



République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur

et de la Recherche Scientifique

université du 08 mai 1945

Faculté de science de la Nature et de la Vie

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

Mémoire de Master 2

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité/Option : Biologie moléculaire et cellulaire

Etude cellulaire et moléculaire d'un tissu cancéreux

Présenté par:

- Abda Iness
- Haffaressas Ines Lidia

Devant le jury composé de :

Président :	Grara Noudjoud.	Pr.	Université de Guelma
Examineur :	Drif Fahima.	M.C.A	Université de Guelma
Encadreur :	Khallef Messaouda.	M.C.A.	Université de Guelma
Invité :	Yassi Fatiha.	Pr.	CHU Annaba
Invité :	Echaoui Nadia.	Pr.	CHU Annaba

Juillet 2021

Remerciements

Nous remercions tout d'abord DIEU le miséricordieux qui nous a éclairé la voie de la science et de la reconnaissance et par sa grâce on a réussi à achever ce travail.

Nous remercions les membres du jury qui nous feront le grand honneur d'évaluer notre travail.

Le professeur **GRARA N**, d'avoir bien accepté de présider ce jury.

Le professeur **DRIF F**, pour avoir exprimé son entière disponibilité à participer à ce jury et examiner ce mémoire.

En guise de reconnaissance, nous tenons à remercier Madame **KHALLEF M** maître de conférence A au département de Biologie à l'université du 08 mai 1945 de Guelma, notre enseignante et encadrante, pour sa gentillesse, sa patience, sa disponibilité, ses judicieux conseils qui ont contribué à alimenter notre réflexion et surtout ses qualités humaines, elle ne nous a pas privé de ses connaissances et ses expériences qu'elle a partagé avec nous, tout en nous accordant sa confiance et une large indépendance dans l'exécution des missions valorisantes. Son sens élevé du devoir, le fait d'être toujours montré à l'écoute ainsi que sa rigueur scientifique impose l'estime et le respect.

De simples remerciements sont insuffisants pour exprimer toute notre reconnaissance envers elle.

Nous remercions également tout le personnel du centre anti - cancer « CAC » du CHU IBN ROCHD Annaba, qui a contribué au succès de notre stage, en particulier :

Le professeur **YASSI F** médecin chef du service d'anapath qui nous a ouvert les portes des structures dont elle avait la responsabilité.

Le professeur **ECHAOUI N** maître de stage qui nous a suivis et permis d'accomplir notre stage dans de meilleures conditions.

Nous adressons également nos remerciements et notre gratitude à tous les professeurs pour leurs enseignements de qualité durant notre cursus académique.

Sans oublier de remercier nos chers parents pour leurs présences, leurs soutiens, leur aide financière et leurs encouragements sans limite.

Enfin nous souhaitons une bonne chance à tous nos camarades de promotion 2021

en master biologie moléculaire et cellulaire.



Dédicace

A mes Très Chers Parents

Tous les mots ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte. Quelle chance et quel honneur de vous avoir dans ma vie, et c'est grâce à votre sacrifice, vos encouragements et vos prières que j'ai pu réussir. Je vous dédie ce modeste travail en guise de reconnaissance et de remerciements.

A la mémoire de mon défunt **Papa « Lyamine Haffaressas »**, décédé d'un cancer en 2017, et de là l'idée m'est venue de travailler sur ce thème, et avec l'aide de dieu continuer dans la recherche sur le traitement du cancer et concrétiser mon rêve. Tu as toujours été pour moi un exemple du père respectueux et honnête, tu m'as inculqué les vraies valeurs de la vie, tu as fait de moi ce que je suis, je tiens à honorer l'homme que tu es. Grace à toi papa j'ai appris la discipline et la responsabilité. Ce modeste travail est le fruit de tous les sacrifices que tu as déployé pour mon éducation et ma formation, c'est vrai que tu n'es pas à mes côtés dans ces moments mais ton âme est toujours présente pour me dire je suis fier de toi ma fille « que Dieu le tout puissant t'accueille dans son vaste paradis » **(je t'aime)**.

A ma chère **maman « RAFIKA HADDADI »**, cette merveilleuse femme qui a œuvré pour ma réussite, de par son amour inconditionnel, son soutien, ses douaaas, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie et les longues nuits qu'elle a fait de bon cœur pour m'encourager et me surmonter le moral, pour m'avoir donné la force dans les moments difficiles d'éditer, elle m'a fait preuve d'une grande patience et d'une grande compréhension, malgré toutes les difficultés rencontrées toutes ces longues années d'études elle m'a toujours facilité ce parcours au prix de nombreux efforts. Santé, bonheur et longue vie pour que tu demeures le flambeau illuminant le chemin de tes enfants.

A ma sœur

Sarah : qui a fait de mon univers une merveille, à tous les moments passés avec toi, en gage de ma profonde estime pour notre amour, notre complicité et l'aide que tu m'as apporté. Tu m'as soutenu, réconforté et en surtout encouragé.

A mes frères

Mehdi, Housseem et Amir

Mes belles sœurs : Imene, Amira, Mouna et mes neveux : Yanis et Nail

Vous m'avez toujours aimé, aidé et ces quelques lignes sont insuffisantes pour vous exprimer mon profond amour et ma reconnaissance pour les honorables services soutenus, je suis très heureuse que vous soyez dans ma vie. Que cette thèse vous traduira ma profonde affection.

A ma grande famille

Mes oncles : Pr. Haddadi salim ,Haffaressas youssef et Lemnouar Abdeldjebbar

Mes tantes : Naima, Houda, Sonia

Cousins et cousines chacun par son prénom.

A vous tous, aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et vos encouragements.

Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez.

A mes amis

Nabil, Sara, Nouzha, Malek, Saoussen, Marwa, Keltoum, Mouad, Toufa, Kano, Zack, Kinane

Je ne peux trouver les mots justes et sincères pour vous exprimer mon affection. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail.

A mon binôme

Je remercie tout particulièrement ma partenaire de mémoire, mon binôme, mon amie Ines et sa famille, sans qui rien n'aurait été pareil, cette année fut riche en émotions et je tiens à te remercier pour ton soutien et ce lien tout particulier qui s'est créé entre nous durant toutes nos années d'étude

A mon encadrante Mme. Khallef Messaouda

JE tiens à vous remercier de m'avoir fait l'honneur de diriger mon mémoire de fin d'étude. Vous êtes le professeur qui a réussi à m'inspirer, à me donner confiance en moi et en l'avenir mais aussi qui a réussi à me donner l'envie d'apprendre.

J'espère pouvoir vous honorer par ce modeste travail.

Ines Lidia



Dédicace

Avant toute dédicace je tiens à remercier « Allah » le tout puissant qui m'a donné le courage pour mener ce travail à terme

C'est avec un grand plaisir et une immense fierté et joie que je dédie ce modeste travail :

A ma mère

A la plus altruiste, la plus forte et la plus merveilleuse des mamans, les mots manquent pour qualifier tout l'amour que je porte pour toi

Ton dévouement, tes encouragements ta confiance en moi, ta bénédiction et tes prières m'ont été d'un grand soutien pour mener à bien mes études

A mon père

Celui qui n'a jamais cessé de combattre pour me voir réussir un jour, merci de m'avoir offert un grand soutien tout au long de mes années d'études, tes discours de temps en temps étaient une source énorme d'encouragements pour moi, merci surtout d'avoir cru en moi et en mes rêves

Merci de m'avoir soutenue et aidée à surmonter tous les imprévus de la vie

A mes deux petits frères **Wassim** et **Sameur** et ma chère sœur **Sirine** je vous souhaite une bonne continuation dans vos études et beaucoup de succès.

A toute la famille Abda

A toute la famille Zalani

Précisément mes grands-parents, mes chères tantes **Fadia** et

Yamina

Mes chers oncles **Mohammed** et **Samir**

Je m'estime honorée d'être une nièce aussi gâtée et parce que je sais que si la vie me trompera un jour je serai entre de bonnes mains, Merci pour votre amour, votre confiance et vos encouragements

A tous les cousins et cousines : **Mohammed, Hassiba, Fatiha, Adem, Lina, Ania et La petite Rafife**

A ma partenaire **Lydia**, dans la vie il ya toujours des hauts et des bas, mais le plus important est de se relever et attendre l'objectif. Il y a eu beaucoup de fatigue, de difficultés et d'obstacles mais nous sommes quand même arrivées.

A ma Tante **Rafika Haddadi** Merci pour ton soutien et tes conseils de rédaction qui ont été très bénéfiques pour nous.

A tous mes amis qui m'ont toujours encouragée, et à qui je souhaite plus de succès : **Rayane, Nouzha, Malek, Hind ,Hinda**
,Yasmine, Anis , Mouaad et Amine

A tous mes collègues

Et à tous ceux que ma réussite leur tient à cœur

Iness

Résumé

La carcinogénèse est un phénomène qui entraîne des altérations génétiques et épigénétiques induisant des changements cellulaires et structuraux en influençant la communication et la signalisation cellulaire. Ces modifications génétiques et leurs accumulations agissent sur le dérèglement de : la différenciation, la division et de la mort cellulaire. La pratique comprend ses différentes techniques : La macroscopie qui est la description détaillée des lésions. L'histologie c'est l'étude microscopique des coupes de tissus colorées. L'immuno-histochimie consiste à localiser grâce à un anticorps spécifique les protéines dans les cellules dans le but : de rechercher le type histologique de la tumeur, sa nature (primitive ou secondaire), l'origine de la métastase et la recherche des facteurs de prolifération ainsi que les facteurs prédictifs de la réponse aux traitements. Enfin, la biologie moléculaire qui participe aux progrès des diagnostics et des traitements. Dans ce travail, l'étude cellulaire et moléculaire d'un adénocarcinome pulmonaire montre que la thérapie ciblée avec les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est destinée à des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules primitif et métastatique et qui ont des mutations au niveau des gènes de l'EGFR avec un dérèglement dans leurs voies de signalisation.

Mots clés : Adénocarcinome pulmonaire, Carcinogénèse, Cancer, Métastase, Tumeur.

Abstract

Carcinogenesis is a phenomenon that causes genetic and epigenetic alterations inducing cellular and structural changes by influencing communication and cell signaling. These genetic modifications and their accumulations act on the deregulation of: differentiation, division and cell death. The practice includes its different techniques: Macroscopy, which is the detailed description of the lesions. Histology is the study of stained tissue sections under a microscope. Immunohistochemistry consists of locating proteins in cells using a specific antibody in order to: find the histological type of the tumour, its nature (primary or secondary), the origin of the metastasis and the search for proliferation factors as well as predictive factors of response to treatment. Finally, molecular biology, which contributes to the progress of diagnostics and treatments. In this work, the cellular and molecular study of pulmonary adenocarcinoma shows that targeted therapy with epidermal growth factor receptor (EGFR) inhibitors is intended for patients with primary non-small cell lung cancer and metastatic and which have mutations in EGFR genes with a disruption in their signaling pathways.

Keywords: Lung adenocarcinoma, Carcinogenesis, Cancer, Metastasis, Tumour.

ملخص

التسرطن هو ظاهرة تسبب تغييرات وراثية وما فوق جينية التي تحفز التغييرات الخلوية والهيكلية و التي تؤثر على التحوار الخلوي و مسارات الإشارات، هذه التعديلات الجينية وتراكمها تعمل على تعطيل: التمايز والانقسام وموت الخلايا. يشمل الجانب التطبيقي تقنيات مختلفة: الفحص المجهرى وهو الوصف التفصيلي للتلغف. علم الأنسجة هي دراسة أقسام الأنسجة الملونة تحت المجهر. تمكن الكيمياء الهيستولوجية المناعية من تحديد موقع البروتينات في الخلايا باستخدام جسم مضاد مخصص من أجل: العثور على النوع النسيجي للورم وطبيعته (أولي أو ثانوي) وأصل الورم الخبيث والبحث عن عوامل التكاثر بالإضافة إلى العوامل التنبؤية للاستجابة للورم. وأخيراً علم الأحياء الجزيئي، الذي يساهم في تقدم التشخيص والعلاج. في هذا العمل ، تُظهر الدراسة الخلوية والجزيئية لسرطان الغدة الرئوية أن العلاج الموجه بمتبطات مستقبلات عامل نمو البشرة مخصص للمرضى المصابين بسرطان الرئة الأولي ذي الخلايا الغير صغيرة والذين لديهم طفرات في جينات هذه المتبطات مع اضطراب في مسارات الإشارات الخاصة بهم.

الكلمات المفتاحية: سرطان الغدة الرئوية ، التسرطن، سرطان ، ورم خبيث، الورم.

Liste des figures

Figure	Titre	Page
01	L'observation microscopique des cellules cancéreuses	06
02	La composition du microenvironnement stroma tumoral	07
03	Les étapes de la cancérogenèse	10
04	L'angiogenèse tumorale	11
05	La vue d'ensemble de la cascade métastatique	12
06	Les phases du cycle cellulaire	13
07	La différence entre l'apoptose et la nécrose	14
08	Les voies de réparation de l'ADN	19
09	La longueur des télomères est continuellement construite et raccourcie d'une manière régulée	20
10	La pièce opératoire après fixation avec le formol	27
11	Les outils utilisés pour le marquage	28
12	Le marquage de la pièce opératoire avec l'encre de chine	28
13	Les cassettes d'inclusion	29
14	L'automate de déshydratation de tissus	29
15	Les moules à inclusion	30
16	Le remplissage des moules par la paraffine liquide	30
17	Le refroidissement des moules	30
18	Le microtome	31
19	Le séchage des lames	31
20	La coloration manuelle des lames	32
21	Le montage des lames avec l'Eukitt	33
22	Ventana Ultra	34
23	Les kits de détection	35
24	Les kits de préparation d'échantillon d'ADN	38
25	Le ruban dans le tube de microcentrifugeuse	39
26	La mesure de la concentration d'ADN	43
27	La plaque de test cobas EGFR	46
28	L'adénocarcinome pulmonaire	48
29	Les alvéoles normales	49
30	L'adénocarcinome papillaire	49
31	Le marquage avec CK7	50
32	Le marquage avec TTF1	50
33	Le marquage avec la protéinase Napsine A	51

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
01	La préparation des réactifs	36
02	Les volumes des réactifs nécessaires pour les masters mix MMX-1, MMX-2 et MMX-3 v2 actifs	43
03	Le plan de plaque pour le test cobas EGFR	47
04	Les résultats obtenus après test EGFR	52

Liste des abréviations

AcM : Anti corps Monoclonale
ADN : Acide désoxyribonucléique
AgNOR : Région organisatrice nucléolaire argyrophile
AIF : Facteur induisant l'apoptose
ALK : La kinase du lymphome anaplasique
Am: Attomètre
ARN: Acide ribonucléique
ATP: Adénosine –Triphosphate
BRAF: Fibrosarcome à accélération rapide B
BrTA : Bromopyruvate
CAR-T : Cellules T de récepteur d'antigène chimérique
CK7: Cytokeratin 7
CK20: Cytokeratin 20
CMH : Complexe Majeur D'histocompatibilité
COX-2 : Cyclooxygénase-2
CPNPC: Cancer pulmonaire non à petite cellule
CT: Tube de prélèvement
CTC : Cellule tumorale circulante
DNA EB: ADN bromure d'éthidium
DNA PBB: ADN biphénylepolybromé
DNA TLB: Biopsie liquide thermique
ECM : Matrice extra cellulaire
EGF: Facteur de croissance épidermique
EGFR : Récepteur du facteur de croissance épidermique
Erb : Récepteur du facteur de croissance épidermique
FA : Anémie de Fanconi
FDA: Administration fédérale des médicaments
FFPE: Paraffine fixée au formol-Embedded
FGF: Facteur de croissance des fibroblastes
FISH: L'hybridation in situ en fluorescence
FT: Tube de filtration
GDP: Guanosine diphosphate

GTP: Le guanosine triphosphate
H&E : Hématoxyline et à l'éosine
HER : Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains
HKII : HexoKinase II
HR : Recombinaison homologue
HrAS: Homologue d'oncogène viral de sarcome de rat d'harvey
KDa : Kilodalton
KrAS: Sarcome du rat Kristen
Mc: Control Mutant
MMR : Réparation des mésappariements
MMX: Mélange principal
MYC: Maître régulateur de l'entrée du cycle et du métabolisme prolifératif
NER : La réparation par excision de nucléotides
NHEJ : Assemblage d'extrémité non homologue
NrAS : Neuroblastome sarcome de rat
OV : Virus oncolytique
Pb : Paire de base
PCR : Réaction en chaîne de la polymérase
PDL1: Mort programmée - ligand 1
PK: Protéine kinase
RAF: Fibrosarcome à accélération rapide
Ras : Sarcome du rat
RB: Le rétinoblastome
RE : Réticulum endoplasmique
ROS : Les espèces réactives de l'oxygène
RR: Réparation par recombinaison
TG: Thyroglobuline
TLS: Réparation de l'ADN par translésion
tp53 : Protéine tumorale 53
UPR : La réponse protéique dépliée
WB1: Tampon de lavage

Sommaire

Remerciements	
Dédicaces	
Résumé	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1
Partie Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Les Propriétés Cytologiques Du Tissu Cancéreux	
1. Les caractères généraux de la cellule cancéreuse.....	3
1.1 Les modifications du noyau.....	4
1.2 Les modifications du cytoplasme.....	5
1.3 Les modifications de la membrane.....	6
1.4 Les modifications du stroma.....	7
2. Les modifications biochimiques et fonctionnelles.....	7
3. Les anomalies métaboliques.....	8
4. Les étapes de la cancérogenèse.....	8
4.1 L'initiation.....	8
4.2 La promotion.....	9
4.3 La progression.....	9
4.4 L'angiogenèse.....	10
4.5 La métastase.....	11
5. La perturbation de la division et de la différenciation.....	12
5.1 Le cycle cellulaire.....	12
5.2 Le contrôle du cycle cellulaire.....	13
5.3 La mort cellulaire programmée.....	14
Chapitre II : Les Bases Moléculaires Du Cancer	
1. Les altérations génétiques.....	15
2. Les gènes impliqués.....	15
2.1 Les proto-Oncogènes.....	15

2.1.1	Les classes des oncogènes.....	16
2.1.2	L'activation des oncogènes.....	16
2.2	Les gènes suppresseurs de tumeur.....	17
2.2.1	L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur.....	18
2.3	Les gènes de réparation.....	18
3.	Les télomères.....	18
3.1	L'activation de la télomérase.....	19
4.	La perturbation de la signalisation.....	20
4.1	Le gène Ras.....	20
4.2	Le gène EGFR (Epidermal growth factor receptor).....	21
5.	Les stratégies thérapeutiques programmées.....	22
5.1	L'utilisation des anticorps.....	22
5.2	L'utilisation de l'immunité à médiation cellulaire (Thérapie CAR T-Cell)....	23
5.3	Les mitochondries comme cible dans le traitement du cancer.....	23
5.4	La thérapie virale oncolytique : utilisation de virus ciblant les tumeurs pour traiter le cancer.....	24

Partie Expérimentale

Matériel Et Méthodes

1.	Le registre d'anapath.....	26
2.	L'étude cellulaire d'un tissu cancéreux.....	26
2.1	La fixation des échantillons.....	26
2.2	L'étude macroscopique.....	27
2.3	L'histologie.....	29
2.3.1	L'imprégnation et l'inclusion	29
2.3.2	Le dégrossissement.....	31
2.3.3	La coupe.....	31
2.3.4	Le déparaffinage	31
2.3.5	La coloration.....	32
2.4	La cytologie.....	32
2.4.1	En cas de prélèvement liquide et cytoponction.....	32
2.4.2	La coloration.....	33
2.5	Le montage.....	33

2.6 Le rangement des lames.....	33
2.7 L'observation.....	33
3. L'immuno- histochimie.....	34
4. L'étude moléculaire d'un tissu cancéreux.....	35
4.1 Les instructions d'utilisation.....	35
4.2 La procédure d'extraction de l'ADN.....	39
4.3 La quantification de l'ADN.....	41
4.4 L'amplification et la détection.....	42
4.5 Le calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon.....	44

Résultats Et Discussion

1. Résultats.....	48
1.1 L'aspect histologique.....	48
1.2 L'immuno-histochimie.....	49
1.3 La biologie moléculaire.....	51
2. Discussion.....	53
Conclusion.....	54
Liste des références.....	55

Introduction

Introduction

La carcinogenèse est un processus en plusieurs étapes entraîné par des dommages génétiques et épigénétiques induits par les cancérogènes, ces modifications génétiques comprennent: des mutations dans les gènes qui contrôlent la prolifération, la mort cellulaire et la réparation de l'ADN. Par conséquent, les spectres de mutation des cancérogènes chimiques et physiques dans ces gènes critiques sont intéressants pour définir les mécanismes de mutation endogènes et exogènes (**Harris, 1991; Oliveira et al., 2007a**).

La communication de cellule à cellule joue un rôle essentiel pendant le développement et la progression de la tumeur, permettant aux cellules cancéreuses de reprogrammer non seulement le microenvironnement tumoral environnant, mais également les cellules situées à des sites distants. La diapason entre les cellules néoplasiques et les éléments accessoires, tels que les cellules immunitaires et stromales, favorise plusieurs processus nécessaires à la progression et à la dissémination tumorale, tels que l'angiogenèse, l'échappement immunitaire, la transition épithéliale-mésenchymateuse, l'invasion et la multirésistance aux médicaments. Il existe plusieurs moyens par lesquels les cellules communiquent entre elle, soit par des interactions cellulaires directes via des récepteurs membranaires et des ligands, soit en libérant des molécules solubles, telles que des facteurs de croissance, des cytokines et des chimiokines. Une compréhension de la communication cellule-cellule est importante pour comprendre ces événements séquentiels qui mènent à un cancer (**Chiodoni et al., 2019; Brücher and Jamall, 2014**).

En général, les cellules normales ont une forme régulière et ellipsoïde tandis que les cellules cancéreuses sont souvent irrégulières et profilées. Une adhérence réduite dans les cellules cancéreuses peut entraîner une désorganisation et une propagation cellulaire, moins de contacts cellule-cellule, ainsi qu'une apparence générale chaotique à la population cellulaire. En revanche, les cellules normales se développeront sous la forme d'une couche uniforme de cellules avec de nombreuses connexions étroites entre les cellules voisines. Les cellules cancéreuses présentent également souvent des modifications cellulaires et structurales, par exemple : la taille du réticulum endoplasmique et des mitochondries est souvent diminuée, l'appareil de Golgi est sous-développé et le nombre de peroxyosomes augmente. Cependant, le cancer est caractérisé par diverses altérations moléculaires ainsi que de multiples profils cliniques (**lukylee, 2017; Jin et al., 2019**).

La biologie moléculaire et la génétique ont permis de préciser les altérations génétiques qui agissent précisément sur les éléments de régulation de la différenciation, de la division et de la mort cellulaire. Les cancers naissent de cellules au départ saines et fonctionnelles qui sont devenues anormales suite à l'accumulation d'altérations dans leur patrimoine génétique (**Moreau, 2006**).

Le traitement clinique standard comprend la chimiothérapie, la thérapie chirurgicale et la radiothérapie. Malheureusement, la résection chirurgicale échoue souvent à enlever complètement la tumeur, qui est la principale cause de récurrence postopératoire et de métastase, entraînant un taux de mortalité élevé, c'est pourquoi la recherche en oncologie s'efforce de trouver de nouvelles thérapies efficaces qui peuvent atténuer les effets secondaires critiques causés par les traitements conventionnels. Différentes technologies sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques ou ont déjà été introduites dans la pratique clinique, comme : les thérapies avec les anticorps, les cellules T de récepteur d'antigène chimérique (CAR T-cells), les mitochondries ou même avec les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) qui ont introduit le concept de thérapie ciblée pour le traitement du cancer du poumon non à petites cellules. Ces agents semblent plus efficaces chez les patients atteints de tumeurs fortement dépendantes des voies de signalisation de l'EGFR (**Gerber, 2008; Pucci et al., 2019a; Liao et al., 2021**).

Le présent travail comprend :

Une première partie comportant une recherche bibliographique riche de données scientifiques du sujet abordé dans ce thème et est partagée en deux chapitres qui sont: les propriétés cytologiques du tissu cancéreux et les bases moléculaires du cancer.

Une deuxième partie consacrée à l'expérimentation, elle définit le matériel et les méthodes utilisés et les résultats obtenus lors du stage pratique réalisé au sein du centre anti-cancer Annaba (CAC) dans le cadre de notre projet de fin d'étude en biologie moléculaire et cellulaire.

Enfin une conclusion qui reprend les points importants de chaque chapitre et se termine par une suggestion d'autres travaux pour l'avenir.



Synthèse

bibliographique

Chapitre I

*Les propriétés cytologiques du tissu
cancéreux*

1. Les caractères généraux de la cellule cancéreuse

Un objectif majeur de la recherche sur le cancer est de comprendre comment contrecarrer les mécanismes qui sous-tendent la capacité des cancers à tuer le patient ou, en d'autres termes, à être malins. À cette fin, la complexité déroutante de nombreuses propriétés interdépendantes des cancers a été distillée il y a 10 ans en six altérations essentielles de la physiologie cellulaire qui dictent collectivement la croissance maligne (**Lazebnik, 2010**) :

- 1- Une capacité à se propager (métastaser) à d'autres régions du corps: Les cellules normales restent dans la zone du corps où elles appartiennent. Les cellules cancéreuses (car elles n'ont pas les molécules d'adhésion qui causent l'adhérence) sont capables de se déplacer vers d'autres régions du corps. Une fois qu'elles atteignent une nouvelle région, elles commencent à se développer (formant des tumeurs très éloignées de la tumeur d'origine) (**Gopinadh, 1970**).
- 2- Une autosuffisance en signaux de croissance: Cependant, la prolifération de la plupart des cellules cancéreuses n'est pas sensible à l'inhibition dépendante de la densité. Plutôt que de répondre aux signaux qui provoquent l'arrêt de la prolifération des cellules normales et leur entrée en G₀, les cellules tumorales continuent généralement de croître à des densités cellulaires élevées en culture, imitant leur prolifération incontrôlée in vivo (**Cooper, 2000**).
- 3- Une insensibilité aux signaux inhibiteurs de croissance (anti croissance) : en plus de la capacité caractéristique d'induire et de maintenir des signaux de stimulation de croissance à action positive, les cellules cancéreuses doivent également contourner des programmes puissants qui régulent négativement la prolifération cellulaire ; bon nombre de ces programmes dépendent de l'action des gènes suppresseurs de tumeurs. Des dizaines de suppresseurs de tumeurs qui agissent de diverses manières pour limiter la croissance et la prolifération cellulaires ont été découverts grâce à leur inactivation caractéristique dans l'une ou l'autre forme de cancer animal ou humain ; nombre de ces gènes ont été validés en tant que suppresseurs de tumeur de bonne foi grâce à des expériences de gain ou de perte de fonction chez la souris. Les deux suppresseurs de tumeur prototypes codent pour les protéines RB (retinoblastoma-associated) et TP53 (**Hanahan and Weinberg, 2011**).
- 4- Une signalisation proliférative excessive peut déclencher la sénescence cellulaire :
Les premières études sur l'action des oncogènes ont encouragé l'idée qu'une expression toujours croissante de ces gènes et des signaux manifestés dans leurs produits protéiques

entraînerait une prolifération des cellules cancéreuses et donc une croissance tumorale accrue. Des recherches plus récentes ont sapé cette notion, dans la mesure où une signalisation excessivement élevée par des onco-protéines telles que RAS, MYC et RAF peut provoquer des réponses antagonistes des cellules, en particulier l'induction de la sénescence cellulaire et/ou de l'apoptose (**Hanahan and Weinberg, 2011**).

- 5- Un potentiel de réplication illimité : Les cellules deviennent normalement sénescents après un nombre fixe de divisions et sont incapables de continuer partage. En culture, les cellules humaines sont limitées à 50-70 divisions, bien que la plupart meurt avant d'avoir épuisé ce potentiel. Cette limitation empêche de nombreuses tumeurs de grossir assez pour être vues sans microscope. Les expériences montrent, cependant, que les cellules peuvent acquérir un nombre illimité de potentiel de réplication. De telles cellules sont dites immortelles (**Abbott et al., 2006**).
- 6- Une angiogenèse soutenue : Les cellules ne peuvent pas survivre à des distances de plus de 100 μ m environ de l'approvisionnement en sang. Malgré ce fait, les cellules sont normalement incapables d'induire l'angiogenèse (nouvelle croissance capillaire). Sans une telle croissance, les tumeurs peuvent croître seulement à environ 0,5 mm, l'importance de l'angiogenèse dans la tumorigenèse a été étudiée depuis le début des années 1970 et a abouti à des essais cliniques de plusieurs inhibiteurs de l'angiogenèse (**Abbott et al., 2006**).

1.1 Les modifications du noyau

À quelques exceptions près, les noyaux des cellules normales ont une forme ellipsoïde avec des contours lisses; en revanche, de nombreuses cellules cancéreuses sont facilement identifiables (Figure 01) par une taille nucléaire accrue, des contours nucléaires irréguliers et une distribution de la chromatine perturbée, faisant de la morphologie nucléaire l'un des marqueurs cancéreux les plus anciens et les plus couramment utilisés. Le contour nucléaire irrégulier des cellules cancéreuses est principalement le résultat de rainures, de circonvolutions et d'invaginations de l'enveloppe nucléaire. Bien que les changements caractéristiques de la morphologie nucléaire des cellules cancéreuses soient bien documentés, leur cause et leur conséquence restent incertaines. Fait intéressant, la morphologie nucléaire irrégulière des cellules cancéreuses présente souvent une ressemblance frappante avec les formes nucléaires anormales observées dans les cellules dépourvues ou exprimant des protéines d'enveloppe nucléaire mutantes (**Denais and Lammerding, 2014**).

1.2 Les modifications du cytoplasme

De nouvelles structures apparaissent ou des structures normales disparaissent. L'accumulation d'ARN ribosomal et messager dans le cytoplasme le rend basophile. Les cellules malignes ont une petite quantité cytoplasmique, souvent avec des vacuoles (**Baba and Câtoi, 2007**).

- L'invasion ou les métastases dans des environnements étrangers peuvent exposer les cellules tumorales à l'hypoxie, au stress oxydatif, au manque de signaux de croissance, à un approvisionnement insuffisant en acides aminés, à la privation de glucose et à l'acidose lactique, qui posent tous des défis pour le traitement des protéines dans les urgences. Ensemble, ces conditions peuvent favoriser l'accumulation de protéines mal repliées dans le RE pour provoquer un stress ER, qui active ensuite la réponse protéique dépliée (UPR) (**Oakes, 2020**).

La diminution du réticulum endoplasmique granulaire des cellules tumorales se produit de manière concomitante avec une augmentation des ribosomes et des polysomes libres, ce qui montre une production accrue de protéines nécessaires au processus de croissance cellulaire (**Baba and Câtoi, 2007**).

- L'appareil de Golgi dans les cellules malignes est généralement peu développé, ce qui implique une corrélation positive avec l'absence de différenciation des cellules tumorales (**Baba and Câtoi, 2007**).

Le Golgi modifié, transporte et sécrète des protéines une fois qu'elles se détachent du mécanisme de synthèse des protéines de la cellule. Les cellules cancéreuses surproduisent souvent certaines protéines telles que la cyclooxygénase-2 (COX-2) qui s'accumulent dans le Golgi. Les scientifiques pensent que cette accumulation de protéines pourrait déclencher le suicide cellulaire, mais ils ne connaissent pas le moment précis et les mécanismes impliqués (**Cassiday, 2013**).

- Les mitochondries diminuent de volume avec le développement de la tumeur. Les mitochondries présentent une grande variabilité de forme et de volume, et d'énormes mitochondries peuvent parfois être observées. Des processus de glycolyse anormaux se produisent dans les membranes mitochondriales (**Baba and Câtoi, 2007**).

Les mitochondries ne sont pas seulement des centrales électriques dans certaines cellules cancéreuses, mais également des régulateurs dynamiques de la vie, de la mort, de la prolifération, du mouvement et de la souche dans d'autres types de cellules cancéreuses. Semblables aux cellules qui les hébergent, les mitochondries sont capables de s'adapter aux

conditions tumorales, et probablement d'évoluer vers des «mitochondries oncogènes» capables de transférer des capacités malignes aux cellules receveuses. Dans la quête plus large des modulateurs métaboliques du cancer (Grasso *et al.*, 2020).

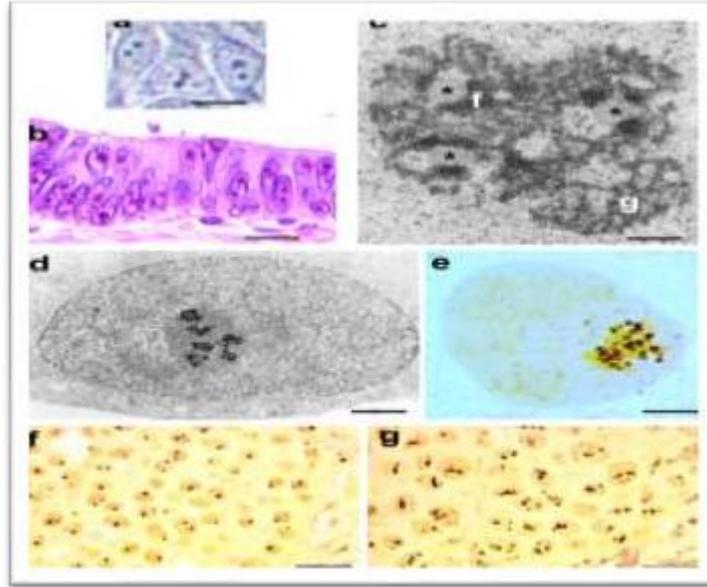


Figure 01 : L'observation microscopique des cellules cancéreuses (Montanaro *et al.*, 2008). a: Cellules de cancer du sein humain cultivées *in vitro* visualisées à l'aide du microscope à phase de contraste. b: Coupe histologique du carcinome du côlon humain coloré avec H&E. c: Visualisation au microscope électronique du nucléole d'une cellule TG (lignée cellulaire établie à partir d'un cancer de la trompe de Fallope humain) après coloration à l'uranium et au plomb. d: cellule TG, après coloration spécifique de la protéine AgNOR, au niveau de la microscopie électronique. e : Même préparation qu'en d, mais visualisée au microscope optique. f et g : coupes histologiques de deux carcinomes mammaires humains, colorées pour les protéines AgNOR.

1.3 Les modifications de la membrane

Les cellules cancéreuses sont entourées d'une membrane fluide-mosaïque qui fournit une barrière structurelle hautement dynamique avec le microenvironnement, les structures et les mobilités des constituants membranaires après transformation et au cours de la progression et les métastases. Des informations plus récentes ont montré l'importance des domaines membranaires spécialisés (Nicolson, 2015).

- Augmentation ou diminution du nombre de récepteurs de surface, modifiant la sensibilité des cellules aux mécanismes de régulation de l'hôte (**Baba and Câtoi, 2007**).
- Des changements structurels de protéines ou de récepteurs de surface qui ne réagissent plus avec le ligand correspondant (**Baba and Câtoi, 2007**).
- Présence de nouvelles molécules de surface, caractéristiques du tissu embryonnaire, qui sont cachées à la surface des cellules adultes (**Baba and Câtoi, 2007**).

1.4 Les modifications du stroma

Le stroma tumoral se compose principalement de la membrane basale, des fibroblastes, de la matrice extracellulaire, des cellules immunitaires et du système vasculaire (Figure 02). Bien que la plupart des cellules hôtes du stroma possèdent certaines capacités de suppression des tumeurs, le stroma changera au cours de la malignité et finira par favoriser la croissance, l'invasion et les métastases. Les changements stromaux au front d'invasion incluent l'apparition de fibroblastes associés au carcinome (**Bremnes et al., 2011**).

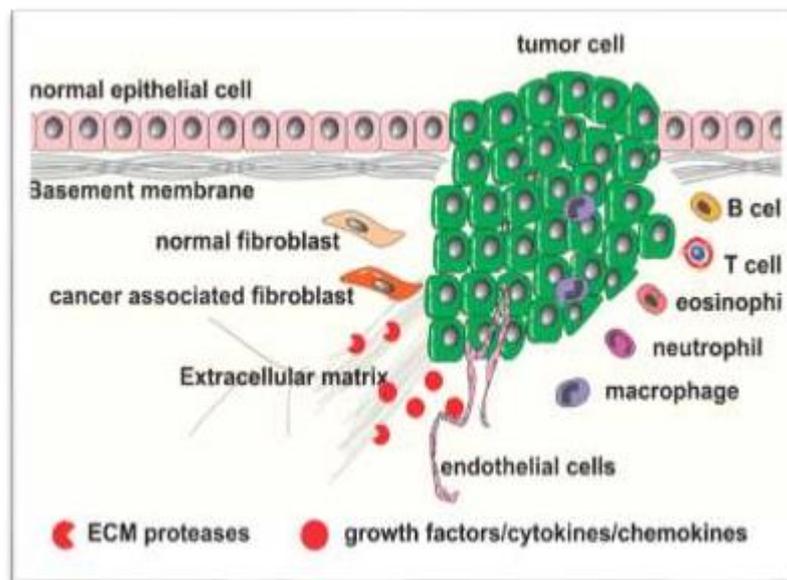


Figure 02: La composition du microenvironnement stroma tumoral (**Werb and Lu, 2015**).

2. Les modifications biochimiques et fonctionnelles

Les cellules répondent aux caractéristiques biochimiques et biomécaniques de la matrice extracellulaire (ECM). Ces réponses (par exemple, prolifération, apoptose, migration et différenciation) sont cruciales pour la santé à tous les niveaux. Les cellules cancéreuses partagent de nombreuses propriétés réactives des cellules saines. Cependant, elles diffèrent

des cellules normales parce que leurs réponses à l'ECM sont souvent dérégulées et qu'elles présentent une résistance aux médicaments et la capacité de former des tumeurs récurrentes (**Yoshii et al., 2016**).

3. Les anomalies métaboliques

Les cellules cancéreuses présentent de profondes altérations métaboliques, ce qui leur permet de répondre aux besoins métaboliques associés à une prolifération accrue et à des facettes supplémentaires de la malignité, une telle transformation métabolique est orchestrée par les changements génétiques qui entraînent la tumorigenèse, c'est-à-dire l'activation d'oncogènes et/ou la perte de gènes onco-suppresseurs, et en outre façonnée par des signaux environnementaux, tels que la concentration en oxygène et la disponibilité des nutriments (**Sciacovelli et al., 2014**).

L'anomalie métabolique la plus connue des cellules cancéreuses est l'effet Warburg, qui démontre une augmentation glycolyse même en présence d'oxygène (**Wu and Zhao, 2013**).

Le profil métabolique observé dans les cellules cancéreuses comprend souvent une consommation accrue de glucose et de glutamine, une glycolyse accrue, des changements dans l'utilisation des isoformes d'enzymes métaboliques et une augmentation de la sécrétion de lactate (**Coller, 2014**).

Lorsqu'il est devenu évident que des anomalies dans les chromosomes et éventuellement des gènes individuels causaient le cancer, le modèle « métabolique » du cancer a perdu une grande partie de son attrait, alors même que les technologies émergentes exploitaient cliniquement l'effet Warburg pour détecter les tumeurs in vivo (**Deberardinis, 2008**).

4. Les étapes de la cancérogenèse

La modélisation du processus de cancérogenèse comporte différentes étapes (Figure 03).

4.1 L'initiation

L'initiation est un phénomène rapide, irréversible et transmis aux cellules filles, la prolifération cellulaire est essentielle à cette étape, si la division cellulaire se produit avant que les systèmes de réparation de l'ADN puissent agir alors la lésion devient permanente et

irréversible. L'initiation est un processus additif, le développement néoplasique dépend de la dose cancérigène, l'augmentation de la dose augmente l'incidence et la multiplicité des néoplasies résultantes et réduit la période de latence de sa manifestation. Toutes les cellules d'un organisme vivant exposées à un agent initiateur ne seront pas initiées même si elles ont subi des mutations, et les gènes qui régulent la différenciation terminale doivent également être mutés (**Oliveira et al., 2007b**).

Des cellules initiées spontanément existent dans tous les organismes vivants, l'initiation peut commencer par des mutations spontanées, soutenues par des événements normaux tels que la dépurination et la désamination de l'ADN. Des erreurs dans la réplication de l'ADN sont également associées à l'initiation ; bien que l'initiation spontanée soit moins fréquente que l'initiation induite, son existence a été confirmée par la survenue de néoplasies spontanés chez les animaux de laboratoire (**Oliveira et al., 2007b**).

4.2 La promotion

L'étape de promotion n'implique pas de changements moléculaires dans la structure de l'ADN mais plutôt des changements dans l'expression du génome, des études moléculaires de cette étape ont montré qu'elle a été principalement concernée par la méthode de transduction d'informations à partir de signaux environnementaux vers le génome avec ses expressions. De nombreux agents promoteurs chimiquement définis médient leurs effets grâce aux molécules réceptrices (**Pitot, 1993**).

4.3 La progression

L'hétérogénéité génétique dans une population cellulaire promue se produit lorsque la population cellulaire initiée ou mutée est étendue pendant la promotion et atteint d'autres dommages génétiques. Ceci est attribué à un agent médié ou spontané concernant des changements irréversibles et progressifs. Dans l'étape de progression, un phénotype néoplasique est atteint en raison de moyens génétiques et épigénétiques. Ici, la prolifération est un processus autonome malgré la présence ou l'absence de stimuli liés à la progression. Elle est illustrée par l'irréversibilité, l'instabilité génétique, la production de facteurs de croissance, l'invasion, les métastases et les altérations de la biochimie, du métabolisme et morphologie des cellules perturbées (**Chahar et al., 2020**).

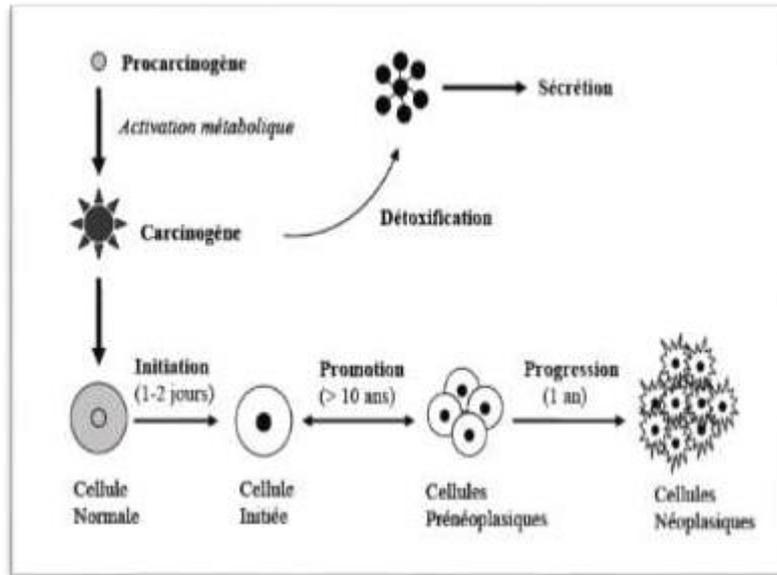


Figure 03 : Les étapes de la cancérogenèse (Vauzour, 2021).

4.4 L'angiogénèse

L'angiogénèse est un processus en plusieurs étapes, qui implique l'activation, la prolifération et la migration dirigée des cellules endothéliales pour former de nouveaux capillaires à partir des vaisseaux existants (figure 04) (Grant *et al.*, 1994).

Une nouvelle croissance du réseau vasculaire est importante, car la prolifération ainsi que la propagation métastatique des cellules cancéreuses dépendent d'un apport adéquat en oxygène et en nutriments et de l'élimination des déchets. De nouveaux vaisseaux sanguins et lymphatiques se forment par des processus appelés angiogénèse et lymphangiogénèse (Nishida *et al.*, 2006).

L'angiogénèse germinative peut ajouter des vaisseaux sanguins à des portions de tissus auparavant dépourvues de vaisseaux sanguins. D'autre part, l'angiogénèse intussusceptive implique la formation de vaisseaux sanguins par un processus de division dans lequel des éléments de tissus interstitiels envahissent les vaisseaux existants, formant des piliers tissulaires transvasculaires qui se dilatent. On pense que les deux types d'angiogénèse se produisent dans pratiquement tous les tissus et organes (Adair and Montani, 2010).

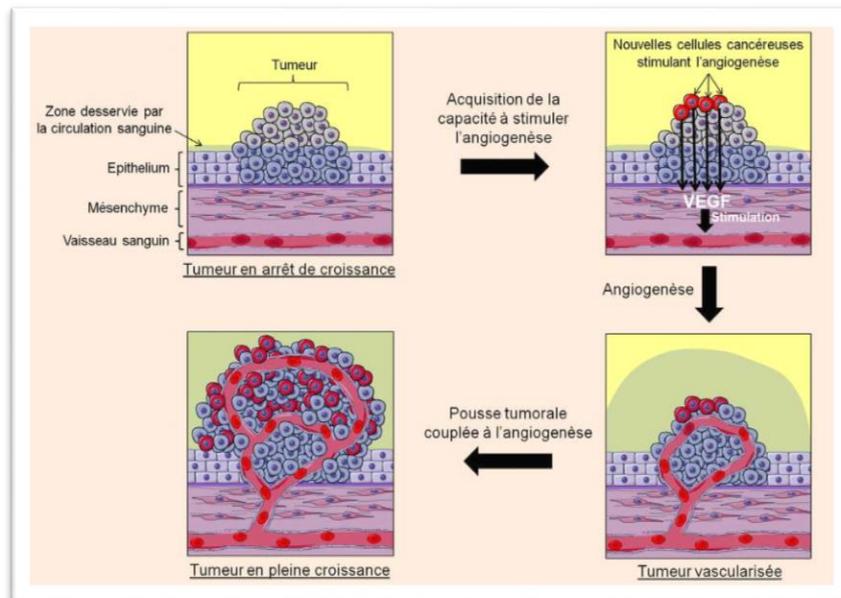


Figure 04 : L'angiogénèse tumorale (HONTAAS, 2014).

A partir de quelques millimètres cubes la tumeur ne peut plus se développer sans oxygène et les cellules en hypoxie vont produire du VEGF pour stimuler l'angiogénèse tumorale. Dès lors, la tumeur vascularisée va pouvoir assurer la nutrition des cellules qui la composent, même les cellules périphériques, et poursuivre sa croissance.

4.5 La métastase

La métastase signifie la dissémination des cellules cancéreuses d'un organe à un autre qui n'est pas directement reliée au site primaire. La métastase a un rôle crucial dans le pronostic des patients cancéreux. Au premier stade de la métastase, les cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire et se disséminent dans le tissu, ensuite, les cellules cancéreuses pénètrent dans les canaux vasculaires ou lymphatiques. La survie des cellules tumorales circulantes (CTC) à l'intérieur des canaux lymphatiques ou sanguins est essentielle pour que les métastases établissent une micro-métastase. Enfin, les cellules cancéreuses s'extravasent à travers la paroi du vaisseau et prolifèrent sur le site secondaire. Pour chaque étape, de nombreuses voies de signalisation sont impliquées (Figure 05) (Irani, 2019).

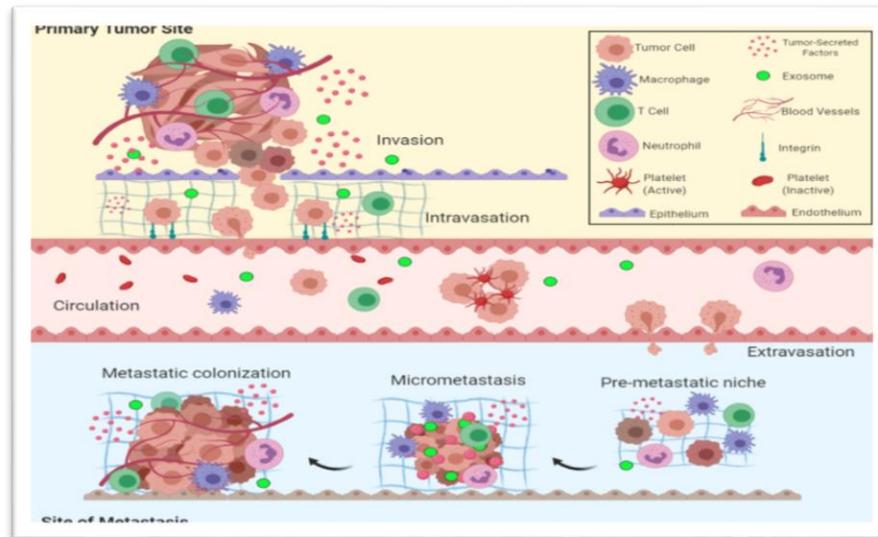


Figure 05 : La vue d'ensemble de la cascade métastatique: Les cinq étapes clés de la métastase comprennent l'invasion, l'intravasation, la circulation, l'extravasation et la colonisation (Fares et al., 2020).

5. La perturbation de la division et de la différenciation

La dérégulation du cycle cellulaire sous-tend la prolifération cellulaire aberrante qui caractérise le cancer, et la perte de contrôle des points de contrôle du cycle cellulaire favorise l'instabilité génétique. Au cours des deux dernières décennies, la génétique du cancer a montré que des mutations hyperactivantes dans les réseaux de signalisation de croissance, couplées à la perte de fonction des protéines suppresseurs de tumeurs, entraînent la prolifération oncogène. La machinerie du cycle cellulaire, qui agit comme un point d'intégration pour les informations transmises par les réseaux de signalisation en amont, représente une cible alternative pour les interventions diagnostiques et thérapeutiques (Williams and Stoeber, 2012).

5.1 Le cycle cellulaire

La plupart des cellules du corps passent par un cycle de vie dans lequel leurs informations génétiques sont conservées, fixées et transmises aux cellules filles par un processus hautement coordonné et régulé. Cependant, au cours de ce cycle cellulaire (Figure 06), il existe de nombreuses situations où des erreurs sont commises par le cycle ou par un système de régulation qui fait proliférer la cellule de manière incontrôlable, conduisant au cancer. Les cellules somatiques sont les mieux connues pour ce cycle cellulaire et passent

par 2 phases principales appelées interphase et mitose. Pendant l'interphase, certaines subdivisions sont importantes pour la division cellulaire et la maintenance du matériel génétique. Les subdivisions se composent de G₁, S et G₂. Les cellules peuvent également entrer dans une 4ème phase connue sous le nom de G₀ lorsque la cellule est destinée à mourir et à ne plus se diviser (Mercadante and Kasi, 2021).

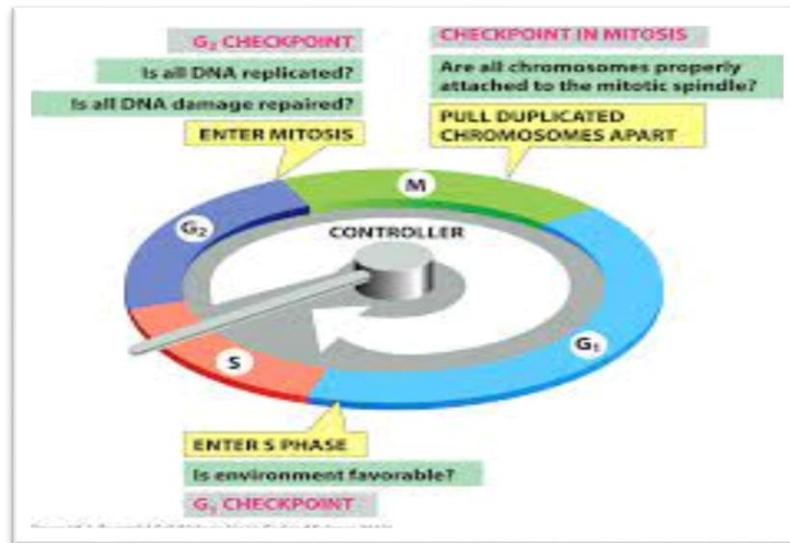


Figure 06: Les phases du cycle cellulaire (Benribague, 2016).

5.2 Le contrôle de cycle cellulaire

Plusieurs contrôles sont effectués au cours du cycle cellulaire, pour vérifier que toutes les conditions sont réunies pour pouvoir progresser dans ce cycle. Il existe trois points de contrôle:

- 1- un système de contrôle vérifie les conditions environnementales et en particulier l'état de l'ADN génomique à la fin de la phase G₁ avant la phase de réplication de l'ADN ou phase S; la division cellulaire peut être stoppée en cas de dommage important et les systèmes de réparation de l'ADN mis en jeu; ce point du cycle est appelé « point de non-retour » ou « point R » (R pour restriction); la cellule s'engagera de façon irréversible vers la phase S de Synthèse d'ADN une fois franchi ce point R; puisque certaines cellules devront s'orienter vers l'apoptose, il y aura encore deux possibilités: « division ou suicide ».
- 2- Avant l'entrée en mitose, une vérification de la réplication de l'ADN est faite à la fin de la phase G₂, cet autre contrôle est appelé « point T » (T pour transition).

- 3- Au cours de la métaphase de la mitose (M), avant la séparation des chromosomes et la division des deux noyaux-fils, une vérification de l'attachement des chromosomes au fuseau cellulaire est indispensable. La régulation positive et négative du cycle cellulaire est indispensable. La régulation positive et négative du cycle cellulaire se fait au niveau de ces points de contrôle, en particulier par des régulateurs extracellulaires (facteurs de croissance) (**Étienne and Clauser, 2004**).

5.3 La mort cellulaire programmée

La mort cellulaire, la survie, la prolifération et la différenciation représentent des processus fondamentaux de la vie, elle joue un rôle central dans le développement embryonnaire, en maintenant l'homéostasie de l'organisme et en éliminant les cellules endommagées. La mort cellulaire a été initialement divisée en trois types (Figure 07) la mort cellulaire de type I (apoptose), la mort cellulaire de type II (autophagie) et la mort cellulaire de type III (nécrose) (**Yan et al., 2020**).

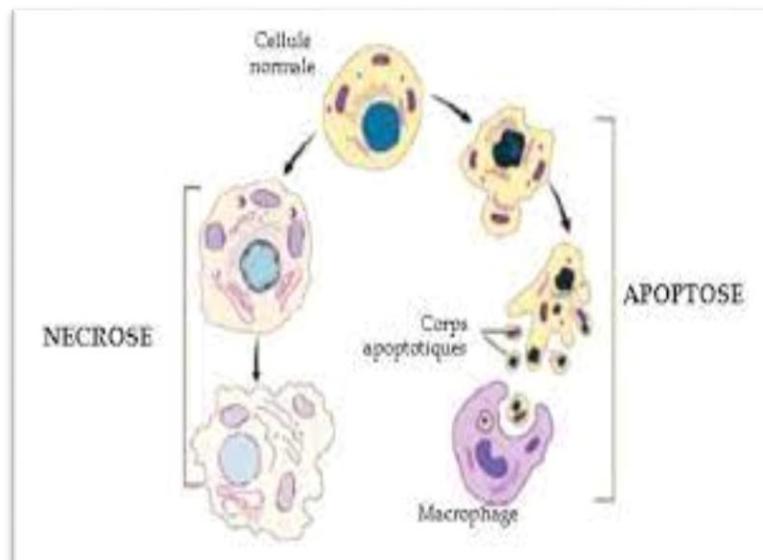


Figure 07 : La différence entre l'apoptose et la nécrose (**Carmaux, 2008**).

Chapitre II

Les bases moléculaires du cancer

1. Les altérations génétiques

Les altérations génétiques, ou mutations, sont omniprésentes dans les cellules cancéreuses, des mutations dans les séquences d'ADN peuvent entraîner une modification de l'expression et / ou de la fonction des protéines. Il existe différents types de mutations qui peuvent être liés au développement du cancer, et ces mutations se produisent via divers mécanismes, y compris des insultes extrinsèques et des défauts intrinsèques (**Jain et al., 2021**).

2. Les gènes impliqués

La liste actuelle des gènes cancéreux connus comprend 70 gènes associés à des mutations germinales et 342 gènes associés à des mutations somatiques. De manière générale, cependant, les mutations dans deux classes de base de gènes - les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs - sont eux qui conduisent au cancer (**Chin and Gray, 2008**).

Les gènes dont les produits protéiques stimulent ou améliorent la division et la viabilité des cellules, y compris ceux qui contribuent à la croissance tumorale en inhibant la mort cellulaire. Les versions normales d'un gène du premier groupe sont appelées proto-oncogènes. Les versions mutées ou autrement endommagées de ces gènes sont appelées oncogènes, les gènes du deuxième groupe sont appelés suppresseurs de tumeurs ou anti oncogènes (**Pawaiya et al., 2011**).

2.1 Les proto-Oncogènes

Les proto-oncogènes sont des gènes cellulaires normaux qui régulent la croissance et la différenciation cellulaire. Ils codent souvent pour des produits tels que des facteurs de croissance et leurs récepteurs, des régulateurs du cycle cellulaire, des protéines de liaison à l'ADN, des facteurs de transcription, des protéines kinases impliquées dans la transduction du signal, etc. Lorsqu'ils sont « activés » par surexpression ou mutation, les proto-oncogènes sont appelés oncogènes (**Zachary, 2017**).

Les proto-oncogènes peuvent être classés en de nombreux groupes différents sur la base de leur fonction normale dans les cellules ou sur la base d'une homologie de séquence avec d'autres protéines connues. Ainsi, des proto-oncogènes ont été identifiés à tous les niveaux de cascades de transduction de signaux variés qui contrôlent la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires (**Pawaiya et al., 2011**).

2.1.1 Les classes des oncogènes

Les oncogènes codent pour des protéines qui contrôlent les processus cellulaires tels que la prolifération et l'apoptose. Parmi ces protéines, on trouve des facteurs de transcription, des remodeleurs de chromatine, des facteurs de croissance, des récepteurs de facteurs de croissance, des transducteurs de signaux et des régulateurs d'apoptose **(Botezatu et al., 2016a)**.

En fonction des onco-protéines pour lesquels ils codent, les oncogènes sont répartis en 6 grandes classes:

- 1- Les facteurs de croissance (assurent une boucle de régulation autocrine), comme les proto-oncogènes codant pour les protéines de la famille FGF (fibroblast growth factor).
- 2- Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance, comme : le proto-oncogène erbB code pour le récepteur à l'EGF (epidermal growth factor).
- 3- Les G-protéines ou protéines membranaires liant le GTP, par exemple : proto-oncogènes de la famille rase.
- 4- Les tyrosines protéine-kinases membranaires.
- 5- Les protéine-kinases cytosoliques.
- 6- Les protéines à activité nucléaire : contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN, comme le proto-oncogène erbA codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes, les proto-oncogènes fos, jun et c-myc **(Cooper, 2000)**.

2.1.2 L'activation des oncogènes

Plusieurs événements peuvent être responsables de l'activation des proto-oncogènes en oncogènes dont :

a) Les mutations ponctuelles :

Dans une séquence codante pour un proto-oncogène aboutissant à une modification fonctionnelle de l'onco-protéine :

Les mutations faux-sens : entraînant le remplacement d'un acide aminé par un autre, sont capables d'activer des proto-oncogènes, en touchant par un site catalytique **(Boumaaza, 2021)**.

La délétion : les délétions peuvent parfois entraîner une activation anormale si elles touchent une région régulatrice, ce qui aboutit le plus souvent à une perte de fonction **(Boumaaza, 2021)**.

b) L'amplification:

Outre les mutations ponctuelles entraînant des substitutions d'acides aminés, un proto-oncogène peut être activé par des altérations chromosomiques. Parmi les anomalies chromosomiques les plus importantes, il y a l'amplification génique, qui est une augmentation du nombre de copies pour une région chromosomique spécifique. La conséquence de l'amplification des fragments chromosomiques est associée à la surexpression du ou des gènes amplifiés et est une caractéristique du cancer (**Botezatu et al., 2016b**).

c) Les réarrangements chromosomiques :

Les cellules cancéreuses présentent habituellement de multiples anomalies chromosomiques, celles que l'on rencontre dans les tumeurs sont des anomalies chromosomiques spécifiques et des modifications aléatoires non spécifiques. Les réarrangements chromosomiques peuvent permettre le rapprochement entre les exons de deux gènes distincts, pour former un nouveau gène chimère (**Donnai and Read, 2008**).

d) L'intégration virale :

La réplication virale seule n'est pas suffisante pour l'induction tumorale, les éléments viraux qui contrôlent la réplication ont une forte influence sur ces étapes. La capacité d'infecter plusieurs fois un grand nombre de cellules dans le tissu cible augmente la probabilité qu'une insertion provirale se produise à proximité d'un gène impliqué dans le contrôle de la croissance (**Coffin et al., 1997**).

2.2 Les gènes suppresseurs de tumeur

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes importants qui agissent dans le génome pour réguler plusieurs fonctions cellulaires. Ces gènes peuvent être largement classés en fonction de leur rôle dans la croissance cellulaire / progression du cycle cellulaire, la prolifération cellulaire, les mécanismes de réparation de l'ADN et d'autres fonctions de signalisation cellulaire cruciales telles que l'induction de l'apoptose. Sans gènes suppresseurs de tumeurs fonctionnels il existe un risque élevé de croissance cellulaire dérégulée qui est un mécanisme bien connu pour le développement de cancers (**Joyce et al., 2021**).

L'extraordinaire accumulation récente de connaissances sur ces gènes révèle que la carcinogenèse normale représente la rupture des processus normaux de régulation (**Lee, 1992**).

2.2.1 L'inactivation des gènes suppresseurs de tumeur

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés par divers mécanismes. Étant donné qu'un allèle mutant d'un gène suppresseur de tumeur est récessif pour la transformation maligne cellulaire, la mutation est héréditaire, et les mutations de la lignée germinale des gènes suppresseurs de tumeur sont bien caractérisées (**Ishizaki, 1995**).

2.3 Les gènes de réparation

Bien que les informations originales sur la réparation de l'ADN et les gènes responsables aient été largement dérivées d'études sur des bactéries et des levures, plus de 125 gènes directement impliqués dans la réparation de l'ADN ont maintenant été identifiés chez l'homme et leur séquence d'ADNc établie. Ces gènes fonctionnent dans un ensemble diversifié de voies qui impliquent la reconnaissance et l'élimination des lésions de l'ADN, la tolérance aux dommages de l'ADN et la protection contre les erreurs d'incorporation commises lors de la réplication ou de la réparation de l'ADN. Des gènes supplémentaires affectent indirectement la réparation de l'ADN, en régulant le cycle cellulaire (**Ronen and Glickman, 2001**).

Des mutations dans les gènes de réparation de l'ADN du groupe de réparation par excision des nucléotides (NER), mutations affectant les gènes de réparation des mésappariements (MMR) et plusieurs autres (Figure 08) sont à l'origine de syndromes cancéreux héréditaires. En tant que mécanisme alternatif à la mutation génétique, un système de réparation de l'ADN peut être inactivé ou diminué en efficacité par des mécanismes d'inactivation de gène épigénétique affectant les gènes de réparation de l'ADN (**Lahtz and Pfeifer, 2011**).

3. Les télomères

Les télomères maintiennent l'intégrité génomique dans les cellules normales, et leur raccourcissement progressif au cours des divisions cellulaires successives induit une instabilité chromosomique (**Jafri et al., 2016**).

La fonction de base des télomères est de protéger les extrémités des chromosomes contre la dégradation et la perte d'informations génétiques. Les télomères protègent également les chromosomes contre la recombinaison anormale, la fusion chromosomique (empêche les aberrations chromosomiques, y compris les translocations, les duplications

et les délétions), ou leur dégradation à la suite d'une attaque d'exonucléase (Trybek *et al.*, 2020).

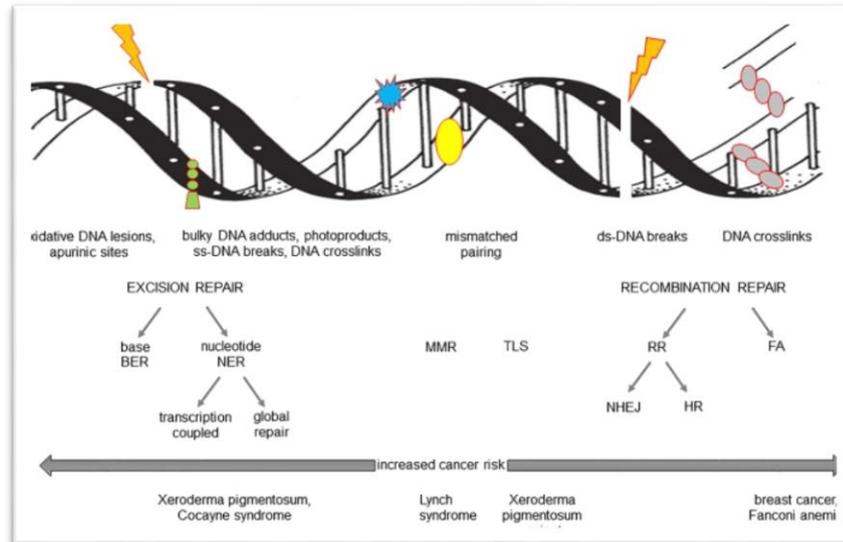


Figure 08: Les voies de réparation de l'ADN (Kiwerska and Szyfter, 2019).

MMR, réparation des discordances; TLS, réparation de l'ADN par translesion; RR, réparation par recombinaison; NHEJ, assemblage d'extrémité non homologue; HR, recombinaison homologue; FA, anémie de Fanconi.

5.1 L'activation de la télomérase

À chaque division cellulaire, la longueur des télomères est réduite d'environ 50 à 200 pb principalement parce que le brin retardé de la synthèse d'ADN est incapable de répliquer l'extrémité 3' extrême du chromosome, ce qui est désigné comme un problème de répllication finale. Lorsque les télomères deviennent suffisamment courts, les cellules entrent dans un arrêt de croissance irréversible appelé sénescence cellulaire. Dans les cellules cancéreuses, la longueur des télomères est continuellement construite et raccourcie d'une manière régulée (Figure 09) qui maintient l'homéostasie de la longueur des télomères et conserve la fonctionnalité des télomères. L'allongement des télomères est principalement réalisé par l'action d'une transcriptase inverse spécialisée appelée télomérase et parfois par recombinaison homologue (HR) (Jayaraman and Muthusamy, 2016).

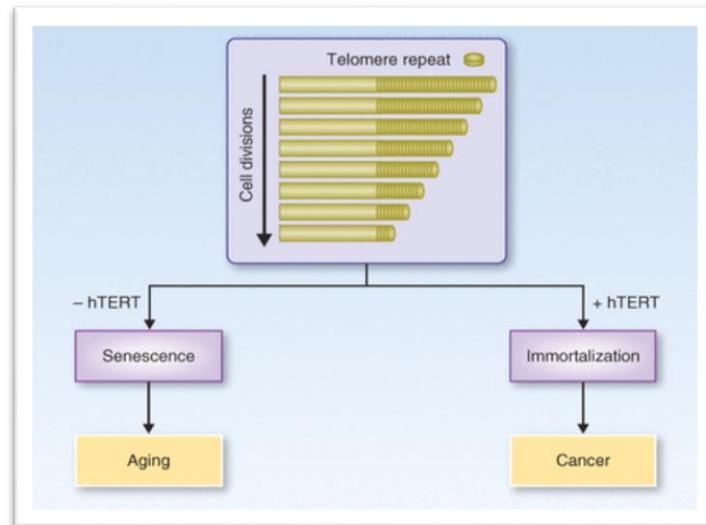


Figure 09 : La longueur des télomères est continuellement construite et raccourcie d'une manière régulée (Shay, 2016).

4. La perturbation de la signalisation cellulaire

Il existe de nombreuses voies de signalisation différentes qui contribuent au développement et à l'homéostasie cellulaire. Dans les maladies, en particulier le cancer, les composants du développement de ces voies deviennent souvent mutés ou surexprimés, provoquant un dérèglement de la signalisation cellulaire (Harvey, 2019).

4.1 Le gène Ras

Les gènes ras humains (Nras, Hras et Kras) codent pour des petites GTPases étroitement apparentées possédant une taille moléculaire d'environ 21 kDa. Les protéines Ras fonctionnent comme des commutateurs moléculaires dans des cascades de transduction de signaux contrôlant la prolifération, la différenciation ou l'apoptose cellulaire. Comme pour toutes les protéines G, la fonction des produits protéiques du gène ras est contrôlée par un cycle GDP/GTP régulé. Chacun des trois proto-oncogènes ras humains peut donner naissance à un oncogène transformant via des mutations d'une seule paire de bases. Des mutations au niveau des codons 12, 13 ou 61 dégradent considérablement la capacité de GTPase des protéines Ras mutantes résultantes, qui sont ainsi rendues constitutivement actives et capables de transformer des cellules de mammifères (Jose and Eugenio, 2002).

Le gène Ras est surexprimé dans 30 à 40% des cas de carcinome thyroïdien, plus de 50% des carcinomes du côlon et 90% des carcinomes pancréatiques, ce qui confirme le rôle principal de Ras dans la transduction du signal cellulaire et la tumorigenèse. Par conséquent, l'inhibition de l'activité de la protéine Ras peut empêcher la transduction du signal cellulaire, qui est l'une des cibles les plus importantes pour la conception de médicaments anticancéreux (**Weinmann and Ottow, 2007**).

4.2 Le gène EGFR (Epidermal growth factor receptor)

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) fait partie d'une importante voie de transduction du signal transmembranaire dans les cellules épithéliales humaines et une expression modifiée de la protéine EGFR où une amplification génique se produit dans un certain nombre de tumeurs solides, y compris le cancer de l'œsophage. La signalisation médiée par l'EGFR est cruciale pour la prolifération cellulaire, ainsi que pour la progression du cancer, y compris l'angiogenèse tumorale, les métastases et la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose (**LIN et al., 2015**).

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et ses trois protéines apparentées sont des récepteurs tyrosine kinases qui jouent des rôles essentiels à la fois dans des conditions physiologiques normales et dans des conditions cancéreuses. Lors de la liaison de ses ligands, des changements conformationnels dynamiques se produisent dans les domaines extracellulaires et intracellulaires des récepteurs tyrosine kinases, entraînant la transphosphorylation des résidus tyrosine dans le domaine de régulation C-terminal. Ceux-ci fournissent des sites d'amarrage pour les molécules en aval et conduisent à l'évasion de l'apoptose, à la prolifération, à l'invasion et aux métastases, qui sont tous importants pour le phénotype du cancer. Une mutation dans le domaine tyrosine kinase du gène EGFR a été trouvée dans un sous-ensemble de cancers du poumon en 2002. Les cancers du poumon avec une mutation EGFR sont très sensibles aux inhibiteurs de la tyrosine kinase EGFR. Ici, nous passons en revue la découverte de l'EGFR, la voie de transduction du signal EGFR et les mutations du gène EGFR dans les cancers du poumon et les glioblastomes. La signification biologique de ces mutations et leur relation avec d'autres gènes activés dans les cancers du poumon sont également discutées (**Mitsudomi and Yatabe, 2010**).

5. Les stratégies thérapeutiques programmées

La recherche oncologique s'efforce de trouver de nouvelles thérapies efficaces qui peuvent atténuer les effets secondaires critiques causés par les traitements conventionnels. Différentes technologies sont actuellement en cours d'évaluation dans des essais cliniques ou ont déjà été introduites dans la pratique clinique. Alors que la nanomédecine contribue au développement de matériaux biocompatibles tant à des fins diagnostiques que thérapeutiques (**Pucci et al., 2019**).

5.1 L'utilisation des anticorps

Au cours des trente dernières années, diverses formes de traitements dérivés des anticorps monoclonaux ont été utilisées en clinique dans un effort pour capitaliser sur le potentiel de la thérapie ciblée. Les anticorps sont extrêmement polyvalents en tant que plates-formes pour le développement de nouvelles thérapies, ce qui a abouti à une grande diversité d'approches. La découverte d'antigènes spécifiques de tumeurs ciblables a alimenté l'intérêt pour la conception d'immunothérapies. Lors de l'émergence des AcM, on a pensé que leur utilisation pour cibler les antigènes des cellules tumorales pourrait être un traitement plus efficace et moins toxique que la chimiothérapie traditionnelle. En 1988, les scientifiques ont identifié une protéine, CD20, qui était spécifique des cellules B matures. Le CD20 s'est avéré être abondamment exprimé sur les cellules B cancéreuses dans le lymphome non hodgkinien, mais pas sur les cellules B immatures saines. Par conséquent, un traitement AcM ciblant le CD20 pourrait éliminer les cellules cancéreuses, mais les cellules B immatures resteraient pour reconstituer l'approvisionnement en cellules saines. Ainsi, le CD20 est devenu la première cible pour la thérapie AcM. En ciblant les antigènes identifiés comme surexprimés sur les cellules tumorales solides, davantage de AcM ont depuis démontrés leurs efficacités en tant que thérapies anticancéreuses. Aujourd'hui, les AcM dirigés vers des cibles telles que la croissance épidermique EGFR et HER2 voient une large utilisation dans la clinique pour le traitement des cancers colorectal et du sein respectivement (**Zahavi and Weiner, 2020**).

5.2 L'utilisation de l'immunité à médiation cellulaire (Thérapie CAR T-Cell)

La thérapie cellulaire par récepteur d'antigène chimérique (CAR)-T est un nouveau pilier révolutionnaire dans le traitement du cancer. Bien que le traitement avec les cellules CAR-T ait produit des réponses cliniques remarquables avec certains sous-ensembles de leucémies à cellules B ou de lymphomes, de nombreux défis limitent l'efficacité thérapeutique des cellules CAR-T dans les tumeurs solides et les hémopathies malignes (**Sterner and Sterner, 2021**).

Dans cette stratégie, les propres cellules T d'un patient sont génétiquement modifiées pour exprimer un récepteur synthétique qui se lie à un antigène tumoral. Les cellules CAR T sont ensuite développées pour une utilisation clinique et réinjectées dans le corps du patient pour attaquer et détruire le cancer résistant à la chimiothérapie. Des réponses cliniques spectaculaires et des taux élevés de rémission complète ont été observés dans le cadre de la thérapie CAR T des tumeurs malignes des cellules B. Cela a abouti à deux approbations récentes par la FDA de cellules CAR T dirigées contre la protéine CD19 pour le traitement de la leucémie lymphoblastique aiguë et du lymphome diffus à grandes cellules B. Ainsi, les cellules CAR T sont sans doute l'un des premiers exemples réussis de biologie synthétique et de thérapie cellulaire personnalisée contre le cancer à devenir disponibles dans le commerce (**Feins et al., 2019**).

5.3 Les mitochondries comme cible dans le traitement du cancer

Étant donné que les cellules cancéreuses présentent divers degrés de dysfonctionnements mitochondriaux tels que des changements dans le métabolisme énergétique, un potentiel transmembranaire accru et une génération élevée de ROS, ces changements offrent la possibilité de cibler préférentiellement les mitochondries des cellules cancéreuses et d'améliorer la sélectivité thérapeutique. De plus, il a été démontré que l'ADNmt est une cible importante de plusieurs médicaments anticancéreux qui interagissent avec l'ADN, et que les mitochondries déterminent l'efficacité de cette classe de médicaments anticancéreux. Plusieurs approches ont été développées comme moyens possibles pour tuer sélectivement les cellules cancéreuses en fonction de leur dysfonctionnement mitochondrial et de leurs altérations métaboliques (**Wen et al., 2013**).

On observe depuis longtemps que les cellules cancéreuses dépendent davantage de la glycolyse pour générer de l'ATP et utilisent activement certains intermédiaires métaboliques glycolytiques pour la biosynthèse. L'hexokinase II (HKII) est une enzyme

glycolytique clé qui joue un rôle dans la régulation de la mort cellulaire apoptotique déclenchée par les mitochondries. En tant qu'inhibiteur puissant de l'hexokinase, le 3-bromopyruvate (3-BrPA) est connu pour inhiber le métabolisme énergétique des cellules cancéreuses et déclencher la mort cellulaire, supposément par épuisement de l'ATP cellulaire. L'étude actuelle a montré que le 3-BrPA provoquait une modification covalente de la protéine HKII et déclenchait directement sa dissociation des mitochondries, conduisant à une libération spécifique du facteur induisant l'apoptose (AIF) des mitochondries vers le cytosol et éventuellement à la mort cellulaire. La co-immunoprécipitation a révélé une interaction physique entre HKII et AIF. En utilisant un peptide compétitif de HKII, nous avons montré que la dissociation de l'hexokinase II des mitochondries seule pouvait provoquer la mort cellulaire apoptotique, en particulier dans les cellules rho (0) déficientes en mitochondries qui expriment fortement HKII. Fait intéressant, la dissociation de HKII elle-même n'a pas affecté directement le potentiel de la membrane mitochondriale, la génération de ROS et la phosphorylation oxydative. L'association physique entre HKII et AIF est importante pour la localisation normale de l'AIF dans les mitochondries, et la perturbation de ce complexe protéique par le 3-BrPA conduit à leur libération des mitochondries et à la mort cellulaire éventuelle (**Chen et al., 2009**).

5.4 La thérapie virale oncolytique : utilisation de virus ciblant les tumeurs pour traiter le cancer

La virothérapie oncolytique est un traitement utilisant un virus qui peut se répliquer pour tuer les cellules cancéreuses. Il existe de nombreuses espèces de virus, mais toutes ne peuvent pas être conçues pour être un virus oncolytique (OV) ; Les caractéristiques typiques de ces VO doivent inclure le fait d'être non pathogènes, la capacité de cibler et de tuer les cellules cancéreuses, et la capacité d'être transformés pour exprimer des facteurs tueurs de tumeurs par des méthodes de génie génétique. La sélectivité tumorale pourrait être liée au niveau d'entrée cellulaire médiée par les récepteurs, aux réponses antivirales intracellulaires ou aux facteurs de restriction qui déterminent la susceptibilité de la cellule infectée qui conduit à l'expression et à la réplication du gène viral (**Cao et al., 2020**).

La thérapie OV repose sur un processus en deux parties consistant à infecter sélectivement les cellules tumorales, puis à induire une activité antitumorale par la

libération d'antigènes tumoraux et la stimulation immunitaire (**Cook and Chauhan, 2020**).

Les virus interagissent avec des récepteurs spécifiques de la surface cellulaire. Comme les cellules tumorales surexprimaient ces protéines par rapport aux cellules normales, le virus infectera probablement la cellule tumorale (**Xie and Zheng, 2019**).

Après liaison au récepteur de surface cellulaire, le virus est internalisé par endocytose ou fusion membranaire, libère son génome dans la cellule. La réplication et l'expression des gènes viraux varient selon le type de virus.

Elle peut avoir lieu entièrement dans le cytoplasme cellulaire (comme pour le virus de la stomatite vésiculeuse), ou dans le noyau et le cytoplasme (comme pour l'adénovirus). Dans les deux cas, l'expression des gènes viraux et la synthèse des protéines virales dépendent largement de la machinerie cellulaire. L'expression et la réplication des gènes viraux déclenchent des défenses antivirales cellulaires, telles que l'apoptose, qui est souvent inactivées dans les cellules tumorales. L'expression de protéines virales conduira éventuellement à une lyse à médiation immunitaire des cellules infectées. La lyse est dirigée par les cellules T CD8+, qui reconnaissent les épitopes peptidiques viraux qui sont présentés par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I à la surface de la cellule infectée. En outre, la lyse peut être déclenchée en raison d'une quantité écrasante de bourgeonnement et de libération de virions descendants de la surface cellulaire, ou par l'activation de l'apoptose au cours de la réplication virale et de l'expression génique (**Xie and Zheng, 2019**).

Partie



Expérimentale

Matériel et méthodes

Matériel et Méthodes

La partie pratique a été effectuée au niveau des trois laboratoires : Histologie, Immuno-histochimie et Biologie moléculaire, dirigé par Pr. Yassi Fatiha, au sein de centre anti-cancer (CAC) du centre hospitalo-universitaire 'CHU' « IBN ROCHD », Annaba.

Dans le cadre de notre thème PFE intitulé étude cellulaire et moléculaire d'un tissu cancéreux, il a été proposé par les cadres médicaux du CAC de choisir un type précis d'un cancer, de poursuivre les étapes de diagnostic, d'études histologiques, immunologiques et moléculaires ainsi que les perspectives thérapeutiques possibles. Afin d'atteindre l'objectif de notre travail et d'avoir le maximum de connaissances sur le cancer, le choix du tissu cancéreux était en faveur du cancer pulmonaire.

Toutes les techniques citées dans cette partie expérimentale sont décrites dans un protocole pratique employé par le personnel des laboratoires indiqués ci-dessus, il s'agit du même protocole utilisé par (TICEM, 2014).

1. Le registre d'Anapath

A l'issue de la chirurgie toute pièce opératoire extraite et envoyée d'emblée au service d'Anapath pour qu'elle soit analysée afin d'établir un diagnostic. On désigne par pièce opératoire tout ce qui est ablaté lors de la chirurgie (tumeur + tissus sains qui l'entourent, ganglions, etc...). Toutes les informations obtenues doivent être mentionnées dans le registre d'Anapath :

- Le numéro de prélèvement
- Le nom et prénom du patient
- L'âge
- Le service où les échantillons ont été prélevés
- Le type de prélèvement/le diagnostic
- Le nom du technicien et du maître assistant

2. L'étude cellulaire d'un tissu cancéreux

2.1 La fixation des échantillons

Tout échantillon ou organe doivent être fixés avec le formol aldéhyde (Figure 10) (8 L d'eau /1L de formol).

2.2 L'étude macroscopique

- C'est le médecin clinicien qui est appelé à fournir les renseignements nécessaires pour bien repérer les lésions. Dans les cas complexes le chirurgien adresse la pièce enlevée avec des indications de repérage topographique. L'encre de chine (Figure 11) est utilisée pour maquer les berges de la tumeur réséquée (Figure 12), ce dernier ne nuit pas à l'étude histologique mais permet de mesurer exactement la distance entre la tumeur et sa limite chirurgicale.
- L'examen macroscopique doit être bien détaillé car non seulement c'est une étape essentielle pour l'étude de la pièce opératoire qui est : examinée, mesurée, pesée, palpée puis disséquée mais aussi il donne des indications pour le pronostic de la maladie et permet de trancher les zones à prélever pour l'étude microscopique. Quant aux restes de la pièce opératoire, ils sont conservés pendant des jours ou des semaines dans le formol aldéhyde pour qu'ils soient réutilisés en cas de nécessité de prélèvements complémentaires.
- Après avoir disséqué la pièce opératoire, les échantillons sont mis dans des cassettes (Figure 13) qui sont identifiées par le numéro de prélèvement avec un crayon. Ces dernières sont plongées durant 18h dans un automate de déshydratation de tissus (Figure 14) qui dispose de douze stations : 1 bac de formol, 7 bacs d'éthanol 100%, 2 bacs de xylène et 2 bacs de paraffine. Le contenu change de station chaque 1h30.



Figure 10 : La pièce opératoire après fixation avec le formol (TICEM, 2014).

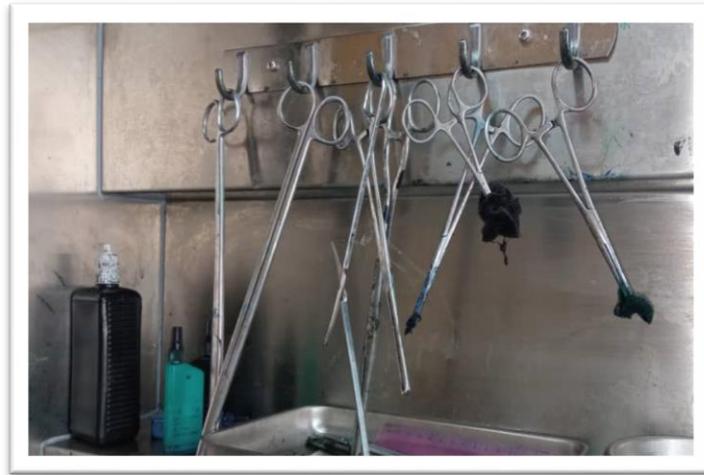


Figure 11 : Les outils utilisés pour le marquage.



Figure 12 : Le marquage de la pièce opératoire avec l'encre de chine (TICEM, 2014).



Figure 13 : Les cassettes d'inclusion.



Figure 14 : L'automate de déshydratation de tissus.

2.3 L'histologie

2.3.1 L'imprégnation et l'inclusion

Après traitement des tissus, les échantillons sont inclus et bien entassés au fond des moules (Figure 15), celles-ci sont remplies avec de la paraffine liquide à l'aide d'un appareil d'inclusion (Figure 16), ensuite recouvertes avec des cassettes de façon à ce que l'échantillon soit confiné entre le moule et la cassette, après on les laisse refroidir (Figure 17).

L'inclusion consiste à réorienter convenablement le fragment tissulaire dans le sens de la coupe.



Figure 15 : Les moules à inclusion.



Figure 16 : Le remplissage des moules par la paraffine liquide.



Figure 17 : Le refroidissement des moules.

2.3.2 Le dégrossissement

Cette étape se fait par l'enlèvement de l'excès de la paraffine.

2.3.3 La coupe

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome (Figure 18), on obtient des rubans de 3 à 5 microns d'épaisseur, on trempe ces derniers dans l'eau et on les récupère avec une lame, après avoir bien positionné le ruban, on laisse la lame sécher (Figure 19).

On écrit la référence sur la lame avec un crayon diamant.



Figure 18 : Le microtome.



Figure 19 : Le séchage des lames.

2.3.4 Le déparaffinage

Les lames sont mises dans des porte lames puis introduites dans l'étuve à 120° pendant 30 minutes (on rajoute du temps si on baisse la température).

2.3.5 La coloration

Après le déparaffinage, les lames sont déposées dans le porte lames et le tissu est coloré (Figure 20) selon ces différentes étapes :

- 1- Xylène → 2 bacs/5minutes pour chaque bac
- 2- Alcool → 2 bacs/5minutes pour chaque bac
- 3- L'eau du robinet → 5 minutes
- 4- Emallume Mayer → 5 minutes
- 5- Rinçage avec l'eau du robinet
- 6- Eosine → 5 minutes



Figure 20 : La coloration manuelle des lames.

2.4 La cytologie

2.4.1 En cas de prélèvement liquide et de cytoponction

Dans le cas de cytoponction : après l'enregistrement des informations, le prélèvement se fait à l'aide d'une pipette puis versé dans un tube qui sera ensuite mis dans la centrifugeuse, on obtient un culot qu'on étale directement sur la lame et on la laisse se sécher, la coloration est appliquée 24H après.

2.4.2 La coloration

- 1- Emallume pendant 3 minutes
- 2- Rinçage
- 3- Eosine pendant 3 minutes
- 4- Rinçage
- 5- Passage alcool dans deux bains
- 6- Un bain (mélange entre xylène et acétone)
- 7- Passage xylène

2.5 Le montage

Sous la hotte, on trempe la lame dans le xylène, puis on la colle avec la lamelle avec 'Eukitt' (Figure 21).



Figure 21 : Le montage des lames avec l'Eukitt.

2.6 Le rangement des lames

Ranger les lames avec les bords selon le matricule dans le cahier de partage pour donner les résultats aux patients. A l'intérieur on écrit le nom du médecin et le matricule.

2.7 L'observation

Avec le microscope, le médecin observe les lames et précise l'endroit, là où se trouve la tumeur (si elle existe).

3. L'immuno-histochimie

L'immunohistochimie à visée diagnostique et la recherche moléculaire à visée thérapeutique.

Les lames sont étiquetées avec l'ordinateur, puis mises dans l'étuve à 80°C pendant une nuit.

Elles doivent être silanisées (de charge positive) pour capter les anticorps.

- La machine utilisée : Ventana Ultra (Figure 22).



Figure 22 : Ventana Ultra.

30 chambres de réaction de lame permettent des protocoles indépendants pour chaque lame individuelle et des réactifs optimisés prêts à l'emploi, avec 7 réactifs ou kits de détection (Figure 23) : Bluing Reagent, Hematoxyllin I, Inhibitor, HRP Multimer, chromogen, H₂O₂, Copper. Les anticorps sont choisis par le médecin et rajoutés par le laborantin, pour le cas d'adénocarcinome les anticorps utilisés selon le cas du patient sont :

- TTF1
- CK7 et CK20
- EGFR : recherche de mutation EGFR (étude moléculaire).
- PDL1 : afin de mettre en évidence l'expression de l'anticorps anti PD-L1.
- ALK : afin de mettre en évidence l'expression de l'anticorps anti- ALK et pour compléter par une technique FISH si nécessaire.
- Braf



Figure 23 : Les kits de détection.

4. L'étude moléculaire d'un tissu cancéreux

Les différentes étapes utilisées dans le protocole ci-dessous sont extraites de (Carey, 2015).

4.1 Les instructions d'utilisation

- Seules des sections de tissus FFPE de CPNPC de 5 μm d'épaisseur contenant au moins 10 % de contenu tumoral, peuvent être utilisées dans le test cobas EGFR. Tout échantillon contenant moins de 10 % de contenu tumoral devra subir une macrodissection après la déparaffination. Les blocs à chaleur sèche permettant de chauffer les tubes de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable doivent être allumés et réglés à 56 °C et à 90 °C.
- On se réfère au manuel de l'instrument du cobas z 480 analyzer pour des instructions d'utilisation détaillées concernant le cobas z 480 analyzer.

- **La taille des cycles**

Un cycle peut contenir de 1 à 30 échantillons (plus les contrôles) par plaque de 96 micropuits. Pour des cycles contenant plus de 24 échantillons, plusieurs kits de test cobas EGFR seront nécessaires. Le test cobas EGFR contient suffisamment de réactifs pour 8 cycles de 3 échantillons (plus les contrôles) maximum de 24 échantillons par kit.

- **La préparation des réactifs** (Figure 24)

Avant la première utilisation du kit, préparer les réactifs actifs comme indiqué dans le tableau ci-dessous. Utiliser une pipette sérologique de 5 mL pour distribuer l'eau. Utiliser des pipettes sérologiques de 25 mL pour distribuer l'éthanol.

Si la protéinase K a déjà été reconstituée et congelée, décongeler un nombre suffisant d'aliquots pour traiter le nombre d'échantillons à analyser.

Tableau 01 : La préparation des réactifs.

Réactif	Reconstitution/Préparation
Protéinase K (PK)	Reconstituer la protéinase k (PK) en ajoutant 4.5 mL d'eau stérile sans nucléase (de qualité PCR) au flacon à l'aide d'une pipette sérologique jetable et stérile de 5 mL. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Aliquoter 450 µl de PK reconstituée dans des tubes de microcentrifugeuse a couvercle verrouillable de 21.5mL et conserver a -20 C° pendant 90 jours maximum ou jusqu'à la date d'expiration, selon celle qui survient en premier, si la protéinase K a déjà été reconstituée et congelée, décongeler un nombre suffisant d'aliquots pour traiter le nombre d'échantillons à analyser avant la déparaffination (il faut 70 µL de PK reconstituée pour chaque échantillon).
Tampon de lavage I (WB I)	Préparer le tampon WB I actif en ajoutant 15 mL d'éthanol absolu au flacon de WB I. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon WB I actif entre 15° C et 30° C pendant 90 jours maximum ou jusqu'à la date d'expiration, selon celle qui survient en premier.
Tampon de lavage II (WB II)	Préparer le tampon WB II actif en ajoutant 50 mL d'éthanol absolu au flacon de WB II. Mélanger en retournant le flacon 5 à 10 fois. Noter sur le flacon que l'éthanol a été ajouté, avec la date. Conserver le tampon WB II actif entre 10° C et 30° C pendant 90 jours maximum ou jusqu'à la date d'expiration, selon celle qui survient en premier.

Toutes les solutions conservées entre 15 °C et 30 °C doivent être claires. En présence d'un précipité dans l'un des réactifs, chauffer la solution dans un bain-marie à 37 °C jusqu'à dissolution du précipité. Ne pas utiliser tant que tous les précipités ne sont pas dissous.

- **La déparaffination des sections de tissus FFPE montées sur lames**

- Toutes les étapes de la déparaffination doivent être effectuées sous une hotte chimique à cause du xylène qui est un produit chimique dangereux.

- 1- Ajouter une lame sur laquelle est montée une section de tissus FFPE de 5 µm dans un récipient contenant une quantité suffisante de xylène pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.
- 2- Transférer la lame vers le récipient avec une quantité d'éthanol absolu suffisante pour recouvrir le tissu et laisser tremper pendant 5 minutes.
- 3- Retirer la lame de l'éthanol et laisser la section sécher complètement à l'air (de 5 à 10 minutes).
- 4- Effectuer une macro-dissection si l'échantillon contient moins de 10 % de contenu tumoral.
- 5- Étiqueter un tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL pour chaque échantillon, avec les informations d'identification de l'échantillon.
- 6- Ajouter 180 µL de DNA TLB dans le tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL étiqueté.
- 7- Ajouter 70 µL de PK reconstituée dans le tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable contenant du DNA TLB.
- 8- Racler le tissu pour le retirer de la lame dans le tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable. Immerger le tissu dans le mélange DNA TLB/PK.
- 9- Continuer avec l'étape 1 de la procédure d'extraction de l'ADN.

- **La déparaffination des sections de tissus FFPE non montées sur lames**

- 1- Placer une section de tissus FFPE de 5 µm dans un tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL (Figure 25), étiqueté avec les informations d'identification d'échantillon pour chaque échantillon.
- 2- Ajouter 500 µL de xylène à un tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable contenant la section de tissus FFPE.
- 3- Bien mélanger au vortex pendant 10 secondes.

- 4- Laisser le tube reposer pendant 5 minutes à une température comprise entre 15 °C et 30 °C.
- 5- Ajouter 500 µL d'éthanol absolu et mélanger au vortex pendant 10 secondes.
- 6- Laisser le tube reposer pendant 5 minutes à une température comprise entre 15 °C et 30 °C.
- 7- Centrifuger entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 2 minutes. Retirer le surnageant sans disperser le culot. Mettre le surnageant au rebut avec les déchets chimiques.
- 8- Ajouter 1 mL d'éthanol absolu et passer au vortex pendant 10 secondes.
- 9- Centrifuger entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 2 minutes. Retirer le surnageant sans disperser le culot. Mettre le surnageant au rebut avec les déchets chimiques.
- 10- Si le culot flotte dans le surnageant restant, centrifuger à nouveau pendant 1 minute entre 16 000 x g et 20 000 x g. Retirer tout surnageant restant.
- 11- Sécher le culot tissulaire pendant 10 minutes à 56 °C dans un bloc chauffant, les tubes étant ouverts.
- 12- S'assurer que l'éthanol s'est complètement évaporé et que le culot est sec avant de passer à l'étape suivante.
- 13- Si nécessaire, les culots séchés peuvent être conservés 24 heures à une température comprise entre 2 °C et 8 °C.
 - 14- Remettre le culot tissulaire en suspension dans 180 µL de DNA TLB.
 - 15- Ajouter 70 µL de PK reconstituée.
 - 16- Continuer avec l'étape 1 de la procédure d'extraction de l'ADN.



Figure 24 : Les kits de préparation d'échantillon d'ADN.



Figure 25 : Le ruban dans le tube de microcentrifugeuse.

4.2 La procédure d'extraction de l'ADN

- 1- Préparer le contrôle négatif en combinant 180 μ L de DNA TLB et 70 μ L de solution PK dans un tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL étiqueté NEG. Le contrôle négatif doit être traité selon la même procédure que pour les échantillons.
 - 2- Agiter au vortex des tubes contenant le mélange échantillon/DNA TLB/PK et le mélange de contrôle négatif (NEG) pendant 30 secondes. Le tissu doit être totalement immergé dans le mélange DNA TLB/PK.
 - 3- Placer les tubes dans le bloc chauffant à sec à 56 °C et incuber pendant 60 minutes.
 - 4- Passer les tubes au vortex pendant 10 secondes.
 - 5- Placer les tubes dans le bloc chauffant à sec à 90 °C et incuber pendant 60 minutes.
- Pendant l'incubation, préparer le nombre nécessaire de tubes de filtration (FT) avec bouchon à charnière en les plaçant sur les tubes de prélèvement (CT) et en étiquetant chaque bouchon FT avec les informations correctes d'identification d'échantillon ou de contrôle. Chaque échantillon nécessite 1 FT, 4 CT et 1 tube d'éluion (tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL). Pendant l'incubation, étiqueter le nombre nécessaire de tubes d'éluion (tubes de microcentrifugeuse de 1,5 mL) avec les informations d'identification adéquates d'échantillon ou de contrôle.

- 6- Laisser les tubes refroidir à une température comprise entre 15 °C et 30 °C. Après refroidissement, centrifuger les tubes par vortex pour recueillir tout éventuel liquide provenant des bouchons.
- 7- Ajouter 200 µL de DNA PBB dans chaque tube et mélanger le lysant en pipetant et en rejetant 3 fois.
- 8- Incuber les tubes à une température comprise entre 15 °C et 30 °C pendant 10 minutes.
- 9- Ajouter 100 µL d'isopropanol à chaque tube et mélanger le lysat en pipetant et en rejetant 3 fois.
- 10- Transférer chaque lysat dans l'unité FT/CT correctement étiquetée.
- 11- Centrifuger les unités FT/CT à 8 000 x g pendant 1 minute.
- 12- Placer chaque tube FT sur un nouveau tube CT. Jeter la fraction contenue dans l'ancien tube CT avec les déchets chimiques et mettre au rebut Le tube CT utilisé de façon appropriée.
- 13- Ajouter 500 µL de WB I actif à chaque tube FT.
- 14- Centrifuger les unités FT/CT à 8 000 x g pendant 1 minute.
- 15- Jeter la fraction contenue dans chaque CT avec les déchets chimiques. Replacer le FT sur le même.
- 16- Ajouter 500 µL de WB II actif à chaque tube FT.
- 17- Centrifuger les unités FT/CT à 8 000 x g pendant 1 minute.
- 18- Placer chaque tube FT sur un nouveau tube CT. Jeter la fraction contenue dans l'ancien tube CT avec les déchets chimiques et mettre au rebut le tube CT utilisé de façon appropriée.
- 19- Centrifuger les unités FT/CT entre 16 000 x g et 20 000 x g pendant 1 minute afin de sécher les membranes des filtres.
- 20- Placer chaque FT dans un tube d'élution (tube de microcentrifugeuse de 1,5 mL) pré-étiqueté avec les informations correctes d'identification d'échantillon ou de contrôle. Jeter la fraction contenue dans le CT utilisé avec les déchets chimiques et mettre au rebut le tube CT utilisé de façon appropriée.
- 21- Ajouter 100 µL de DNA EB au centre de la membrane de chaque FT, sans toucher la membrane du FT.
- 22- Incuber le FT avec le tube d'élution à une température comprise entre 15 °C et 30 °C pendant 5 minutes.

- 23- Centrifuger le FT avec le tube d'éluotion à 8 000 x g pendant 1 minute pour recueillir l'éluât dans le tube d'éluotion. Mettre au rebut le FT utilisé de façon appropriée.
- 24- Fermer les bouchons des tubes d'éluotion. Le tube d'éluotion contient Le stock d'ADN. Passer à l'étape 1 de la section « Quantification de l'ADN ».

4.3 La quantification de l'ADN

La mesure de la concentration de l'ADN doit être effectuée immédiatement après la procédure d'extraction de l'ADN et avant la conservation (Figure 26).

- 1- Mélanger chaque tube de stock d'ADN en l'agitant au vortex pendant 5 secondes.
- 2- Quantifier l'ADN à l'aide d'un spectrophotomètre conformément au protocole indiqué par le fabricant. Utiliser DNA EB comme blanc pour l'instrument. Il convient d'effectuer une moyenne à partir de 2 valeurs cohérentes. Les deux mesures ne doivent pas différer de plus de $\pm 10\%$ l'une par rapport à l'autre lorsque les lectures de concentration d'ADN sont $\geq 20,0$ ng/ μ L. Pour des lectures de concentration d'ADN $< 20,0$ ng/ μ L, les deux mesures ne doivent pas différer de plus de ± 2 ng/ μ L. Si les deux mesures diffèrent de plus de $\pm 10\%$ l'une par rapport à l'autre lorsque les lectures de concentration d'ADN sont $\geq 20,0$ ng/ μ L ou de plus de ± 2 ng/ μ L lorsque les lectures de concentration d'ADN sont $< 20,0$ ng/ μ L, 2 autres lectures doivent être effectuées jusqu'à ce que cette exigence soit remplie. Il faut alors calculer la moyenne de ces deux nouvelles mesures.
- 3- La concentration du stock d'ADN des échantillons doit être ≥ 2 ng/ μ L pour effectuer le test cobas EGFR. Trois amplifications/détections sont effectuées par échantillon, avec 25 μ L d'une dilution à 2 ng/ μ L du stock d'ADN (au total 50 ng d'ADN) par amplification/détection.
 - Chaque stock d'ADN doit avoir une concentration minimale de 2 ng/ μ L pour que le test cobas EGFR puisse être effectué. Si la concentration d'un stock d'ADN est < 2 ng/ μ L, répéter les procédures de déparaffination, d'extraction de l'ADN et de quantification de l'ADN pour cet échantillon à l'aide de deux sections de tissus FFPE de 5 μ m. Pour les échantillons montés, après la déparaffination, combiner le tissu des deux sections dans un tube, plonger le tissu dans le DNA TLB + PK, et effectuer l'extraction et la quantification de l'ADN comme indiqué plus haut. Pour les échantillons non montés, combiner les deux sections dans un tube et plonger le tissu dans le DNA TLB + PK, puis effectuer l'extraction et la quantification de l'ADN comme indiqué plus haut. Si la

concentration du stock d'ADN est toujours $< 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$, demander une autre section de l'échantillon de tissus FFPE au site clinique de référence.

- Les échantillons traités (ADN extrait) sont stables pendant une durée maximale de 24 heures à une température comprise entre $15 \text{ }^\circ\text{C}$ et $30 \text{ }^\circ\text{C}$, jusqu'à 14 jours entre $2 \text{ }^\circ\text{C}$ et $8 \text{ }^\circ\text{C}$, jusqu'à 60 jours entre $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ et $-25 \text{ }^\circ\text{C}$ ou, après avoir subi 3 cycles de congélation/décongélation, entre $-15 \text{ }^\circ\text{C}$ et $-25 \text{ }^\circ\text{C}$. L'ADN extrait doit être amplifié pendant les périodes de conservation recommandées ou avant la date de péremption du kit de préparation des échantillons d'ADN cobas utilisé pour extraire l'ADN, selon la première date limite atteinte.

4.4 L'amplification et la détection

La zone de travail d'amplification et de détection doit être soigneusement nettoyée avant d'effectuer la préparation du MMX actif. Pour un nettoyage adéquat, toutes les surfaces, y compris les portoirs et les pipettes, doivent être essuyées avec une solution d'hypochlorite de sodium à 0,5 %, suivi d'un essuyage avec une solution d'éthanol à 70 %. L'eau de Javel domestique liquide disponible dans le commerce contient généralement de l'hypochlorite de sodium à la concentration de 5,25 %. Une dilution à 1:10 d'eau de Javel domestique permet d'obtenir une solution à 0,5 % d'hypochlorite de sodium. L'amplification et la détection doivent être effectuées dans une zone séparée de celle de l'extraction de l'ADN.

- **La configuration de la réaction**

- **La préparation des masters mix actifs (MMX-1, MMX-2 et MMX-3 v2)**

- 1- Préparer trois MMX actifs, l'un avec le réactif EGFR MMX-1, l'autre avec le réactif EGFR MMX-2 et le dernier avec le réactif EGFR MMX-3 v2 dans des tubes de microcentrifugeuse à couvercle verrouillé séparés de 1,5 mL.
- 2- Calculer le volume d'EGFR MMX-1, d'EGFR MMX-2 ou d'EGFR MMX-3 v2 nécessaire pour chaque MMX actif à l'aide de la formule suivante :

Volume d'EGFR MMX-1, d'EGFR MMX-2 ou d'EGFR MMX-3 v2 nécessaire
= (Nombre d'échantillons + 2 contrôles + 1) x 20 μL

- 3- Calculer le volume de MGAC nécessaire pour chaque MMX actif à l'aide de la formule suivante :

Volume de MGAC nécessaire = (Nombre d'échantillons + 2 contrôles + 1) x 5 μL

Utiliser le Tableau 2 pour déterminer le volume de chaque réactif nécessaire pour la préparation du MMX actif en fonction du nombre d'échantillons inclus dans le cycle.



Figure 26 : La mesure de la concentration d'ADN.

Tableau 02 : Les volumes de réactifs nécessaires pour les masters mix MMX-1, MMX-2 et MMX-3 v2 actifs.

		Nb d'échantillons									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
MMX	20 μ L	80	100	120	140	160	180	200	220	240	260
MGAC	5 μ L	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65
Vol total pour chaque MMX actif (μ L)		100	125	150	175	200	225	250	275	300	325

Les volumes pour le nombre d'échantillons sont basés sur la somme des échantillons + 2 contrôles + 1.

- 4- Retirer le nombre approprié de flacons d'EGFR MMX-1, EGFR MMX-2, EGFR MMX-3 v2 et de MGAC conservés à une température comprise entre 2 °C et 8 °C. Passer chaque réactif au vortex pendant 5 secondes afin de recueillir le liquide au fond du tube avant utilisation. Étiqueter un tube de microcentrifugeuse stérile pour les MMX actifs MMX-1, MMX-2 et MMX-3 v2.
- 5- Ajouter le volume calculé d'EGFR MMX-1, d'EGFR MMX-2 ou d'EGFR MMX-3 v2 à son tube de MMX actif respectif.

- 6- Ajouter le volume calculé de MGAC aux tubes de MMX actif.
- 7- Agiter les tubes au vortex pendant 3 à 5 secondes afin d'assurer un mélange adéquat.
- Les échantillons et les contrôles doivent être ajoutés à la plaque AD dans un délai d'1 heure après la préparation des MMX actifs.
- Utiliser uniquement la plaque AD du cobas* 4800 System et le film d'étanchéité.

4.5 Le calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon

Calcul de la dilution du stock d'ADN à des concentrations comprises entre 2 ng/μL et 36 ng/μL.

- Les stocks d'ADN des échantillons doivent être dilués immédiatement avant l'amplification et la détection.
- Trois amplifications/détections sont effectuées pour chaque échantillon, nécessitant un volume total de 75μL (25 μL pour chacune des trois réactions) d'une dilution du stock d'ADN de 2 ng/μL (total de 150 ng d'ADN).

1- Pour chaque échantillon calculer le volume (μL) du stock d'ADN nécessaire :
 $\mu\text{L de stock d'ADN} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{concentration du stock d'ADN [ng}/\mu\text{L}]$.

2- Pour chaque échantillon, calculer le volume (μL) de DNA SD nécessaire :
 $\mu\text{L de DNA SD} = 90 \mu\text{L} - \mu\text{L de stock d'ADN}$.

Exemple: Concentration du stock d'ADN = 6,5 ng/μL

- 1- $\mu\text{L du stock d'ADN} = (90 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div 6.5 \text{ ng}/\mu\text{L} = 27,7 \mu\text{L}$
- 2- $\mu\text{L de DNA SD} = (90 \mu\text{L} - 27,7 \mu\text{L}) = 62,3 \mu\text{L}$

- **Le calcul de la dilution du stock d'ADN à des concentrations > 36 ng/μL**
 - Les stocks d'ADN des échantillons doivent être dilués immédiatement avant l'amplification et la détection.
 - Trois amplifications/détections sont effectuées pour chaque échantillon, nécessitant un volume total de 75 μL (25 μL pour chacune des trois réactions) d'une dilution du stock d'ADN de 2 ng/ μL (total de 150 ng d'ADN).
- 1- Si les concentrations de stock d'ADN sont > 36 ng/ μL, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de DNA SD nécessaire pour préparer au moins 90 μL de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μL de stock d'ADN.

- 2- Pour chaque échantillon, calculer le volume (μL) de DNA SD nécessaire pour diluer 5 μL de stock d'ADN à 2 ng/ μL :

Vol de DNA SD nécessaire en μL = [(5 μL de stock d'ADN x concentrations de stock d'ADN en ng/ μL) / (2 ng/ μL)] - 5 μL

Exemple : Concentration de stock d'ADN = 100 ng/ μL

- 1- Vol. de DNA SD nécessaire en μL = [(5 μL x 100 ng/ μL) / 2 ng/ μL] - 5 μL = 245 μL
- 2- Utiliser le volume calculé de DNA SD pour diluer 5 μL de stock d'ADN.

- **La dilution d'échantillon :**

- 1- Préparer le nombre approprié de tubes de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable de 1,5 mL pour les dilutions d'ADN en les étiquetant avec les informations d'identification d'échantillon appropriées.
- 2- À l'aide d'une pipette dotée d'un embout avec filtre de protection contre les aérosols, pipeter les volumes calculés de DNA SD dans les tubes d'échantillon étiquetés respectifs. Pipeter 45 μL de DNA SD dans un tube de microcentrifugeuse à couvercle verrouillable étiqueté avec l'identification NEG.
- 3- Mélanger au vortex chaque stock d'ADN et le contrôle négatif pendant 5 à 10 secondes.
- 4- À l'aide d'une pipette dotée d'un embout de pipetage avec filtre de protection contre les aérosols (nouvel embout pour chaque pipetage), pipeter délicatement le volume calculé de chaque stock d'ADN d'échantillon dans le tube respectif contenant le DNA SD. Pipeter 45 μL de contrôle négatif (éluat extrait) dans le tube NEG.
- 5- Fermer les tubes et les agiter au vortex pendant 5 à 10 secondes.
- 6- Changer de gants.

- **La configuration de l'instrument**

Se référer au manuel de l'instrument du cobas z 480 analyzer pour des instructions détaillées sur la configuration du cobas z 480 analyzer.

- **La préparation de la demande de test :**

Générer une carte des plaques avec les positions de tous les échantillons et contrôles dans le cycle. Dans un cycle avec échantillons de tissu uniquement, le contrôle mutant est chargé dans les positions A01 à A03 sur la plaque (Figure 27). Le contrôle négatif est chargé

dans les positions B01 à B03 sur la plaque. Les échantillons dilués sont ensuite ajoutés en ensembles de 3 colonnes, à partir de C01-C03 jusqu'à H10-H12 (Tableau 03).

Le test cobas EGFR peut être exécuté en mode de test mixte (par exemple, tissu EGFR avec plasma EGFR). Les positions de contrôle peuvent varier en fonction des tests choisis et des numéros d'échantillons. Se référer au manuel d'utilisation du logiciel du cobas* EGFR Mutation Test v2 ou à l'Assistance Utilisateur du cobas* 4800 System pour obtenir des informations plus détaillées sur la configuration d'un cycle de test mixte.

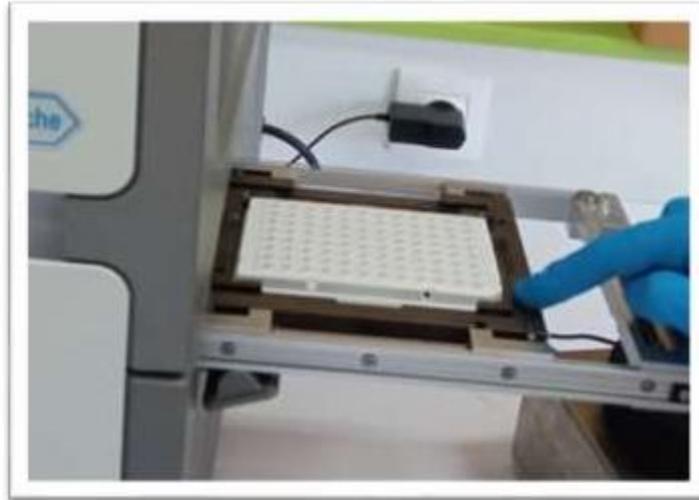


Figure 27 : La plaque de test cobas EGFR.

Tableau 03 : Le plan de plaque pour le test cobas EGFR.

Ligne/ Colonne	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
A	MC MMX1	MC MMX2	MC MMX3	S7 MMX1	S7 MMX2	S7 MMX3	S15 MMX1	S15 MMX2	S15 MMX3	S23 MMX1	S23 MMX2	S23 MMX3
B	NEG MMX1	NEG MMX2	NEG MMX3	S8 MMX1	S8 MMX2	S8 MMX3	S16 MMX1	S16 MMX2	S16 MMX3	S24 MMX1	S24 MMX2	S24 MMX3
C	S1 MMX1	S1 MMX2	S1 MMX3	S9 MMX1	S9 MMX2	S9 MMX3	S17 MMX1	S17 MMX2	S17 MMX3	S25 MMX1	S25 MMX2	S25 MMX3
D	S2 MMX1	S2 MMX2	S2 MMX3	S10 MMX1	S10 MMX2	S10 MMX3	S18 MMX1	S18 MMX2	S18 MMX3	S26 MMX1	S26 MMX2	S26 MMX3
E	S3 MMX1	S3 MMX2	S3 MMX3	S11 MMX1	S11 MMX2	S11 MMX3	S19 MMX1	S19 MMX2	S19 MMX3	S27 MMX1	S27 MMX2	S27 MMX3
F	S4 MMX1	S4 MMX2	S4 MMX3	S12 MMX1	S12 MMX2	S12 MMX3	S20 MMX1	S20 MMX2	S20 MMX3	S28 MMX1	S28 MMX2	S28 MMX3
G	S5 MMX1	S5 MMX2	S5 MMX3	S13 MMX1	S13 MMX2	S13 MMX3	S21 MMX1	S21 MMX2	S21 MMX3	S29 MMX1	S29 MMX2	S29 MMX3
H	S6 MMX1	S6 MMX2	S6 MMX3	S14 MMX1	S14 MMX2	S14 MMX3	S22 MMX1	S22 MMX2	S22 MMX3	S30 MMX1	S30 MMX2	S30 MMX3

Ou MC=Mutant Control (contrôle mutant), NEG = Négative Control (contrôle négatif), S#= sample ID (ID d'échantillon) et MMX # correspond au master mix 1, 2 Ou 3.

Résultats et

Discussion.



1. Résultats

1.1 L'aspect histologique

Le diagnostic anatomopathologique permet de confirmer la présence ou non d'un cancer dans le tissu, la classification histologique, et la stadification pronostique en fonction de la quantité de cancer présente.

Les résultats obtenus des trois lames choisis d'un tissu pulmonaire pour l'étude sont lus et décrites par Pr. Echaoui Nadia de centre Anti-cancer (CAC) du centre hospitalo-universitaire CHU, « IBN ROCHD » Annaba montrent :

- Un adénocarcinome pulmonaire avec un processus adénocarcinomateux (Figure 28) et des alvéoles normales (Figure 29).
- Un adénocarcinome papillaire pulmonaire (Figure 30) qui présente des saillies en forme doigt de gant avec des cellules atypiques et une cavité entourée d'un épithélium aplati.
- Un adénocarcinome broncho-pulmonaire avec envahissement du cartilage bronchique par le processus adénocarcinomateux.

Ces observations sont en faveur de diagnostiquer des adénocarcinomes non à petites cellules métastasiques.

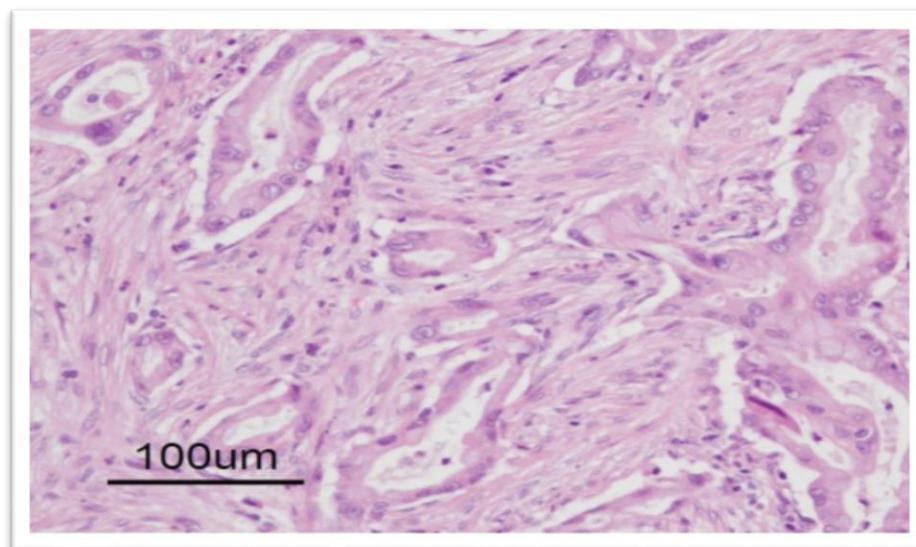


Figure 28 : L'adénocarcinome pulmonaire (Couture, 2011).

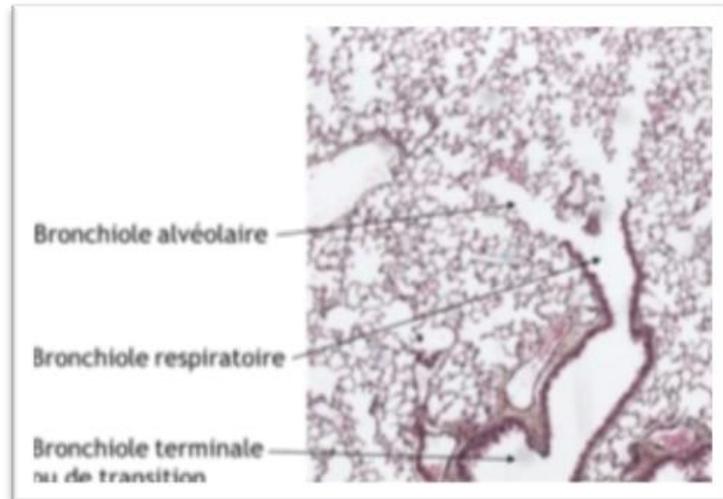


Figure 29 : Les alvéoles normales (Lavigne, 2017).

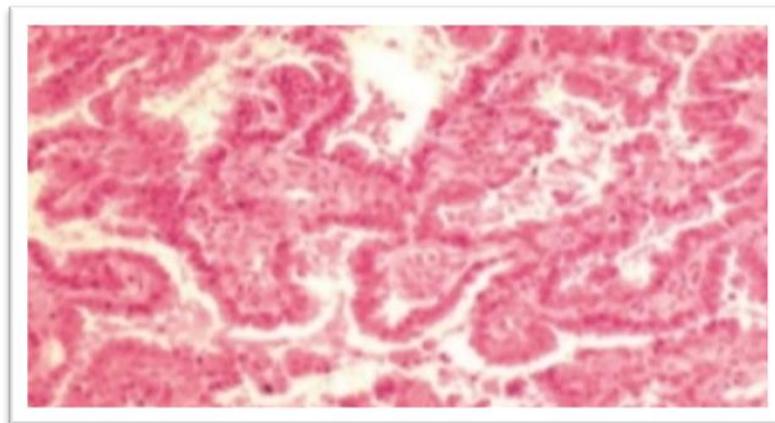


Figure 30 : L'adénocarcinome papillaire (Safia and Sabrina, 2019).

1.2 L'immuno-histochimie

Chaque type de cellule présente des marqueurs spécifiques qui la caractérisent et qui sont liés au degré de maturation.

La présence du marquage détermine l'origine primitive des métastases, par contre son absence nous oriente vers une autre origine (secondaire).

Dans les cas étudiés dans ce travail, les anticorps suivants qui caractérisent le poumon ont été utilisés:

La lecture des lames montre une fixation des trois marqueurs utilisés, CK7 au niveau membranaire et cytoplasmique (Figure 31), le TTF1 au niveau nucléaire (Figure 32) et la

protéinase napsine A au niveau cytoplasmique (Figure 33), ce qui nous permet de confirmer que l'origine de l'adénocarcinome non à petites cellule est pulmonaire et métastatique.

Cette confirmation est insuffisante pour appliquer la thérapie ciblée car il manque un dernier critère qui est la mutation du gène EGFR.

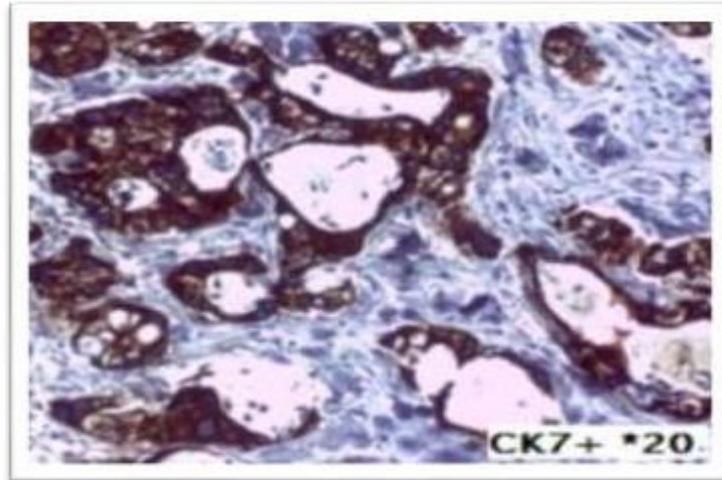


Figure 31: Le marquage avec CK7 (BOUKIS, 2016a).

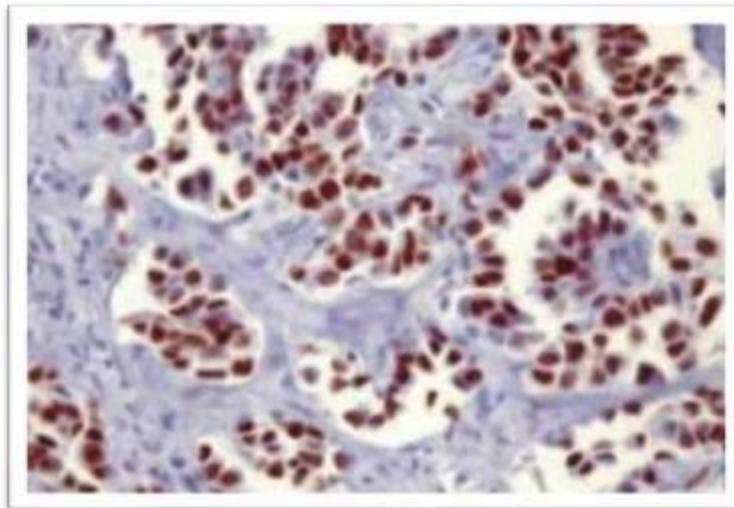


Figure 32: Le marquage avec TTF1 (BOUKIS, 2016b).

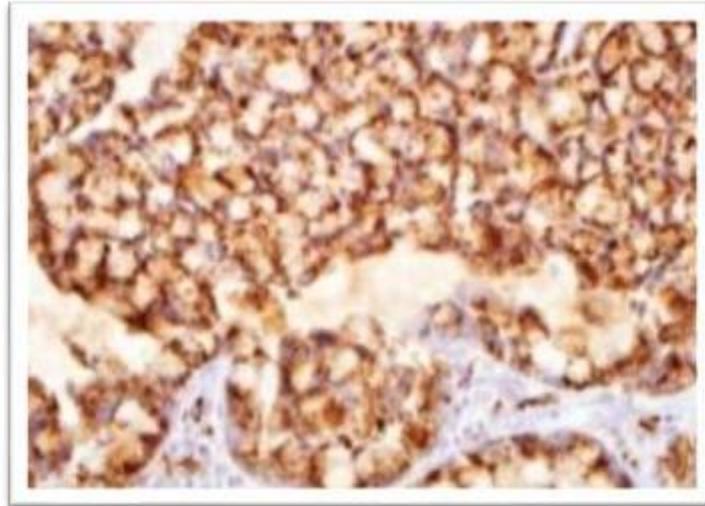


Figure 33: Le marquage avec la protéinase Napsine.A. (BOUKIS, 2016b).

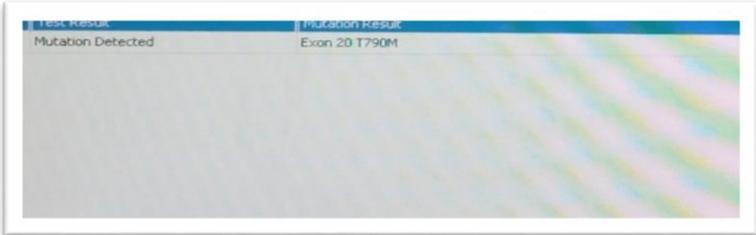
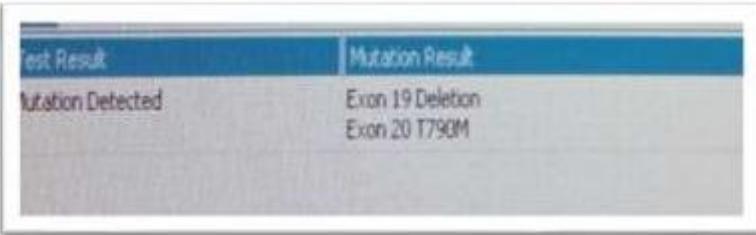
1.3 La biologie moléculaire

Après test EGFR :

Les résultats de l'étude moléculaire des lames choisis pour l'étude sont les suivantes :

On peut déduire de ces résultats que le cancer pulmonaire primitif peut être d'origine moléculaire (mutation) comme dans le cas des lames 2 et 3 comme il peut ne pas l'être comme présenté dans la lame 1.

Tableau 04 : Les résultats après test EGFR.

Lame 1	Pas de mutation		Pas de thérapie ciblée
Lame 2	Une mutation détectée au niveau de l'exon 20 T790M		Thérapie ciblée avec l'anti-EGFR
Lame 3	Deux mutations ont été détectées délétion de l'exon 19/ exon 20 T790M		Thérapie ciblée avec l'anti-EGFR

2. Discussion

Les résultats histologiques faisant l'objet de notre étude ont montré la prédominance des adénocarcinomes non à petites cellules 100%, ces résultats sont en accord avec les travaux de **Nouar et Krid en 2014**, dans leurs travaux sur le cancer pulmonaire dans l'est algérien, montrant que l'adénocarcinome est le type histologique prépondérant avec un pourcentage de 61%. L'étude histologique et cellulaire faite a aussi présenté que l'adénocarcinome diagnostiqué est en stade métastatique. Des résultats similaires ont été également mentionnés dans l'étude de **Amimer et Djouat en 2019** qui suggéraient une prédominance de stade clinique métastatique chez les patients atteints du cancer pulmonaire à l'hôpital Beni Messous à Alger à 74% des cas étudiés.

L'immuno-marquage anti TTF positif obtenu dans les lames étudiés montre une coloration marron intense dans les noyaux ce qui indique qu'il s'agit d'un cancer primitif et non pas secondaire comme signalé également dans les travaux de **Amimer et Djouat en 2019**. Le marquage à TTF1 marque 20 à 80% des adénocarcinomes non à petites cellules (**BOUKIS, 2016b**).

La positivité du marquage avec cytokératine (CK) est un argument fort en faveur du diagnostic de l'adénocarcinome ce qui est le cas dans les lames faisant l'objet de notre étude, pourtant le lien « CK-Adénocarcinome » n'est pas absolu, on peut observer des faux négatifs et des faux positifs (**BOUKIS, 2016b; Martin, 2016**).

Dans les lames objet de nos résultats 75% (2/3) présentaient une mutation de EGFR délétion de l'exon 19, 33% présentaient des mutations à l'exon 20 T790M et 33% ne présentaient pas de mutations. Les altérations géniques EGFR, ALK et plus récemment ROS1 associées à la prescription de thérapies ciblées, ne sont retrouvées presque exclusivement que dans les adénocarcinomes ce qui concorde bien au diagnostic déduit à travers le marquage des lames étudiés. Il existe deux grandes classes de thérapies ciblées inhibant l'EGFR : les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de tyrosine kinase (**MANSUET-LUPO, 2014**). Toutes les mutations EGFR ne confèrent pas la même sensibilité aux ITK anti-EGFR. Les délétions de l'exon 19, les mutations ponctuelles de l'exon 21 (p.L858R, p.861Q et p.L861R) et celles de l'exon 18 (p.G719A/C/S) sont associées à une sensibilité accrue au traitement. Les délétions dans l'exon 19 semblent associées à une meilleure survie chez les patients traités par ITK que les mutations p.L858R (**MANSUET-LUPO, 2014**).

Conclusion

Conclusion

Ces derniers temps il y a eu de grands progrès dans le diagnostic du cancer du poumon, et notre travail a pour objet l'étude cellulaire et moléculaire d'un adénocarcinome pulmonaire en utilisant quelques méthodes. La pratique clinique nous a permis de mieux comprendre la thérapie ciblée du cancer du poumon. Elle consiste à préparer les lames à partir des prélèvements et les colorer pour l'observation des tissus sous microscope afin de réaliser une étude histologique et faire un compte rendu utile pour l'étude immuno-histochimique, cette dernière est importante pour connaître la nature et l'origine de la tumeur ce qui facilite le choix d'un traitement adéquat pour chaque patient en tenant compte de l'appréciation et des résultats de la biologie moléculaire.

Les oncogènes spécifiques avec des mutations conductrices, tels que le gène du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR), peuvent conduire à la formation de l'adénocarcinome pulmonaire non à petites cellules, et notre étude nous a permis d'identifier ces oncogènes et leurs mutations, mais les résultats obtenus nous ont montré que certains cas n'ont pas de mutation au niveau de l'EGFR, tandis que d'autres en ont, de plus ils nous ont confirmé que la thérapie ciblée avec les inhibiteurs du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) est destinée uniquement à des patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules primitif et métastatique et qui ont des mutations au niveau des gènes de l'EGFR avec un dérèglement dans leurs voies de signalisation.

Les médecins ont tendance à traiter les cellules cancéreuses par la chimiothérapie, la thérapie chirurgicale et la radiothérapie, mais à cause de leurs effets secondaires, les oncologues doivent penser à développer des projets de recherche pour aboutir à d'autres thérapies qui sont plus efficaces et moins dangereuses pour la santé.

*Liste des
Références*

Liste des références

- Abbott, R.G., Forrest, S., Pienta, K.J., 2006.** Simulating the Hallmarks of Cancer. *Artificial Life* 12, 617–634. <https://doi.org/10.1162/artl.2006.12.4.617>
- Adair, T.H., Montani, J.-P., 2010.** Overview of Angiogenesis, Angiogenesis. Morgan & Claypool Life Sciences.
- Amimer, A., Djouat, A., 2019.** Etude du profil immunohistochimique du cancer broncho-pulmonaire chez des patients Algériens.
- Baba, A.I., Câtoi, C., 2007.** TUMOR CELL MORPHOLOGY, Comparative Oncology. The Publishing House of the Romanian Academy.
- Benribague, S., 2016.** Étude du cycle cellulaire chez *Lingulodinium polyedrum* 57.
- Botezatu, A., Iancu, I.V., Popa, O., Plesa, A., Manda, D., Huica, I., Vladoiu, S., Anton, G., Badiu, C., 2016a.** Mechanisms of Oncogene Activation, New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61249>
- Botezatu, A., Iancu, I.V., Popa, O., Plesa, A., Manda, D., Huica, I., Vladoiu, S., Anton, G., Badiu, C., 2016b.** Mechanisms of Oncogene Activation, New Aspects in Molecular and Cellular Mechanisms of Human Carcinogenesis. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/61249>
- BOUKIS, F., 2016a.** CD d'autoformation avec corrélation radiolinico-pathologique des métastases thoraciques d'un primitif indéterminé (thèse de doctorat). CADI AYYAD, Marrakech.
- BOUKIS, F., 2016b.** CD d'autoformation avec corrélation radioclinico-pathologique des métastases thoraciques d'un primitif indéterminé (thèse de doctorat). CADI AYYAD, Marrakech.
- Boumaaza, A., 2021.** Toxicologie.
- Bremnes, R.M., Dønnem, T., Al-Saad, S., Al-Shibli, K., Andersen, S., Sirera, R., Camps, C., Marinez, I., Busund, L.-T., 2011.** The Role of Tumor Stroma in Cancer Progression and Prognosis: Emphasis on Carcinoma-Associated Fibroblasts and Non-small Cell Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology* 6, 209–217. <https://doi.org/10.1097/JTO.0b013e3181f8a1bd>

- Brücher, B.L.D.M., Jamall, I.S., 2014.** Cell-Cell Communication in the Tumor Microenvironment, Carcinogenesis, and Anticancer Treatment. *CPB* 34, 213–243. <https://doi.org/10.1159/000362978>
- Cao, G., He, X., Sun, Q., Chen, S., Wan, K., Xu, X., Feng, X., Li, P., Chen, B., Xiong, M., 2020.** The Oncolytic Virus in Cancer Diagnosis and Treatment. *Front Oncol* 10. <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.01786>
- Carey, B., 2015.** cobas® EGFR Mutation Test v2 For in vitro diagnostic use.
- Carmaux, S., 2008.** Caractérisation de la mort des cellules animales cultivées en bioréacteur 106.
- Cassiday, L., 2013.** Lighting Up The Golgi Of Cancer Cells. *Chemical & Engineering News*.
- Chahar, A., Chahar, N., Kabirai, A., Gupta, J., 2020.** Chemical carcinogenesis: A brief review on mechanism & metabolism. *Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology* 6, 120–124. <https://doi.org/10.18231/j.jooo.2020.027>
- Chen, Z., Zhang, H., Lu, W., Huang, P., 2009.** Role of mitochondria-associated hexokinase II in cancer cell death induced by 3-bromopyruvate. *BiochimBiophysActa* 1787, 553–560. <https://doi.org/10.1016/j.bbabbio.2009.03.003>
- Chin, L., Gray, J.W., 2008.** Translating insights from the cancer genome into clinical practice. *Nature* 452, 553–563. <https://doi.org/10.1038/nature06914>
- Chiodoni, C., Di Martino, M.T., Zazzeroni, F., Caraglia, M., Donadelli, M., Meschini, S., Leonetti, C., Scotlandi, K., 2019.** Cell communication and signaling: how to turn bad language into positive one. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* 38, 128. <https://doi.org/10.1186/s13046-019-1122-2>
- Coffin, J.M., Hughes, S.H., Varmus, H.E., 1997.** *Oncogenesis, Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Coller, H.A., 2014.** Is Cancer a Metabolic Disease? *Am J Pathol* 184, 4–17. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2013.07.035>
- Cook, M., Chauhan, A., 2020.** Clinical Application of Oncolytic Viruses: A Systematic Review. *Int J MolSci* 21. <https://doi.org/10.3390/ijms21207505>
- Cooper, G.M., 2000.** *Oncogenes. The Cell: A Molecular Approach*. 2nd edition.
- Couture, C., 2011.** Marqueurs moléculaires 56.
- Deberardinis, R.J., 2008.** Is cancer a disease of abnormal cellular metabolism? New angles on an old idea. *Genetics in Medicine* 10, 767–777. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31818b0d9b>

- Denais, C., Lammerding, J., 2014.** Nuclear Mechanics in Cancer. *AdvExp Med Biol* 773, 435–470. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-8032-8_20
- Donnai, D., Read, A., 2008.** Génétique médicale - de la biologie à la pratique clinique. De Boeck Supérieur.
- Fares, J., Fares, M.Y., Khachfe, H.H., Salhab, H.A., Fares, Y., 2020.** Molecular principles of metastasis: a hallmark of cancer revisited. *Signal Transduction and Targeted Therapy* 5, 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41392-020-0134-x>
- Feins, S., Kong, W., Williams, E.F., Milone, M.C., Fraietta, J.A., 2019.** An introduction to chimeric antigen receptor (CAR) T-cell immunotherapy for human cancer. *Am J Hematol* 94, S3–S9. <https://doi.org/10.1002/ajh.25418>
- Gerber, D.E., 2008.** EGFR Inhibition in the Treatment of Non-Small Cell Lung Cancer. *Drug Dev Res* 69, 359–372. <https://doi.org/10.1002/ddr.20268>
- Gopinadh, G., 1970.** Cancer characteristics and its causes. *Research & Reviews: Journal of Medical and Health Sciences* 4.
- Grant, D.S., Morales, D., Cid, M.C., Kleinman, H.K., 1994.** Angiogenesis Models Identify Factors Which Regulate Endothelial Cell Differentiation, in: Maragoudakis, M.E., Gullino, P.M., Lelkes, P.I. (Eds.), *Angiogenesis: Molecular Biology, Clinical Aspects*, NATO ASI Series. Springer US, Boston, MA, pp. 51–60. https://doi.org/10.1007/978-1-4757-9188-4_6
- Grasso, D., Zampieri, L.X., Capelôa, T., Velde, J.A.V. de, Sonveaux, P., 2020.** Mitochondria in cancer. *Cell Stress* 4, 114–146. <https://doi.org/10.15698/cst2020.06.221>
- Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011.** Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Harris, C.C., 1991.** Chemical and physical carcinogenesis: advances and perspectives for the 1990s. *Cancer Res* 51, 5023s–5044s.
- Harvey, A.J., 2019.** Overview of Cell Signaling Pathways in Cancer, in: Badve, S., Kumar, G.L. (Eds.), *Predictive Biomarkers in Oncology: Applications in Precision Medicine*. Springer International Publishing, Cham, pp. 167–182. https://doi.org/10.1007/978-3-319-95228-4_12
- HONTAAS, A., 2014.** Prise en charge des patients cancéreux à l’officine (thèse de doctorat). UNIVERSITE TOULOUSE III PAUL SABATIER.

- Irani, S., 2019.** Emerging insights into the biology of metastasis: A review article. *Iran J Basic Med Sci* 22, 833–847. <https://doi.org/10.22038/ijbms.2019.32786.7839>
- Ishizaki, K., 1995.**[Mechanisms for inactivation of tumor suppressor genes].*Nihon Rinsho* 53, 2660–2665.
- Jafri, M.A., Ansari, S.A., Alqahtani, M.H., Shay, J.W., 2016.**Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies.*Genome Med* 8. <https://doi.org/10.1186/s13073-016-0324-x>
- Jain, D., Herzog, B.H., Maggi, L.B., 2021.**Genetic Alterations in Cancer. Springer Publishing Company.
- Jayaraman, A., Muthusamy, K.G.K. and P., 2016.**Telomere and Telomerase in Cancer, Telomere - A Complex End of a Chromosome.*IntechOpen*. <https://doi.org/10.5772/64721>
- Jin, J., Wu, X., Yin, J., Li, M., Shen, J., Li, J., Zhao, Y., Zhao, Q., Wu, J., Wen, Q., Cho, C.H., Yi, T., Xiao, Z., Qu, L., 2019.** Identification of Genetic Mutations in Cancer: Challenge and Opportunity in the New Era of Targeted Therapy. *Front. Oncol.* 9. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00263>
- Jose, M.R., Eugenio, S., 2002.**ras Genes and Human Cancer: Different Implications and Different Roles. *Current Genomics* 3, 295–311.
- Joyce, C., Rayi, A., Kasi, A., 2021.** Tumor-Suppressor Genes, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Kiwerska, K., Szyfter, K., 2019.**DNA repair in cancer initiation, progression, and therapy—a double-edged sword. *J Appl Genet* 60, 329–334. <https://doi.org/10.1007/s13353-019-00516-9>
- Lahtz, C., Pfeifer, G.P., 2011.** Epigenetic changes of DNA repair genes in cancer. *J Mol Cell Biol* 3, 51–58. <https://doi.org/10.1093/jmcb/mjq053>
- Lavigne, J.L., 2017.** Changements phénotypiques des cellules endothéliales irradiées au cours du développement des lésions radiques pulmonaires (Thèse de doctorat de Physiologie, Physiopathologie et Thérapeutique). Université Pierre et Marie Curie.
- Lazebnik, Y., 2010.** What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 10, 232–233. <https://doi.org/10.1038/nrc2827>
- Lee, N.K., 1992.** Basic science reviews: Tumor suppressor genes. *Head & Neck* 14, 407–414. <https://doi.org/10.1002/hed.2880140513>

- Liao, J., Han, R., Wu, Y., Qian, Z., 2021.** Review of a new bone tumor therapy strategy based on bifunctional biomaterials. *Bone Res* 9, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41413-021-00139-z>
- LIN, G., SUN, X.-J., HAN, Q.-B., WANG, Z., XU, Y.-P., GU, J.-L., WU, W., ZHANG, G., HU, J.-L., SUN, W.-Y., MAO, W.-M., 2015.** Epidermal growth factor receptor protein overexpression and gene amplification are associated with aggressive biological behaviors of esophageal squamous cell carcinoma. *OncolLett* 10, 901–906. <https://doi.org/10.3892/ol.2015.3277>
- lukylee, 2017.** MORPHOLOGY OF CANCER CELLS.
- MANSUET-LUPO, A., 2014.** Influence des caractéristiques morphologiques et mutationnelles des carcinomes pulmonaires sur leur environnement immunitaire et leur pronostic (thèse de doctorat). PARIS DESCARTES.
- Martin, F., 2016.** Le cancer broncho-pulmonaire dans le département de La Réunion: caractéristiques cliniques et démographiques.
- Mercadante, A.A., Kasi, A., 2021.** Genetics, Cancer Cell Cycle Phases, in: *StatPearls*. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL).
- Mitsudomi, T., Yatabe, Y., 2010.** Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J* 277, 301–308. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07448.x>
- Montanaro, L., Treré, D., Derenzini, M., 2008.** Nucleolus, Ribosomes, and Cancer. *Am J Pathol* 173, 301–310. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2008.070752>
- Moreau, D., 2006.** Etude de nouvelles cibles moléculaires de cancer bronchopulmonaire non a petites cellules pharmacomodulées par des substances originales naturelles et synthétiques (thèse de doctorat). Université de Nantes.
- Nicolson, G.L., 2015.** Cell Membrane Fluid–Mosaic Structure and Cancer Metastasis. *Cancer Res* 75, 1169–1176.
- Nishida, N., Yano, H., Nishida, T., Kamura, T., Kojiro, M., 2006.** Angiogenesis in Cancer. *Vasc Health Risk Manag* 2, 213–219.
- Oakes, S.A., 2020.** Endoplasmic Reticulum Stress Signaling in Cancer Cells. *The American Journal of Pathology* 190, 934–946. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2020.01.010>
- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L.F., Lopes, C., 2007a.** Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 593–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>

- Oliveira, P.A., Colaço, A., Chaves, R., Guedes-Pinto, H., De-La-Cruz P., L.F., Lopes, C., 2007b.** Chemical carcinogenesis. *An. Acad. Bras. Ciênc.* 79, 593–616. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652007000400004>
- Pawaiya, R., Krishna, L., Kumar, R., 2011.** Genes responsible for cancer: A review. *Indian Journal of Animal Sciences* 81, 1–20.
- Pitot, H.C., 1993.** The molecular biology of carcinogenesis. *Cancer* 72, 962–970. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19930801\)72:3+<962::AID-CNCR2820721303>3.0.CO;2-H](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19930801)72:3+<962::AID-CNCR2820721303>3.0.CO;2-H)
- Pucci, C., Martinelli, C., Ciofani, G., 2019a.** Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* 13. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Pucci, C., Martinelli, C., Ciofani, G., 2019b.** Innovative approaches for cancer treatment: current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* 13. <https://doi.org/10.3332/ecancer.2019.961>
- Ronen, A., Glickman, B.W., 2001.** Human DNA repair genes. *Environ Mol Mutagen* 37, 241–283. <https://doi.org/10.1002/em.1033>
- Safia, H., Sabrina, B., 2019.** Etude clinique et anatomopathologique de cytologies bronchiques suspectes de malignité et malignes avec une confrontation histologique et immunohistochimique 74.
- Sciacovelli, M., Gaude, E., Hilvo, M., Frezza, C., 2014.** The Metabolic Alterations of Cancer Cells. *Methods in enzymology* 542, 1–23. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416618-9.00001-7>
- Shay, J.W., 2016.** Role of Telomeres and Telomerase in Aging and Cancer. *Cancer Discov* 6, 584–593. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-16-0062>
- Sterner, R.C., Sterner, R.M., 2021.** CAR-T cell therapy: current limitations and potential strategies. *Blood Cancer J.* 11, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41408-021-00459-7>
- TICEM, 2014.** poly-anatomie-pathologique.
- Trybek, T., Kowalik, A., Gózdź, S., Kowalska, A., 2020.** Telomeres and telomerase in oncogenesis (Review). *Oncology Letters* 20, 1015–1027. <https://doi.org/10.3892/ol.2020.11659>
- Vauzour, D., 2021.** Étude des propriétés biologiques des constituants des vins de Champagne.

- Weinmann, H., Ottow, E., 2007.** 7.09 - Recent Development in Novel Anticancer Therapies, in: Taylor, J.B., Triggler, D.J. (Eds.), *Comprehensive Medicinal Chemistry II*. Elsevier, Oxford, pp. 221–251. <https://doi.org/10.1016/B0-08-045044-X/00210-8>
- Wen, S., Zhu, D., Huang, P., 2013.** Targeting cancer cell mitochondria as a therapeutic approach. <https://doi.org/10.4155/fmc.12.190>
- Werb, Z., Lu, P., 2015.** The Role of Stroma in Tumor Development. *Cancer J* 21, 250–253. <https://doi.org/10.1097/PPO.000000000000127>
- Williams, G.H., Stoeber, K., 2012.** The cell cycle and cancer. *The Journal of Pathology* 226, 352–364. <https://doi.org/10.1002/path.3022>
- Wu, W., Zhao, S., 2013.** Metabolic changes in cancer: beyond the Warburg effect. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 45, 18–26. <https://doi.org/10.1093/abbs/gms104>
- Xie, F.Z., Zheng, L.L., 2019.** Oncolytic Viruses and Their Application to Cancer Treatment. <https://doi.org/10.23937/2572-3987.1510020>
- Yan, G., Elbadawi, M., Efferth, T., 2020.** Multiple cell death modalities and their key features (Review). *World Academy of Sciences Journal* 2, 39–48. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.40>
- Yoshii, T., Geng, Y., Peyton, S., Mercurio, A.M., Rotello, V.M., 2016.** Biochemical and biomechanical drivers of cancer cell metastasis, drug response and nanomedicine. *Drug Discov Today* 21, 1489–1494. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.05.011>
- Zachary, J.F., 2017.** *Pathologic Basis of Veterinary Disease, Sixth Edition*. ed.
- Zahavi, D., Weiner, L., 2020.** Monoclonal Antibodies in Cancer Therapy. *Antibodies (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/antib9030034>