations BRAF peuvent affaiblir l'efficacité des ITK-EGFR, une co-inhibition de BRAF avec l'EGFR peut donc offrir des avantages cliniques pour ces patients [58].

L'identification de la mutation conductrice BRAF a incité l'utilisation d'une thérapie ciblée, qui a conduit à une réponse objective majeure et à une amélioration symptomatique substantielle. Une résistance acquise a été observée chez plusieurs patients. La caractérisation des changements moléculaires dans les tumeurs progressives initialement sensibles à la thérapie ciblée peut indiquer d'autres opportunités thérapeutiques et peut identifier des approches pour prévenir l'émergence de la résistance aux médicaments [59].

Globalement, Les mutations oncogéniques dans l'EGFR ont été recherchées chez les patients marocains avec CP, par contre et à notre connaissance c'est la première étude menée ayant pour objectif l'établissement du profilage moléculaire des gènes HER2 et BRAF dans le CP.

# *Conclusion et perspectives*

## CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Le cancer bronchique primitif est un fléau mondial, il constitue la première cause de mortalité par cancer dans le monde, il prédomine chez l'homme adulte fumeur, son diagnostic est souvent tardif, ce qui explique en partie son mauvais pronostic en dépit des avancées thérapeutiques.

Cette étude s'inscrit dans le cadre d'un projet visant à fournir aux cliniciens des outils de diagnostic précoce, ainsi qu'une démarche thérapeutique personnalisée, en se basant sur un biomarqueur non invasif et une signature moléculaire bien déterminée.

Globalement, l'étude du statut mutationnel réalisée sur 30 patients marocains atteints de CBNPC a décelé une seule mutation dans l'exon 19 du gène EGFR. Aucune mutation n'a été retrouvée dans les gènes BRAF et HER2. Cependant il est difficile, à ce stade, de tirer des conclusions quant à la fréquence de ces mutations chez les patients avec CP. De ce fait, il serait judicieux de :

- Elargir la population d'étude (en cours) ;
- Réaliser une étude multicentrique portant sur les gènes EGFR, HER2 et BRAF couvrant l'ensemble du territoire national afin d'établir le profilage moléculaire des patients marocains avec CP
- Décrire les types de mutations/polymorphismes dans les différents gènes impliqués dans les différentes voies de signalisation ;
- Collecter des données sur la survie des patients à trois et à cinq ans ;
- Evaluer la corrélation des mutations avec la réponse aux traitements et la survie des patients ;
- Procéder au screening des mutations, des génotypes et/ou des haplotypes qui peuvent être utilisés comme biomarqueurs de la survenue, la classification histologique et le grade, le pronostic et le développement de thérapies ciblées de ce cancer au Maroc.

*Références  
bibliographiques*

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Bessaguet F, Desmoulière A. Les poumons. *Actualités Pharmaceutiques* 2021;60:55–9. <https://doi.org/10.1016/j.actpha.2020.12.017>.
- [2] Khan YS, Lynch DT. *Histology, Lung*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- [3] Brandt JP, Mandiga P. *Histology, Alveolar Cells*. StatPearls, Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
- [4] Poumon - Wikiwand n.d. <https://www.wikiwand.com/fr/Poumon> (accessed May 9, 2022).
- [5] Durrant DE, Morrison DK. Targeting the Raf kinases in human cancer: the Raf dimer dilemma. *Br J Cancer* 2018;118:3–8. <https://doi.org/10.1038/bjc.2017.399>.
- [6] Cancer n.d. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer> (accessed May 10, 2022).
- [7] Cancer Today n.d. [https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode\\_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population\\_group=0&ages\\_group%5B%5D=0&ages\\_group%5B%5D=17&nb\\_items=7&group\\_cancer=1&include\\_nmssc=1&include\\_nmssc\\_other=1&half\\_pie=0&donut=0](https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&populations=900&key=total&sex=0&cancer=39&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=7&group_cancer=1&include_nmssc=1&include_nmssc_other=1&half_pie=0&donut=0) (accessed May 9, 2022).
- [8] Facteurs de risque du cancer du poumon | Société canadienne du cancer n.d. <https://cancer.ca/fr/cancer-information/cancer-types/lung/risks?region> (accessed July 27, 2022).
- [9] Warren GW, Cummings KM. Tobacco and Lung Cancer: Risks, Trends, and Outcomes in Patients with Cancer. *American Society of Clinical Oncology Educational Book* 2013:359–64. [https://doi.org/10.14694/EdBook\\_AM.2013.33.359](https://doi.org/10.14694/EdBook_AM.2013.33.359).
- [10] Huang Z, Sun S, Lee M, Maslov AY, Shi M, Waldman S, et al. Single-cell analysis of somatic mutations in human bronchial epithelial cells in relation to aging and smoking. *Nat Genet* 2022;54:492–8. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01035-w>.
- [11] Lung Cancer Risk Factors | Smoking & Lung Cancer n.d. <https://www.cancer.org/cancer/lung-cancer/causes-risks-prevention/risk-factors.html> (accessed May 16, 2022).
- [12] Lissowska J, Foretova L, Dąbek J, Zaridze D, Szeszenia-Dabrowska N, Rudnai P, et al. Family history and lung cancer risk: international multicentre case–control study in Eastern and Central Europe and meta-analyses. *Cancer Causes Control* 2010;21:1091–104. <https://doi.org/10.1007/s10552-010-9537-2>.
- [13] Al-Wadei HAN, Schuller HM.  $\beta$ -Carotene promotes the development of NNK-induced small airway-derived lung adenocarcinoma. *European Journal of Cancer* 2009;45:1257–64. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2008.10.035>.
- [14] Barlesi F, Tomasini P, Fournier C, Greillier L. Présentation clinique et diagnostic du cancer bronchique. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* 2014;6:341–5. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(14\)70587-7](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(14)70587-7).
- [15] Girard P, Caliendo R, Stern J-B, Natali D, Lenoir S, Validire P, et al. Démarche diagnostique dans le cancer bronchique : diagnostic positif et bilan d’extension. *Revue Des Maladies Respiratoires Actualités* 2013;5:410–8. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(13\)70434-8](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(13)70434-8).
- [16] Zappa C, Mousa SA. Non-small cell lung cancer: current treatment and future advances. *Transl Lung Cancer Res* 2016;5:288–300. <https://doi.org/10.21037/tlcr.2016.06.07>.
- [17] Akhurst T. Staging of Non–Small-Cell Lung Cancer. *PET Clinics* 2018;13:1–10. <https://doi.org/10.1016/j.cpet.2017.09.004>.

- [18] Rodriguez-Canales J, Parra-Cuentas E, Wistuba II. Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. In: Reckamp KL, editor. Lung Cancer, vol. 170, Cham: Springer International Publishing; 2016, p. 25–46. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-319-40389-2_2).
- [19] Cancer du poumon (adénocarcinome) | Deuxième Avis n.d. <https://www.deuxiemeavis.fr/pathologie/cancer-du-poumon-adenocarcinome> (accessed May 23, 2022).
- [20] Antoine M, Moroch J, Kebir F, Georges M, Ruppert A-M, Wislez M, et al. Classification histomoléculaire des cancers pulmonaires. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* 2018;10:236–47. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(18\)30016-8](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(18)30016-8).
- [21] van Meerbeeck JP, Fennell DA, De Ruyscher DK. Small-cell lung cancer. *The Lancet* 2011;378:1741–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(11\)60165-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(11)60165-7).
- [22] Christofyllakis K, Monteiro AR, Cetin O, Kos IA, Greystoke A, Luciani A. Biomarker guided treatment in oncogene-driven advanced non-small cell lung cancer in older adults: A Young International Society of Geriatric Oncology Report. *Journal of Geriatric Oncology* 2022:S1879406822001059. <https://doi.org/10.1016/j.jgo.2022.04.013>.
- [23] Terrell EM, Durrant DE, Ritt DA, Sealover NE, Sheffels E, Spencer-Smith R, et al. Distinct Binding Preferences between Ras and Raf Family Members and the Impact on Oncogenic Ras Signaling. *Molecular Cell* 2019;76:872-884.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.09.004>.
- [24] Finn SP, Addeo A, Dafni U, Thunnissen E, Bubendorf L, Madsen LB, et al. Prognostic Impact of KRAS G12C Mutation in Patients With NSCLC: Results From the European Thoracic Oncology Platform Lungscape Project. *Journal of Thoracic Oncology* 2021;16:990–1002. <https://doi.org/10.1016/j.jtho.2021.02.016>.
- [25] Ruppert A-M, Beau-Faller M, Debievre D, Ouafik L, Westeel V, Rouquette I, et al. Outcomes of Patients With Advanced NSCLC From the Intergroupe Francophone de Cancérologie Thoracique Biomarkers France Study by KRAS Mutation Subtypes. *JTO Clinical and Research Reports* 2020;1:100052. <https://doi.org/10.1016/j.jtocrr.2020.100052>.
- [26] Park S, Kim TM, Cho S-Y, Kim S, Oh Y, Kim M, et al. Combined blockade of polo-like kinase and pan-RAF is effective against NRAS-mutant non-small cell lung cancer cells. *Cancer Letters* 2020;495:135–44. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2020.09.018>.
- [27] Karachaliou N, Santarpia M, Gonzalez Cao M, Teixido C, Sosa AE, Berenguer J, et al. Anaplastic lymphoma kinase inhibitors in phase I and phase II clinical trials for non-small cell lung cancer. *Expert Opinion on Investigational Drugs* 2017;26:713–22. <https://doi.org/10.1080/13543784.2017.1324572>.
- [28] Chaft JE, Arcila ME, Paik PK, Lau C, Riely GJ, Pietanza MC, et al. Coexistence of *PIK3CA* and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma—Rationale for Comprehensive Mutation Profiling. *Molecular Cancer Therapeutics* 2012;11:485–91. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-11-0692>.
- [29] Sawa K, Koh Y, Kawaguchi T, Kambayashi S, Asai K, Mitsuoka S, et al. *PIK3CA* mutation as a distinctive genetic feature of non-small cell lung cancer with chronic obstructive pulmonary disease: A comprehensive mutational analysis from a multi-institutional cohort. *Lung Cancer* 2017;112:96–101. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2017.07.039>.
- [30] Azelby CM, Sakamoto MR, Bowles DW. ROS1 Targeted Therapies: Current Status. *Curr Oncol Rep* 2021;23:94. <https://doi.org/10.1007/s11912-021-01078-y>.
- [31] Ferreira D, Miranda J, Martins-Lopes P, Adegá F, Chaves R. Future Perspectives in Detecting EGFR and ALK Gene Alterations in Liquid Biopsies of Patients with NSCLC. *IJMS* 2021;22:3815. <https://doi.org/10.3390/ijms22083815>.

- [32] Minnelli C, Laudadio E, Mobbili G, Galeazzi R. Conformational Insight on WT- and Mutated-EGFR Receptor Activation and Inhibition by Epigallocatechin-3-Gallate: Over a Rational Basis for the Design of Selective Non-Small-Cell Lung Anticancer Agents. *IJMS* 2020;21:1721. <https://doi.org/10.3390/ijms21051721>.
- [33] Eitsuka T, Tatewaki N, Nishida H, Nakagawa K, Miyazawa T. Synergistic Anticancer Effect of Tocotrienol Combined with Chemotherapeutic Agents or Dietary Components: A Review. *IJMS* 2016;17:1605. <https://doi.org/10.3390/ijms17101605>.
- [34] Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 2007;26:3291–310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210422>.
- [35] Lai SY, Johnson FM. Defining the role of the JAK-STAT pathway in head and neck and thoracic malignancies: Implications for future therapeutic approaches. *Drug Resistance Updates* 2010;13:67–78. <https://doi.org/10.1016/j.drug.2010.04.001>.
- [36] Pirker R, Herth FJF, Kerr KM, Filipits M, Taron M, Gandara D, et al. Consensus for EGFR Mutation Testing in Non-small Cell Lung Cancer: Results from a European Workshop. *Journal of Thoracic Oncology* 2010;5:1706–13. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f1c8de>.
- [37] Zeng J, Ma W, Young RB, Li T. Targeting HER2 genomic alterations in non-small cell lung cancer. *Journal of the National Cancer Center* 2021;1:58–73. <https://doi.org/10.1016/j.jncc.2021.04.001>.
- [38] ERBB2 (17q12) Red - Biocare Medical n.d. <https://biocare.net/product/erbb2-17q12-red/> (accessed July 16, 2022).
- [39] Hudis CA. Trastuzumab — Mechanism of Action and Use in Clinical Practice. *N Engl J Med* 2007;357:39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>.
- [40] Riudavets M, Sullivan I, Abdayem P, Planchard D. Targeting HER2 in non-small-cell lung cancer (NSCLC): a glimpse of hope? An updated review on therapeutic strategies in NSCLC harbouring HER2 alterations. *ESMO Open* 2021;6:100260. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2021.100260>.
- [41] Kumaki Y, Olsen S, Suenaga M, Nakagawa T, Uetake H, Ikeda S. Comprehensive Genomic Profiling of Circulating Cell-Free DNA Distinguishes Focal MET Amplification from Aneuploidy in Diverse Advanced Cancers. *Current Oncology* 2021;28:3717–28. <https://doi.org/10.3390/currenocol28050317>.
- [42] Aquilato A, Lopez V, Doonan B, Hsieh T-C, Pinto JT, Wu E, et al. BRAF Mutation in Melanoma and Dietary Polyphenols as Adjunctive Treatment Strategy. *Polyphenols in Human Health and Disease*, Elsevier; 2014, p. 1353–65. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-398456-2.00102-X>.
- [43] Nichols KE, Arceci RJ. BRAF, a piece of the LCH puzzle. *Blood* 2010;116:1825–7. <https://doi.org/10.1182/blood-2010-06-289934>.
- [44] Leonetti A, Facchinetti F, Rossi G, Minari R, Conti A, Friboulet L, et al. BRAF in non-small cell lung cancer (NSCLC): Pickaxing another brick in the wall. *Cancer Treatment Reviews* 2018;66:82–94. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.04.006>.
- [45] Kwon N, Lee KE, Singh M, Kang SG. Suitable primers for GAPDH reference gene amplification in quantitative RT-PCR analysis of human gene expression. *Gene Reports* 2021;24:101272. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2021.101272>.
- [46] Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* 2018;68:394–424. <https://doi.org/10.3322/caac.21492>.



- [47] Huang L, Jiang S, Shi Y. Tyrosine kinase inhibitors for solid tumors in the past 20 years (2001–2020). *J Hematol Oncol* 2020;13:143. <https://doi.org/10.1186/s13045-020-00977-0>.
- [48] Dai J-J, Zhou W-B, Wang B. Identification of crucial genes associated with lung adenocarcinoma by bioinformatic analysis. *Medicine* 2020;99:e23052. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000023052>.
- [49] Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, et al. Clinical and Biological Features Associated With Epidermal Growth Factor Receptor Gene Mutations in Lung Cancers. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 2005;97:339–46. <https://doi.org/10.1093/jnci/dji055>.
- [50] Lemine Sow M, El Yacoubi H, Moukafih B, Balde S, Akimana G, Najem S, et al. Frequency and types of *EGFR* mutations in Moroccan patients with non–small cell lung cancer. *Tumori* 2021;107:335–40. <https://doi.org/10.1177/0300891620964571>.
- [51] Rennert G, Gottfried M, Rennert HS, Lejbkowitz F, Frank M, Cohen I, et al. Long term follow-up of EGFR mutated NSCLC cases. *Translational Oncology* 2021;14:100934. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2020.100934>.
- [52] Rosell R, Moran T, Queralt C, Porta R, Cardenal F, Camps C, et al. Screening for Epidermal Growth Factor Receptor Mutations in Lung Cancer. *N Engl J Med* 2009;361:958–67. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0904554>.
- [53] Mazières J, Milia J. Les mutations de HER2 dans les cancers bronchiques : caractéristiques et perspectives thérapeutiques. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités* 2012;4:657–61. [https://doi.org/10.1016/S1877-1203\(12\)70318-X](https://doi.org/10.1016/S1877-1203(12)70318-X).
- [54] Nagasaka M, Singh V, Baca Y, Sukari A, Kim C, Mamdani H, et al. The Effects of HER2 Alterations in EGFR Mutant Non-small Cell Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer* 2022;23:52–9. <https://doi.org/10.1016/j.clcc.2021.08.012>.
- [55] Pillai RN, Behera M, Berry LD, Rossi MR, Kris MG, Johnson BE, et al. *HER2* mutations in lung adenocarcinomas: A report from the Lung Cancer Mutation Consortium: *HER2* Mutations in Lung Adenocarcinomas. *Cancer* 2017;123:4099–105. <https://doi.org/10.1002/cncr.30869>.
- [56] Dhomen N, Marais R. New insight into BRAF mutations in cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 2007;17:31–9. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.12.005>.
- [57] Horn L, Bauml J, Forde PM, Davis KL, Myall NJ, Sasane M, et al. Real-world treatment patterns and survival of patients with BRAF V600-mutated metastatic non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2019;128:74–90. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2018.12.003>.
- [58] Brustugun OT, Khattak AM, Trømborg AK, Beigi M, Beiske K, Lund-Iversen M, et al. BRAF-mutations in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2014;84:36–8. <https://doi.org/10.1016/j.lungcan.2014.01.023>.
- [59] Rudin CM, Hong K, Streit M. Molecular Characterization of Acquired Resistance to the BRAF Inhibitor Dabrafenib in a Patient with BRAF-Mutant Non–Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 2013;8:e41–2. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e31828bb1b3>.