

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA – Bejaïa



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Physico-Chimique

Spécialité : Génétique Fondamentale et Appliquée

Réf....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

*Etude moléculaire du cancer du sein par
amplification en chaîne par polymérisations (PCR)*

Présenté par :

Nedjma Katia

Djermouli Assia

Soutenu le : 26 /06 / 2023

Devant le jury composé de :

Dr AIT ALI Djida	MCB	Présidente
Dr BENMESSAOUD Yasmine	MCB	Examinatrice
Dr BENCHRIF CHahra	MCHU	Co-Encadreur
Dr OUAHMED Hania	MAA	Encadreur

Année universitaire
2022/2023

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail

À mes très chers parents pour leur amour, leur sacrifice, leurs encouragements, pour tout ce qu'ils m'ont apporté et les valeurs qu'ils m'ont enseignées pour leur soutien et leur confiance notamment durant mes études

À mes très chers frères Ghiles & Adem

À mes très chères cousines Celia et sa petite princesse Amelia, Nouara et lamia

À toutes mes très chères amies : Lina, Imane et Dehia

À mon binôme et ma meilleure rencontre en master Assia

Katia

Dédicaces

Je dédie ce travail en premier lieu à mes très chers parents à ma maman qui a sacrifié sa vie pour nous et qui m'a soutenu et encouragé durant ces années d'études. Aucun hommage ne pourrait être à la hauteur de l'amour dont il ne cesse de me combler

Je le dédie accompagné d'un profond amour à mes sœurs Sabrina et Nina

À mon époux Bizou qui m'a donné la force et le soutien pour arriver à ce que je suis

À toute ma famille Christophe, Cayden et Noël

À mes meilleures amies Betty et Belynda

À ma très chère amie et binôme Katia

À mes chères amies Imene et Dehia

Assia

Remerciements

Avant de commencer le développement de cette expérience professionnelle il nous paraît tout naturel de commencer par remercier les personnes qui nous ont permis d'effectuer ce travail ainsi que ceux qui nous ont permis d'en faire un moment agréable et profitable.

Nous remercions Dieu le tout puissant de nous avoir donné la volonté et la santé pour terminer ce travail.

Nous tenons à exprimer notre gratitude et adresser nos sincères remerciements à :

Notre encadreur Mme OUAHMED-BOUDAOUH Hania d'avoir cru en nous et de nous avoir accordé la chance de réaliser ce merveilleux travail qui sans vous ne serait pas aussi exceptionnel, merci d'être la personne bienveillante, aimable et protectrice que vous êtes. Ce fut un honneur de travailler et d'apprendre tant de choses avec vous Mme la reine de la moléculaire.

Mme AIT ALLI Djida qui nous a permis de mener à terme cette expérience et qui a fortement contribué au succès de ce travail grâce à son expertise, maîtrise et compétence dans ce domaine. Merci d'être la personne charismatique, drôle et dynamique merci d'être vous tout simplement.

Hakima, Linda, Louiza et Salima qui nous ont accompagnés, conseillés, orientés, et aidés tout au long de ce travail.

Mme BENMESSAOUD-KARTOUT Yasmine qui nous a fait honneur d'accepter d'examiner ce travail. Ce fut un plaisir de partager une année d'étude avec vous.

Nous tenons à remercier chaleureusement nos familles pour avoir été à nos côtés toutes ces années. On a eu la chance de pouvoir effectuer nos études en toute sérénité, et nous sommes reconnaissantes envers nos parents et nos frères et sœurs pour cela.

Nous remercions également tous ceux qui nous ont aidé et conseillé de près ou de loin tout au long de nos études jusqu'à la finalisation de ce projet.

Introduction.....	1
Chapitre I : bibliographie.....	2
I Epidémiologie.....	2
II Anatomie et histologie du sein.....	4
III Le cancer du sein.....	6
III.1 La cancérogenèse.....	6
III.2 Le microenvironnement des cellules.....	9
III.3 Les cellules souches mammaires dans le cancer du sien.....	10
III.4 Facteurs de risques.....	12
III.4.1 Facteurs de risque génétiques.....	12
III.5 Classification du cancer du sein.....	16
III.5.1 Classification histologique.....	16
III.5.2 Classification TNM.....	17
III.5.3 Classification moléculaire.....	17
III.6 Diagnostic.....	18
III.7 Marqueurs biologiques et moléculaires.....	19
III.7.1 Les récepteurs hormonaux.....	19
III.7.2 P53.....	21
III.7.3 Ki67.....	22
IV Cancer du sein HER2 positif.....	24
IV.1 Oncogène HER2.....	24
IV.2 La surexpression de HER2 dans le cancer du sein.....	26
IV.3 Traitements.....	30
IV.4 Détermination du statut HER2-positif.....	31
Chapitre II: Matériels et méthodes.....	34
I Matériels et méthodes.....	34
I.1 Matériels.....	34

I.1.1 Matériel biologiques.....	34
I.1.2 Matériels non biologiques.....	34
I.2 Méthodes	34
I.2.1 Etude histopathologie.....	34
I.2.2 Etude immunohistochimique.....	35
I.2.3 Extraction de l'ADN.....	37
I.2.3 La PCR.....	40
Chapitre III: Résultats et Discussion.....	43
I Résultats de l'étude histopathologique.....	43
II Résultats de l'étude immunohistochimique.....	43
III Résultats d'extraction d'ADN à partir d'un tissu FFPE.....	44
IV Résultats et discussion de la PCR.....	49
Conclusion et perspectives	50
Références bibliographiques	

Liste des Figures :

Figure 1 : Etude épidémiologie des nouveaux cas de cancer du sein recensés en 2020, tous âges confondus.....	2
Figure 2 : Estimation des taux d'incidence et de mortalité normalisé des différents cancers selon l'âge recensés en 2020, tous sexes confondus	3
Figure 3 : principaux cancers par pays, taux de mortalité estimé selon l'âge en 2020 pour les deux sexes.....	3
Figure 4 : Anatomie du sein.....	4
Figure 5 : A ; Schéma d'un canal mammaire représenté en coupe, B ; Schéma d'une alvéole ou acinus mammaire représenté en coupe.....	5
Figure 6 : Situation anatomique des ganglions lymphatiques du sein.....	6
Figure 7 : Les processus moléculaires, cellulaires et pathologiques qui intervient dans la transformation d'un tissu sain en lésions préinvasives.....	6
Figure 8 : Evénements pathologiques associés au carcinome canalaire in situ.....	7
Figure 9 : Les facteurs influençant l'angiogenèse tumorale.....	8
Figure 10 : L'organigramme des métastases précoces du cancer du sein.....	9
Figure 11 : Schéma simplifié du modèle hiérarchique des cellules souches de la glande mammaire humaine(A) et la corrélation des cellules souches avec les sous-types de cancer du sein(B).....	11
Figure 12 : La fréquence relative des mutations dans les gènes du cancer du sein.....	13
Figure 13 : BRCA1, BRCA2 et TP53 dans la voie de réparation des dommages à l'ADN entraînant une instabilité cellulaire et génétique. Effets de la voie cellulaire PIK3CA sur le cycle cellulaire, le caractère invasif et la survie.....	14
Figure 14 : Voies de signalisation impliquant des marqueurs moléculaires du cancer du sein humain. Les lignes vertes indiquent les membranes cytoplasmiques et nucléaires..	16
Figure 15 : Différents sous-types moléculaires de cancer sein.....	18
Figure 16 : Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes (RE) dans le cancer du sein.....	20
Figure 17 : carte linéaire montrant l'emplacement des mutations faux sens P53 dans les cancers du sein.....	21
Figure 18 : Rôle et régulation de P53 dans la cancérogenèse mammaire.....	22
Figure 19 : Localisation de gène MKI67 sur le chromosome 10.....	22
Figure 20 : Aperçu de la localisation et des fonctions du Ki-67.....	23

Figure 21 : Illustration des différents niveaux d'expression de Ki-67, A : Expression faible (Sous-type luminal A) ; B : Expression intermédiaire (Nécessite d'associer d'autres biomarqueurs) ; C : Expression importante (Sous type luminal B).....	24
Figure 22 : (A) Le schéma illustre la localisation du gène HER2 (ERBB2) sur le chromosome 17.....	25
Figure 23 : A : famille des récepteur Her comprenant Her1 ou EGFR, Her2, Her3 et Her4 B : structure des récepteurs Her.....	26
Figure 25 : Les voies PI3K, AKT, MTOR et MAPK en aval de la prolifération cellulaire du cancer du sein Her2 positif.....	28
Figure 26 : voie de signalisation ERbB.....	29
Figure 27 : fonctionnement d'un récepteur Her.....	30
Figure 28 : Voie de signalisation Her2, mécanisme d'action des thérapies ciblées.....	31
Figure 29 : changement de paradigme dans la définition du statut Her2 dans le cancer du sein par IHC.....	32
Figure 30 : évaluation du statut Her2 par FISH.....	33
Figure 31 : Etapes de démasquage (Photo originale).....	36
Figure 33 : Etapes d'extraction d'ADN selon le protocole.....	39
Figure 34 : les étapes de la PCR.....	42
Figure 35 : Aspect histologique d'un carcinome canalaire infiltrant CCI (G 10).....	43
Figure 36 : Résultats d'immunomarquage de HER2 (Score 3+) (G X4).....	43
Figure37: Non dissolution de la paraffine.....	44
Figure 38 : la digestion enzymatique après incubation.....	45
: La digestion enzymatique après incubation.....	45
Figure39 : Apparition d'une pelote d'ADN.....	45
Figure 40 : a : graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b : figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre	46
Figure 41 : a : graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b : figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre.....	47
Figure 42 : Carottage de tissu.....	47
Figure 43 : a : graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b : figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre.....	48
Figure 44 : les paramètres de la PCR (1) (photo originale).....	50

Figure 45 : Résultats de la PCR avec Her2 (1).....	50
Figure 46 : les paramètres de la PCR (2) (photo originale).....	51
Figure 47 : Résultat de PCR avec Her2 (2).....	51

Liste des tableaux :

Tableau I : Locus, Séquences d'amorces et température d'hybridation40

Tableau II : tableau récapitulatif des 3 méthodes d'extraction d'ADN.....49

Liste des abréviations :

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ARNm: Acide ribonucléique messenger

ATR: ATM and Rad3-related

ATM: Ataxia-telangiectasia mutated

BARD2: Associated RING domain protein 2

BFGF: Basic fibroblast growth factor

BRCA1: Breast Cancer gène 1

BRCA2: Breast Cancer gène 2

CCIS: Carcinome Canalaire in- Situ

CCND1: Cycline D1

CD: Cluster of differenciation

CDK: cyclin-dependent kinase

CHEK: Checkpoint kinase

CS : Cancer du sein

CSM : Cellule souche mammaire

DAB : 3,3-Diaminobenzidine

EDTA : Éthylène diamine tétra-acétique

EGF: Epidermal growth factor

Erb-B: Erythroblastic oncogene B

FFPE: Fixé au formol et inclut en paraffine

FGF: Fibroblast growth factor

FISH: Hybridation in situ par fluorescence

FOS : Fissure orbitaire superieur

G : Grossissement

GSK3: Glycogen synthase kinase-3

GADD45: Growth Arrest et DNA Damage

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

IGF: Insulin-like growth factor

IHC: Immunohistochimie

ITGB2: Integrin subunit beta 2

IL-6: Interleukine-6

KI67: Marker of prolifération Ki-67

MAPK: Mitogen-activated protein kinase mitogen

MMP : Matrix MetalloProteinase

MYC : Myelocytomatosis Cellular

MKI67: Marker of Proliferation Ki-67

PALB2 : Partner and localizer of BRCA2

PCR : Réaction en chaine par polymérisation

PTEN: Phosphatase and tensin homolog

PLC: phospholipase C

PIP3: Phosphatidylinositol 3, 4,5-triphosphate

PI3K: phosphatidylinositol-3-kinase

P21: Cyclin-dependant kinase inhibitor 1

P27 : Proteine 27

RAS : Rat Sarcoma protein

RAF : Rapidly accelerated fibrosarcoma

Re α : Recepteur ostrogénique alpha

Re β : Recepteur ostrogénique beta

SBR : Grade de Scarff, Bloom et Richardson

SDS: Dodécylsulfate de sodium

SRC: Signet ring cell cancer

THS: Thyroid-stimulating hormone

TNM : Taille/Nodule/Métastases

Tris-HCl : Tris-hydrochlorhydrique

TP53: Gene P53

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor.



Introduction



Le cancer du sein constitue l'affection tumorale maligne la plus fréquemment rencontrée chez la femme et la plus meurtrière. Le cancer du sein constitue un problème majeur de santé publique à la fois dans les pays industrialisés et dans les pays en voie de développement où son incidence ne cesse d'augmenter d'année en année (**BAB & YELLES CHAUCHE**). Plus de 2,2 million de cas de cancer du sein ont été recensés en 2020 ce qui en fait le cancer le plus courant. En Algérie, ce cancer occupe la première place et représente 50% des cancers gynécologiques, avec 14000 nouveaux cas enregistrés chaque année (**Bray et al., 2018**).

La majorité des cancers du sein sont sporadiques, probablement dû à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux et seulement 5 à 10% des cas sont liés à une prédisposition héréditaire. D'autres facteurs sont impliqués tels que l'alcool, tabac, obésité, menstruation précoce et ne pas avoir d'enfant ou ne pas allaiter (**Yang et al., 2015**).

Le cancer du sein avec surexpression du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (Her2 positif) représente 15 à 30% de toutes les tumeurs du sein. Her2 est un récepteur à activité tyrosine kinase présent de façon physiologique chez l'espèce humaine. Nous le retrouvons au sein de la population féminine atteinte de cancer mammaire. La surexpression de l'oncogène Her2 est considéré comme un indicateur pronostique défavorable de la maladie liée entre autre à une augmentation des capacités de prolifération et de croissance des cellules tumorales et de la capacité à générer plus facilement des métastases.

La surexpression de la protéine Her2 est diagnostiquée par l'étude immunohistochimique (IHC 3+) en première intention et par hybridation in situ par fluorescence (FISH) pour confirmation.

La pratique consistant à fixer des échantillons biologiques clinique dans du formol puis à les inclure dans de la paraffine (FFPE) pour obtenir des blocs de tissus est depuis des décennies la méthode privilégiée de préparation des échantillons biologiques en vue d'un diagnostic (**Mathieson & Thomas, 2019**).

Le but de ce travail est l'élaboration d'un protocole d'extraction de l'ADN à partir d'un tissu tumoral mammaire Her2 positif paraffiné FFPE. En effet, ces prélèvements restent les plus accessibles mais ils représentent aussi des avantages. Pour procéder à l'extraction de l'ADN afin de réaliser une étude moléculaire par amplification en chaîne par polymérisation (PCR) et de cibler une mutation du gène Her2 pour déterminer les altérations géniques. En Algérie et notamment au niveau de la wilaya de Bejaia aucune étude pourtant sur les mutations HER2 n'a été réalisé.

Bibliographie

Chapitre I



I. Epidémiologie

Dans le monde, plus de 2,2 millions de cas de cancer du sein ont été recensés en 2020 (figure 1), ce qui en fait le cancer le plus courant. Près d'une femme sur 12 développe un cancer du sein dans sa vie. Le cancer du sein est la première cause de mortalité par cancer chez les femmes. Environ 685 000 femmes sont mortes du cancer du sein en 2020 (figure 2). L'Asie vient en première place avec le nombre le plus élevé de nouveaux cas en 2020 avec 9 503 710 (49,3%), suivi de l'Europe avec 4 398 443 (22,8%) (figure 1).

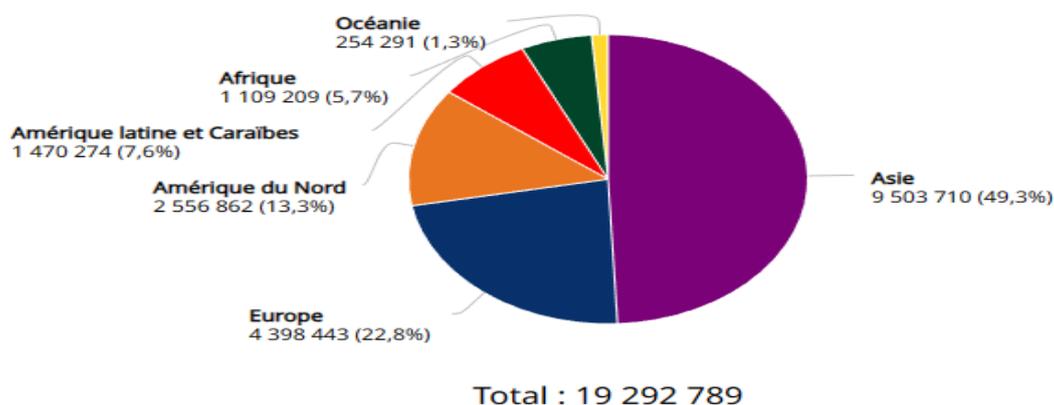


Figure 1 : Etude épidémiologique des nouveaux cas de cancer du sein recensés en 2020, tous âges confondus (Bray et al., 2018).

Le cancer du sein est l'un des cancers le plus fréquent et le plus mortel avec un taux d'incidence de 47800/100000 et un taux de mortalité de 13600/100000, suivi du cancer de la prostate et du poumon d'après (Sung et al., 2021).

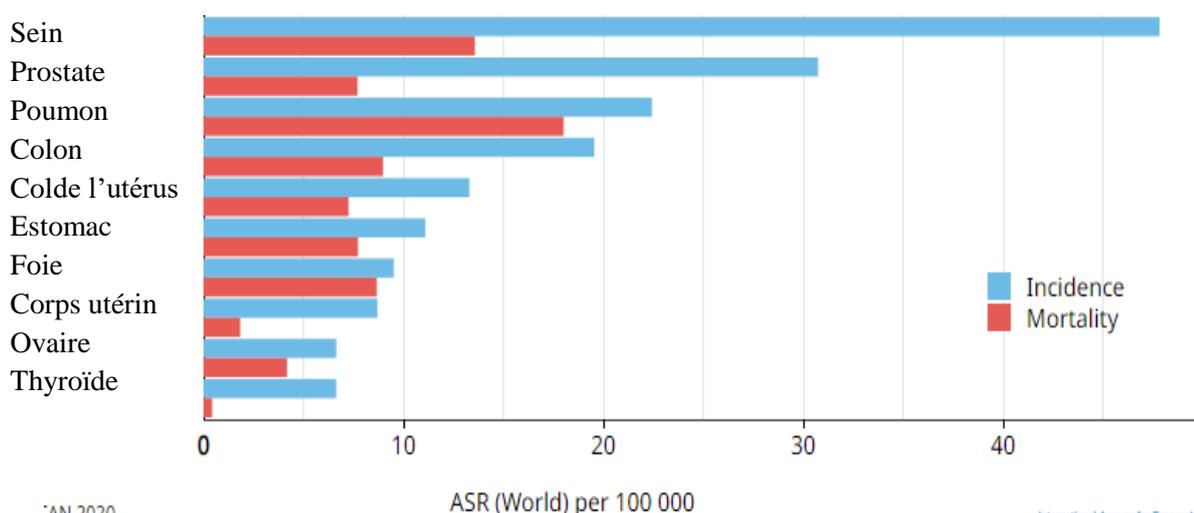


Figure 2 : Estimation des taux d'incidence et de mortalité normalisé des différents cancers selon l'âge recensés en 2020, tous sexes confondus (Bray et al., 2018).

En Algérie, le cancer du sein représente plus de 40% de l'ensemble des cancers de la femme avec 11 000 nouveaux cas estimés par année. Il est le plus répandu d'après les statistiques de 2020 de GLOBOCAN (figure 3). C'est un cancer qui est en nette augmentation depuis plus de 20 ans.

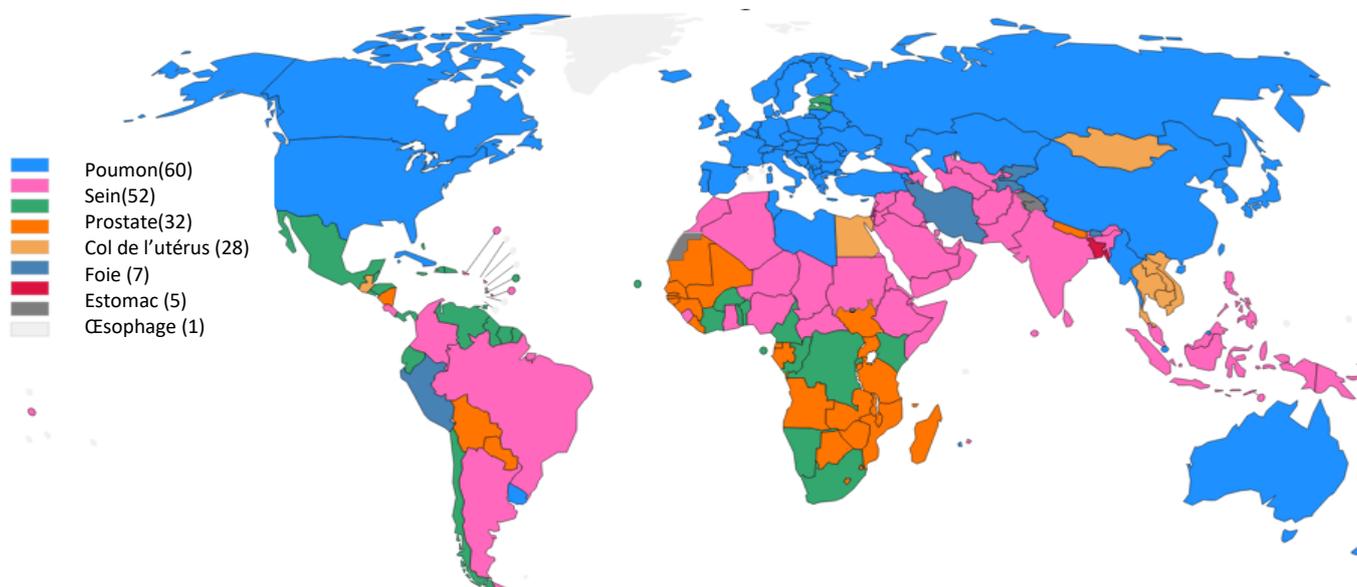


Figure 3 : principaux cancers par pays, taux de mortalité estimé selon l'âge en 2020 pour les deux sexes (Bray et al., 2018).

La mise en place des registres régionaux en Algérie a permis d'obtenir une estimation de l'incidence globale du cancer. Chez la femme, le cancer du sein occupe la première place en termes d'incidence dans les trois principaux registres algériens (Alger, Oran et Sétif). Son ISA (incidence standardisée selon l'âge) est de 21,6, 17,03 et 34,49 pour 105 femmes pour les registres d'Alger, Sétif et Oran, respectivement.

L'incidence du cancer du sein est plus élevée dans les tranches d'âge 45-50 ans (110,1/100 000 femmes) et 40-45 ans (96,6/100000 femmes) et reste relativement faible dans la tranche d'âge 25-30 ans (18,1/100000 femmes). En plus de l'augmentation croissante de son incidence dans les pays en voie de développement, le cancer du sein touche de manière relativement importante des femmes jeunes, alors qu'en Occident, ce cancer survient surtout chez les femmes ménopausées. L'âge de survenue du cancer du sein chez la femme maghrébine est de 12 ans en moyenne plus jeune en comparaison avec l'âge de survenue en Europe et en Amérique du Nord, avec un taux entre 8 et 12 % des femmes de moins de 35 ans (**bab & yelles chaouche**).

Les disparités entre les pays à revenu faible et intermédiaire et ceux à revenu élevé du cancer du sein sont considérables. En effet, les taux de survie à cinq ans s'élève à plus de 90% dans les pays à revenu élevé, mais n'atteint que 66% en Inde et 40% en Afrique du sud.

II. Anatomie et histologie du sein

Le sein est un organe pair et globuleux situé en avant et en haut du thorax (**bab & yelles chaouche**). C'est une glande exocrine dont le développement et la structure sont sous la dépendance de l'imprégnation hormonale oestro-progestinique. Les seins sont constitués de tissu graisseux contenant les glandes mammaires, et d'un mamelon, entouré d'une aréole et de peau péri-aréolaire (**bab & yelles chaouche**) (figure 4).

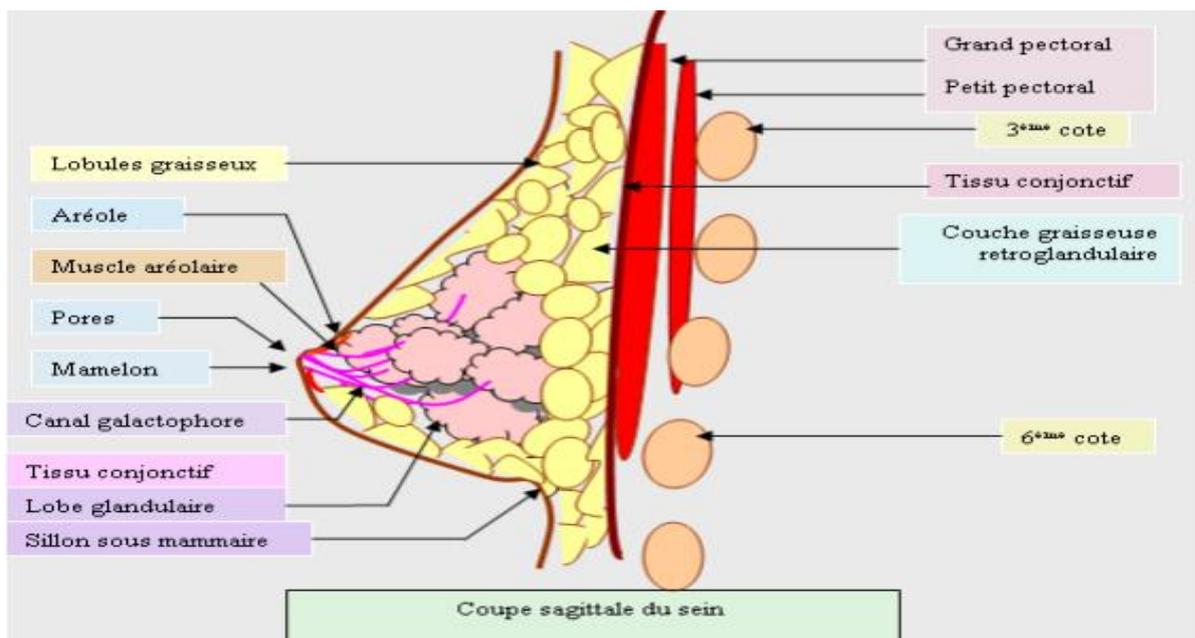


Figure 4 : Anatomie du sein (BAB & YELLES CHAOUCHE) .

La glande mammaire est une glande sudoripare (site internet) formée de 15 à 20 lobes qui sont séparés par du tissu conjonctif dense et entourés par du tissu adipeux abondant. Le lobe est lui-même constitué de lobules, chaque lobule possède des alvéoles qui correspondent à la partie sécrétrice de la glande (figure5) (**bab & yelles chaouche**) .

Dans les canaux et les alvéoles, l'épithélium mammaire est bordé par deux couches cellulaires différenciées : une couche constituée de cellules basales myoépithéliales et de cellules luminales épithéliales, et une autre composée de cellules souches et progénitrices plus ou moins différenciées (figure5) (**bab & yelles chaouche; Charafe-Jauffret et al., 2007; Deugnier et al., 2007**) .

La cohésion entre ces deux couches est assurée par des interactions intercellulaires ; dans lesquelles interviennent des molécules d'adhérence appartenant à la famille des cadhérines et

par des interactions cellulaires avec la membrane basale principalement assurées par des intégrines (Charafe-Jauffret *et al.*, 2007).

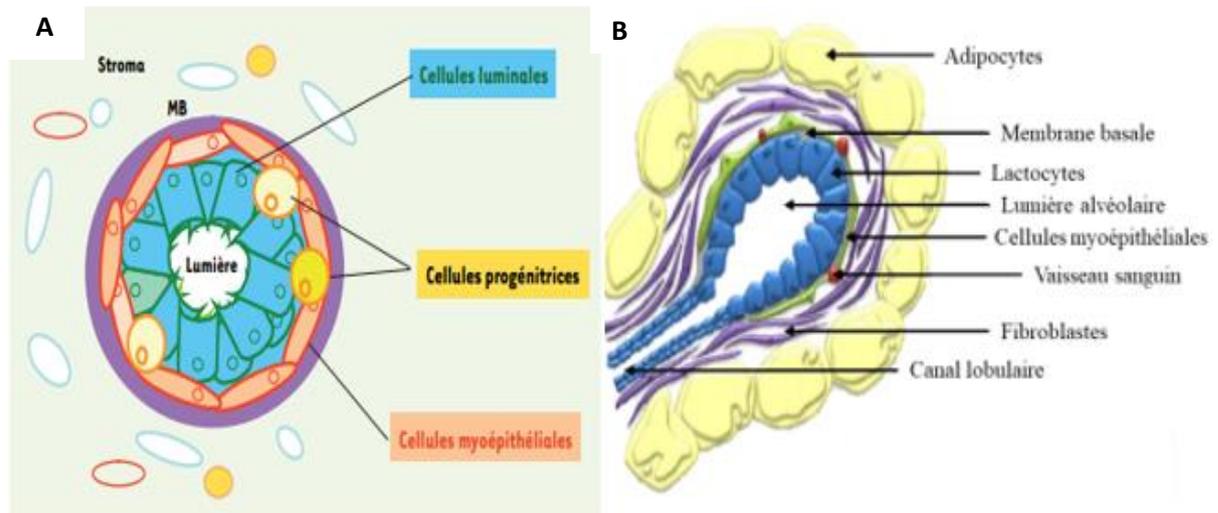


Figure 5 : A ; Schéma d'un canal mammaire représenté en coupe, B ; Schéma d'une alvéole ou acinus mammaire représenté en coupe. (Site internet, (Servin-Vences *et al.*, 2018))

Le sein est parcouru par de nombreux vaisseaux lymphatiques ; ces vaisseaux lymphatiques permettent le transport de la lymphe jusqu'aux ganglions lymphatiques, impliqués dans le système immunitaire, par la lutte contre les infections. Il existe différents types de ganglions (figure 6) (Guyot, 2021).

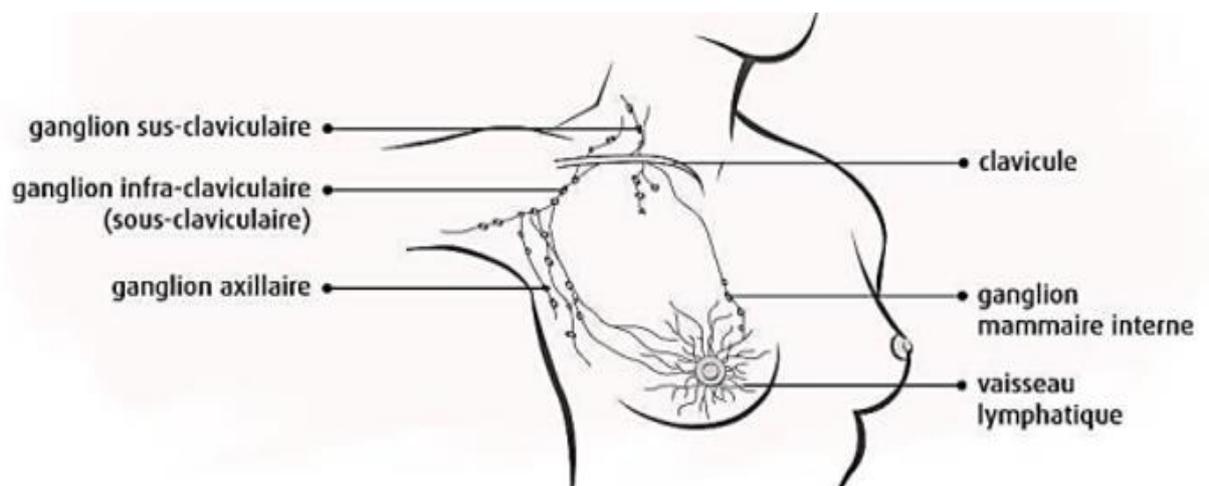


Figure 6 : Situation anatomique des ganglions lymphatiques du sein (Guyot, 2021).

III. Le cancer du sein

III.1 La cancérogenèse

Le développement du cancer est à voie multiple, il englobe une étiologie multifactorielle, des altérations multiétages et multigéniques.

Le processus de cancérogenèse consiste en plusieurs événements moléculaires et cellulaires et comprend les trois étapes principales : L'initiation, la promotion et la progression (figure7).

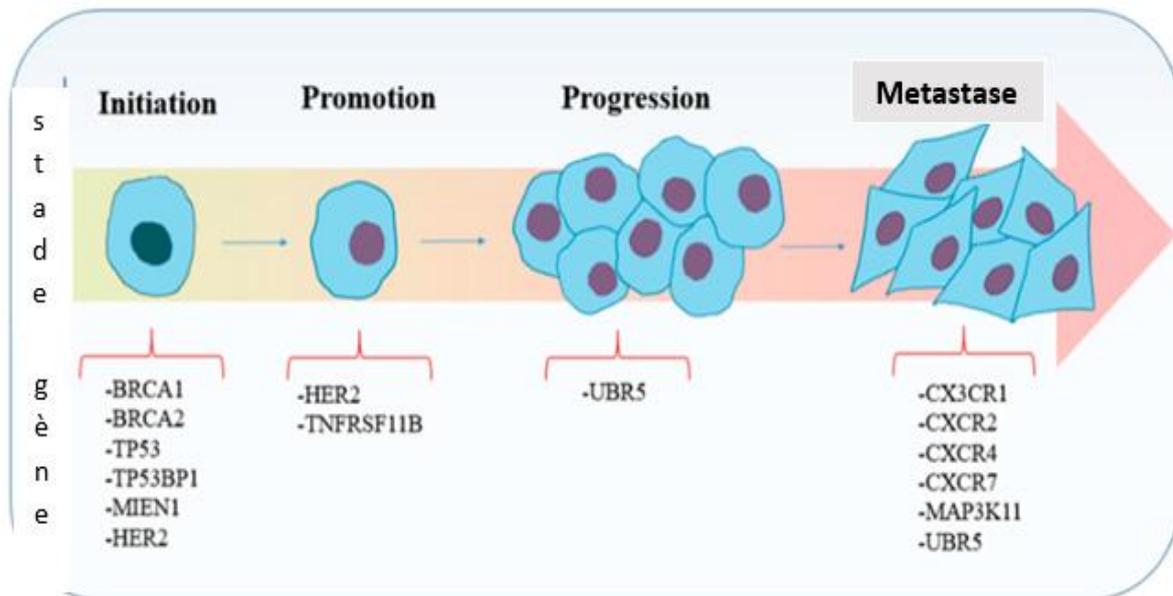


Figure7 : Les processus moléculaires, cellulaires et pathologiques qui interviennent dans la transformation d'un tissu sain en lésions préinvasives (Ahmed et al., 2021).

La majorité des changements qui donnent naissance au cancer, notamment l'accumulation de modifications génétiques, l'expression d'oncogènes et la perte de la régulation normale du cycle cellulaire, semblent s'être produits au moment où le carcinome canalaire *in situ* est présent. La plupart des caractéristiques cliniques d'un cancer du sein invasif ultérieur sont déjà déterminées à ce stade, bien que des événements supplémentaires, notamment l'invasion des tissus et les changements dans le stroma environnant, caractérisent la tumeur invasive (figure8) (Burstein et al., 2004).

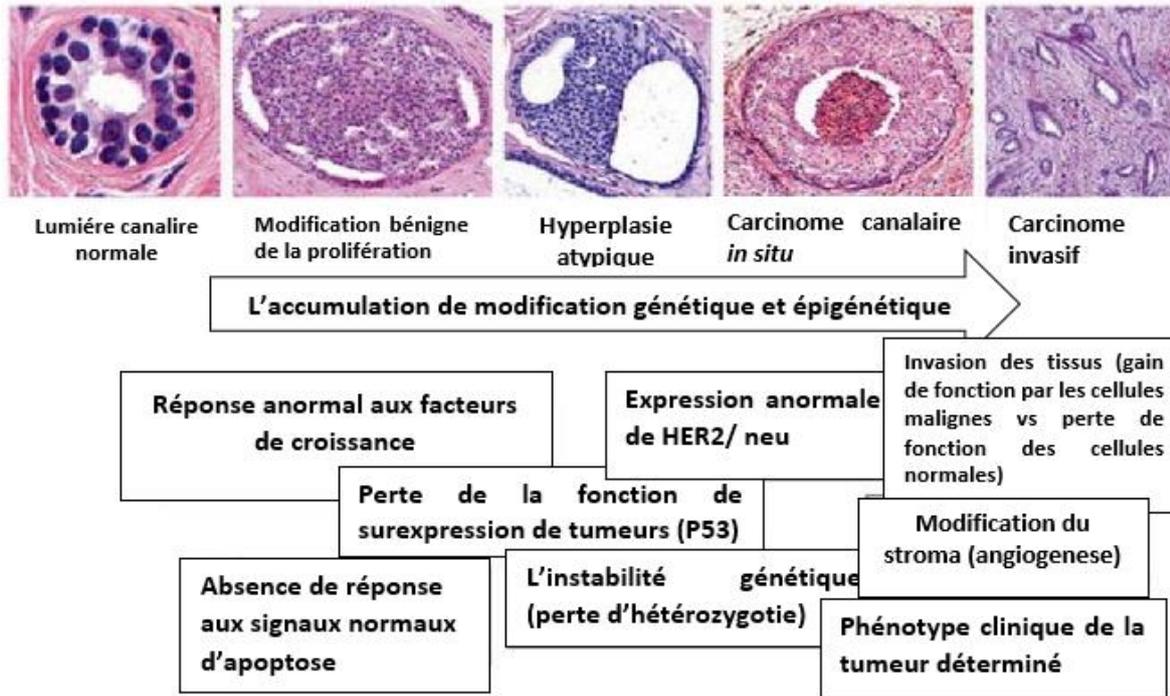


Figure 8 : Evénements pathologiques associés au carcinome canalaire *in situ* (Burstein et al., 2004).

L'invasion tumorale est facilitée par l'angiogenèse, qui est la formation de nouveaux vaisseaux sanguins à partir du système vasculaire existant destinés à répondre aux besoins métaboliques des tumeurs et à l'hypoxie. C'est un processus complexe impliquant un large éventail de signaux moléculaires. Ceux-ci incluent des facteurs qui stimulent la prolifération par la sécrétion des facteurs proangiogéniques VEGF et BFGF par les cellules tumorales, la migration, l'assemblage des cellules endothéliales ainsi que le recrutement de cellules péri vasculaires et le remodelage de la matrice extracellulaire (figure9) (Banerjee et al., 2007).

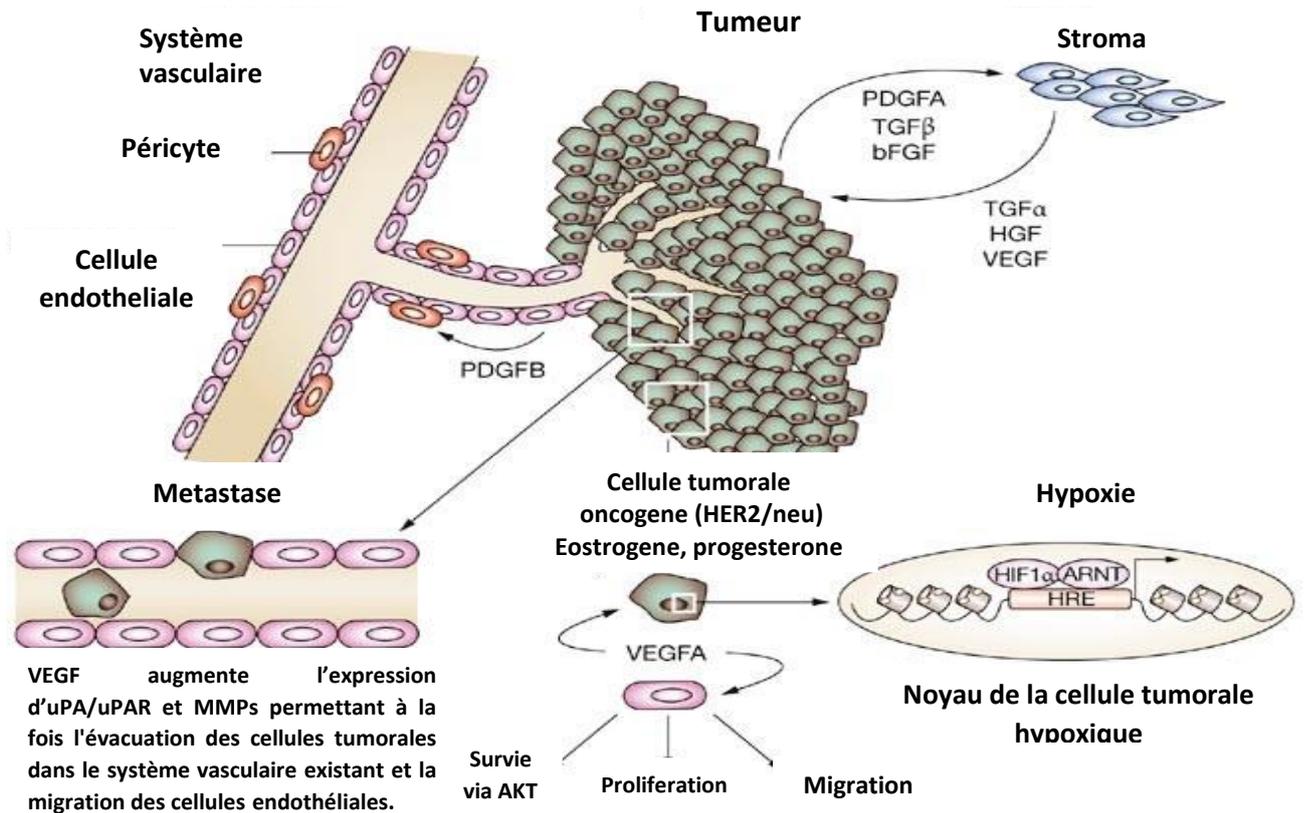


Figure 9 : Les facteurs influençant l'angiogenèse tumorale (Banerjee et al., 2007).

L'invasion tumorale qui permettra le développement métastasiq ue débute par la dégradation protéolytique de la matrice extracellulaire MEC, elle est assurée principalement par les métalloprotéase MMP (MMP7, MMP1, MMP9 et MMP21), qui induit la libération de nombreuses cytokines et facteurs de croissance (IL-6, EGF, VEGF), jouant un rôle chimioattractant pour les cellules tumorales (figure9). Elle est suivie de la migration par le détachement de ces cellules suite à la perte de l'interaction cellule MEC due à des mutations au niveau des gènes codant les molécules d'adhérences (E-cadhérine, sélectine et intégrines) tels que CD324, ITGB2. Les cellules tumorales traversent l'endothélium des vaisseaux sanguins ou lymphatiques (extravasation), elles sont ensuite transportées dans la circulation sanguine ou lymphatique à distance de la tumeur primitive jusqu'au niveau de l'endothélium de l'organe cible pour former une tumeur secondaire appelée (métastase) (figure10) (Liang et al., 2020) .

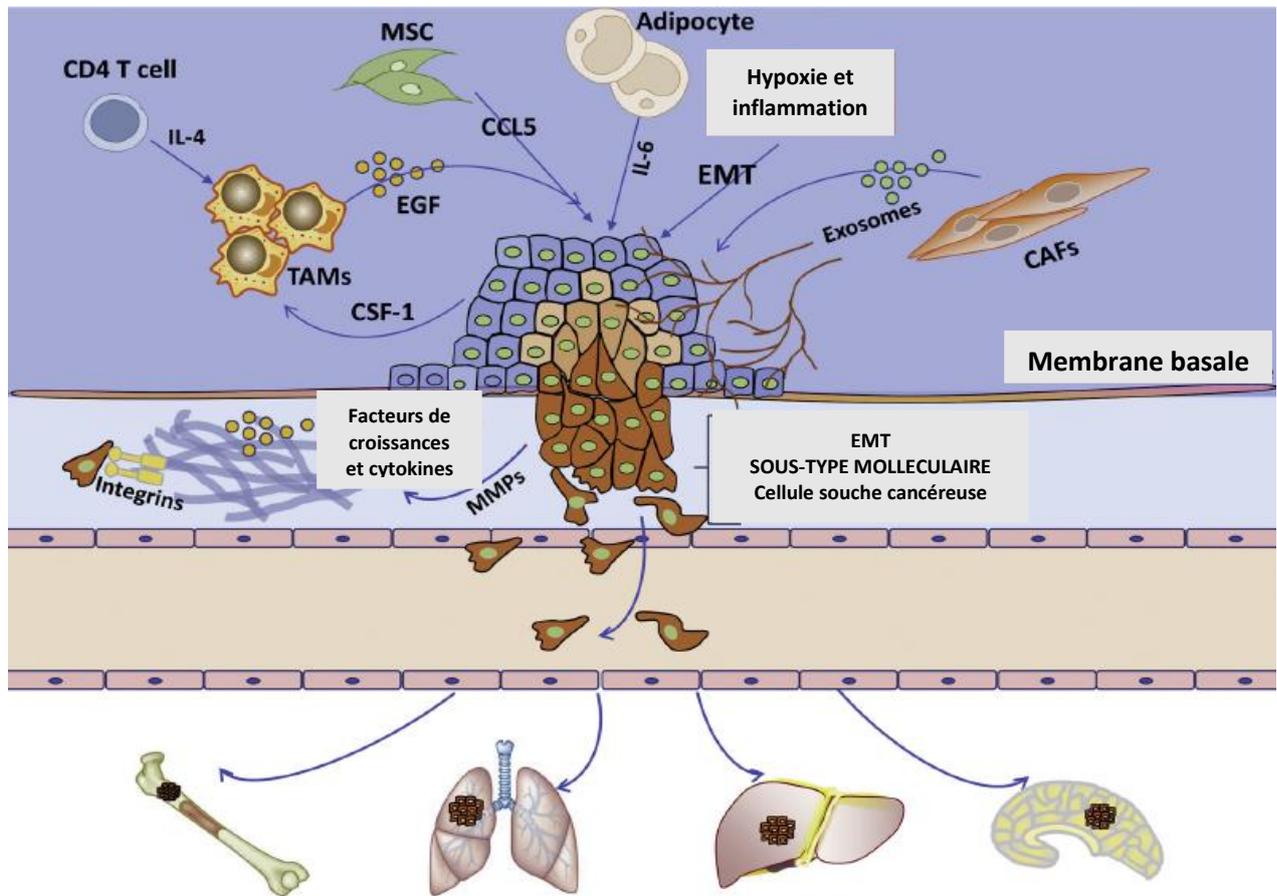


Figure 10 : L'organigramme des métastases précoces du cancer du sein (Liang *et al.*, 2020).

III.2 Le microenvironnement des cellules tumorales du cancer de sein

Le microenvironnement des cellules tumorales (ETM) du cancer du sein comprend différentes cellules, y compris les fibroblastes, les adipocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, et sécrète différents facteurs de croissance et cytokines qui régulent la croissance et le développement des cellules tumorales (figure 11). Une diapason dynamique entre les composants stromaux et la tumeur est indispensable pour la progression et la croissance tumorale.

Le moindre changement dans les constituants peut influencer le développement, la sévérité et la croissance d'un cancer du sein. D'où l'importance de ce microenvironnement, que l'on retrouve très hétérogène entre les ethnies, ou les différentes populations étudiées (Charan *et al.*, 2020).

III.3 Les cellules souches mammaires dans le cancer du sein

Les cellules souches mammaires (CSM) ont une grande importance dans le développement et la reconstitution des glandes mammaires, grâce à leur capacité d'autorenouveauement et leur potentiel de réplication. Une CSM bi-potente ou multipotente donne naissance à des cellules progénitrices bi-potentes qui se divisent ensuite et se différencient en cellules luminales (canalaires et alvéolaires) et basales matures de l'épithélium mammaire adulte.

Les cellules sont caractérisées par l'expression de différents marqueurs de surface ce qui permet l'identification phénotypiques des sous populations (Luminale A et B, normal-like, basal-like).

La dérégulation de l'autorenouveauement des CSM peut contribuer à la préneoplasie de la glande mammaire. En particulier, la dérégulation des voies de signalisations conservées, tels que Wnt, Notch et Hedgehog, est liée à l'oncogenèse (figure 11). Lors de l'oncogenèse, les cellules ciblées par la transformation maligne pourront être soit les cellules souches qui vont se transformer en cellules cancéreuses en gardant les caractéristiques des cellules souches d'épithélium normale pour guider la tumorigénicité et la capacité à se différencier, soit les progénitures des cellules normales, elles réacquièrent la propriété d'auto-renouveauement (Zarzynska, 2017).

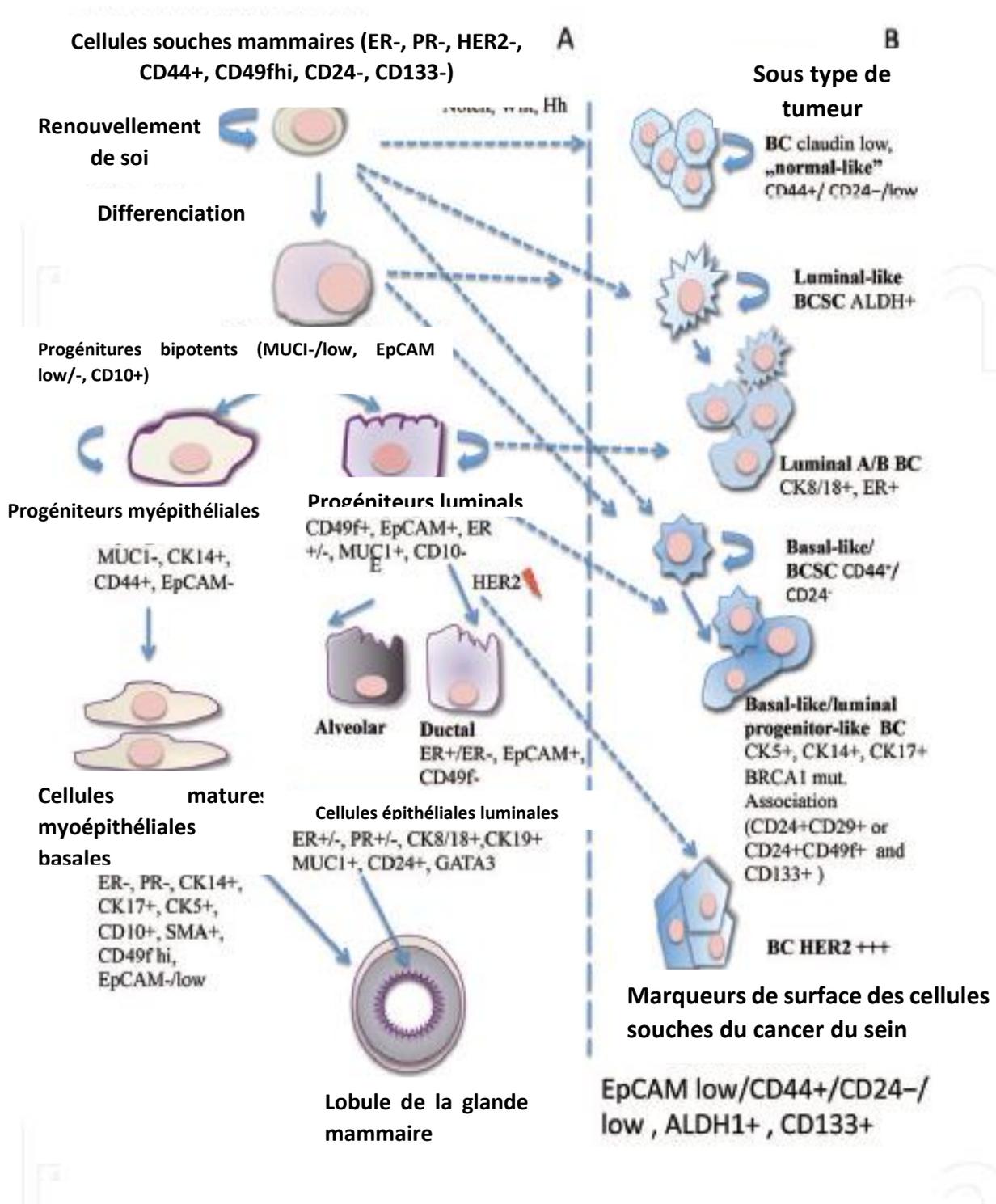


Figure 11 : Schéma simplifié du modèle hiérarchique des cellules souches de la glande mammaire humaine(A) et la corrélation des cellules souches avec les sous-types de cancer du sein (B) (Zarzynska, 2017).

III.4 Facteurs de risques

III.4.1 Facteurs de risque génétiques

Au niveau cellulaire, ils résultent de l'accumulation de mutations et de dérèglements de l'expression de certains gènes impliqués dans des processus essentiels à la carcinogenèse comme le contrôle de la prolifération et de la différenciation, l'acquisition de l'immortalité cellulaire et du potentiel métastatique, propriété d'invasion du tissu de voisinage et d'échappement au système immunitaire. Ces gènes altérés peuvent être schématiquement regroupés en trois grandes catégories (**Viassolo et al., 2016**) :

a) Inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs :

Ils se comportent comme des inhibiteurs du cycle cellulaire ; leurs mutations occasionnant habituellement une atteinte biallélique aboutissent à une perte de fonction. Les protéines nucléaires BRCA1 et BRCA2 sont multifonctionnelles, impliquées entre autres dans la réparation des dommages de l'ADN (mécanisme de recombinaison homologue) et le maintien de l'intégrité du génome (figure 13), et représente 5-10% des cancers mammaires (**Viassolo et al., 2016**). Les protéines BRCA1/2 sont directement ou indirectement phosphorylées par les kinases ATM/ATR en réponse aux lésions de l'ADN, qui interagissent avec p53 pour arrêter le cycle cellulaire en activant le promoteur p21Cip1/WAF1 (figure 13).

La PIK3CA gène de la sous-unité catalytique alpha de la phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase (PIK3CA) code pour la protéine p110 α , la sous-unité catalytique de PI3K qui active les cascades de signalisation impliquées dans la croissance, la survie, la prolifération, la motilité et la morphologie des cellules (figure 13).

Et dans des cas plus rares il s'agit des mutations au niveau des gènes TP53 (essentiel dans le contrôle du cycle cellulaire). D'autres gènes peuvent intervenir aussi comme : (**Lehmann-Che et al., 2007; Yang et al., 2015**).

Le gène PTEN (Phosphatase and TENsin homolog), un gène suppresseur de tumeur. La protéine PTEN est une phosphatase qui hydrolyse le phosphate situé en position 3 du phosphatidylinositol (3, 4, 5)-triphosphate (PIP3), ce qui lui confère un rôle de régulateur négatif de la voie de signalisation intracellulaire contrôlée par la phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) (**Lehmann-Che et al., 2007**) .

ATM impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, l'apoptose, le stress oxydatif et le maintien des gènes de l'ataxie-télangiectasie (AT).

PALB2 est un gène codant pour une protéine partenaire essentielle à la fonction de BRCA2 dans la réparation des cassures double-brin de l'ADN par recombinaison homologue.

CHEK2 codent pour une protéine jouant un rôle au niveau de la régulation du cycle cellulaire, il est impliqué dans la même voie de signalisation que TP53 et BRCA1. BARD1 codent pour une protéine qui interagi avec la région N-terminale de BRCA1 (Lehmann-Che et al., 2007; Yang et al., 2015) .

Les gènes somatiques les plus fréquemment mutés sont la PIK3CA, BRCA2, BRCA1, TP53 (figure 13).

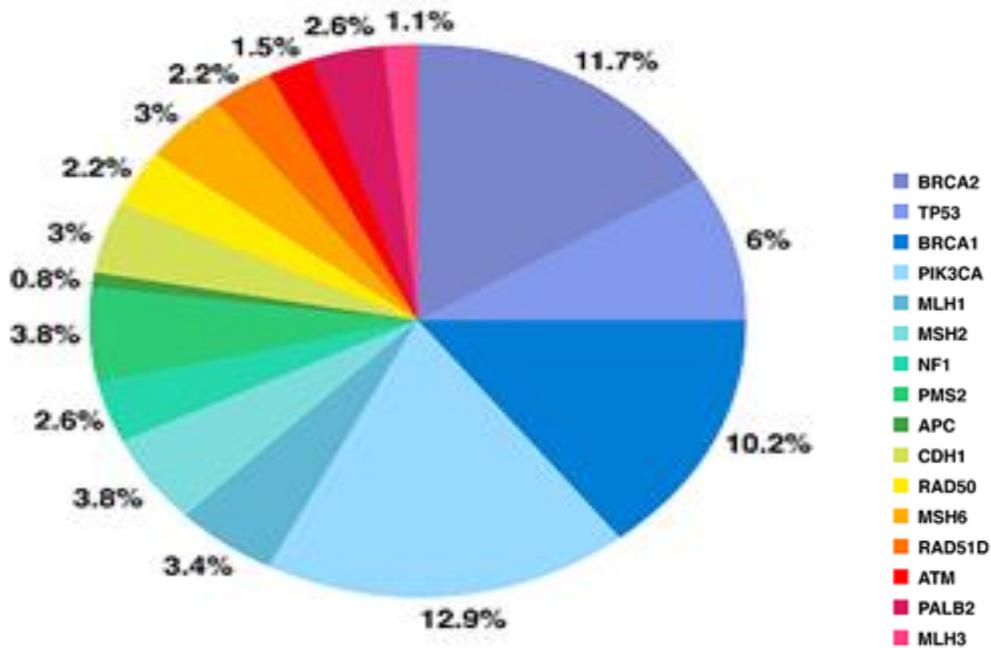


Figure 12 : La fréquence relative des mutations dans les gènes du cancer du sein. (Bray et al., 2018)

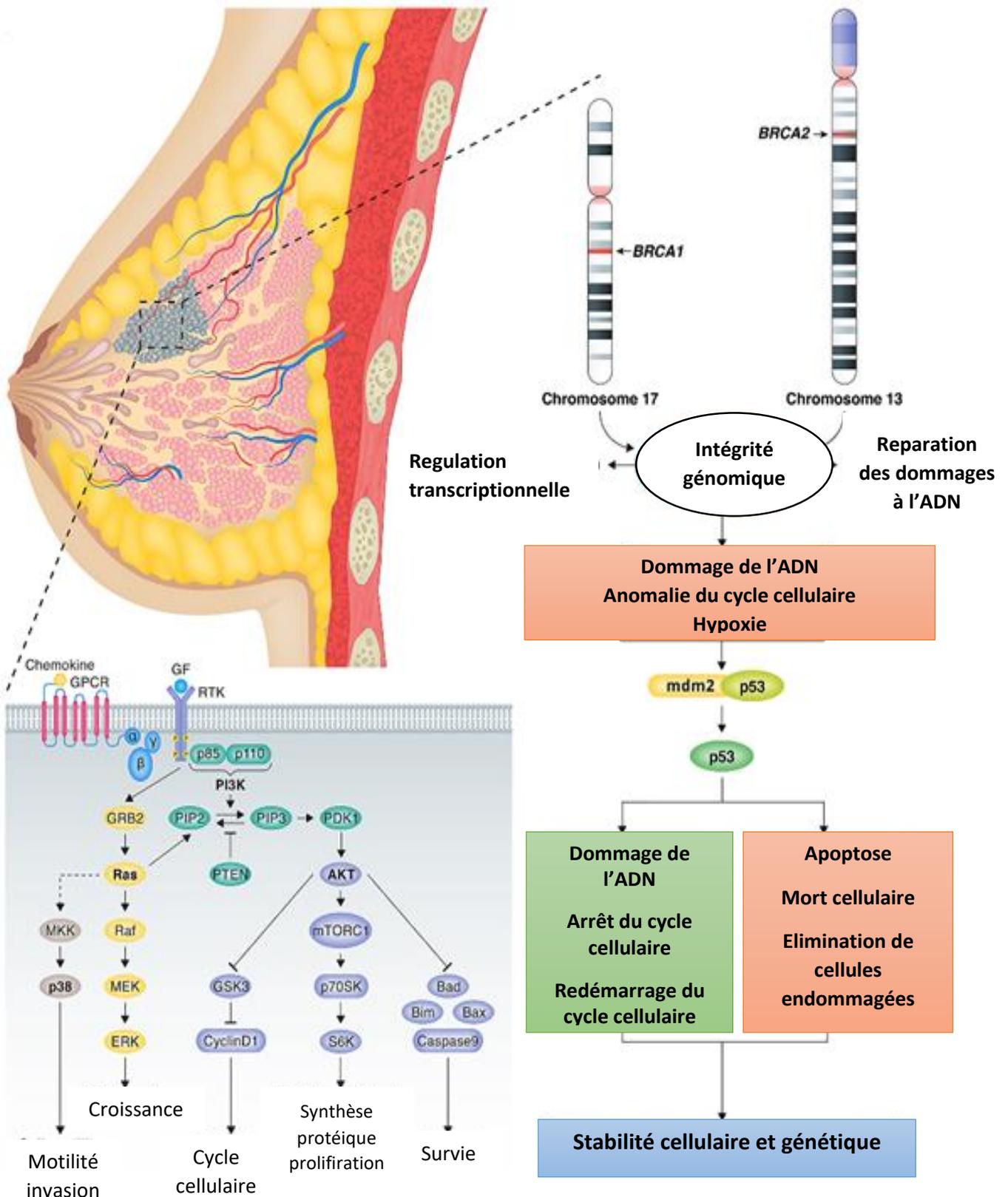


Figure 13 : BRCA1, BRCA2 et TP53 dans la voie de réparation des dommages à l'ADN entraînant une instabilité cellulaire et génétique. Effets de la voie cellulaire PIK3CA sur le cycle cellulaire, le caractère invasif et la survie (Barakeh et al., 2021).

b) Activation des proto-oncogènes

L'activation des oncogènes implique des modifications génétiques des proto-oncogènes cellulaires. La conséquence de ces altérations génétiques est de conférer un avantage de croissance à la cellule. Trois mécanismes génétiques activent les oncogènes dans les néoplasmes humains : (1) mutation, (2) amplification génique et (3) réarrangements chromosomiques (**Frei III & Eder, 2003**). Ces mécanismes entraînent soit une altération de la structure du proto-oncogène, soit une augmentation de l'expression du proto-oncogène dans les voies signalétiques. Nous pouvons distinguer deux voies dont la principale est celle de Her2. Il existe 03 oncogènes qui sont les plus couramment activés dans les tumeurs mammaires via cette voie :

- Er-bb2 qui code pour des récepteurs transmembranaires Her2 et leur activation par amplification entraîne une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire (surexprimé dans 15 à 30% des cas de cancer du sein) (**Moasser, 2007**).
- MYC code pour une phosphoprotéine nucléaire c-myc qui joue un rôle dans la progression du cycle cellulaire, l'apoptose et la transformation cellulaire (**Benichou, 2021**).
- CCND1 code pour la protéine cycline D1 qui est impliquée dans la progression du cycle cellulaire en formant un complexe avec CDK4 et CDK6 pour phosphoryler Rb et libérer les protéines E2F qui régulent la transition G1-S.). La cycline D1 est un régulateur négatif pour la Dma 1, cependant, elle agit en synergie avec la Dmp1 sur le promoteur de l'Arf. Elle peut également avoir un impact sur les récepteurs des hormones stéroïdes, en activant le récepteur des œstrogènes (RE) et en inhibant le récepteur des androgènes dans l'épithélium mammaire (figure 14) (**Valla et al., 2022**) .

D'autres voies oncogéniques peuvent être activées comme celle médié par le VEGF qui présente une activité mitogène en stimulant les voies Ras-Raf-Mapk et PI3K qui induit l'activation d'Erk entraînant l'activation du promoteur de la cycline D1 par les facteurs de transcription Fos /Jun /Ets (figure 14). Cette voie peut aussi entraîner une action anti-apoptotique renforcée par l'inhibition des protéines pré-apoptotique (par exemple Bad et GSK3) via l'activation de la voie PI3K-AKT (**Taneja et al., 2010**).

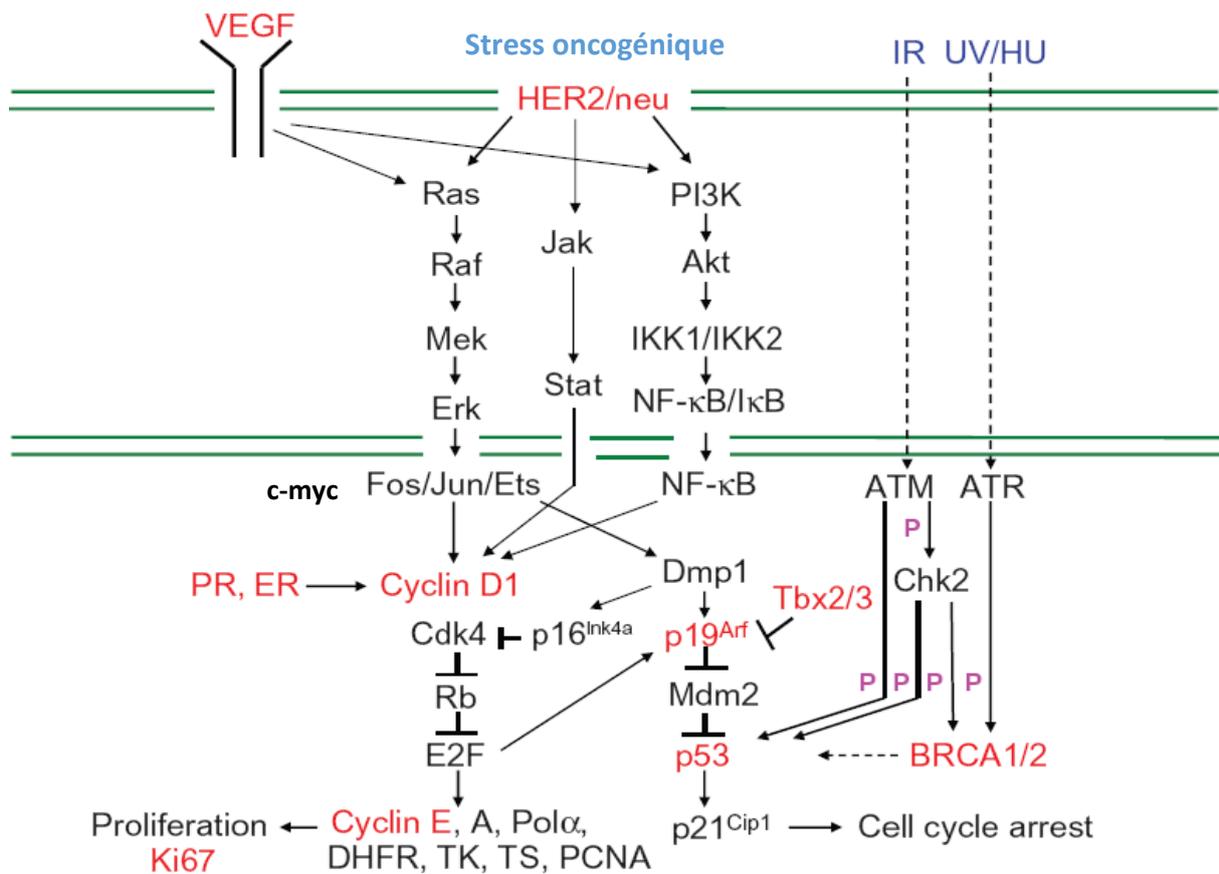


Figure 14 : Voies de signalisation impliquant des marqueurs moléculaires du cancer du sein humain. Les lignes vertes indiquent les membranes cytoplasmiques et nucléaires (modifié) (Taneja et al., 2010).

III.5 Classification du cancer du sein

III.5.1 Classification histologique

Fondée sur les caractéristiques morphologiques et anatomopathologiques des tumeurs, elles peuvent se présenter dans des zones distinctes du sein, telles que les canaux, les lobules ou les tissus intermédiaires. En fonction de l'origine cellulaire impliquée, le cancer du sein est subdivisé en : cancer canalaire et cancer lobulaire. Et selon le caractère invasif, les tumeurs peuvent être divisées en : non invasifs (ou *in situ*), la tumeur se développe à l'intérieur des canaux, et invasif (ou infiltrant), les cellules se propagent à l'extérieur des lobules et canaux mammaire dans le tissu stromal mammaire environnant (Manse & Boisserie-Lacroix, 2020; Yang et al., 2015) .

Une des exceptions, la maladie de Paget qui est une affection rare qui accompagne 1 à 4 % des cancers du sein. Elle correspond à l'infiltration de l'épiderme du mamelon par des cellules de type adénocarcinome. Cliniquement, elle se traduit par des éruptions eczématiformes au

niveau du mamelon et de l'aréole. Environ la moitié des cellules sont positives pour les récepteurs des œstrogènes et de la progestérone, et la plupart des cellules sont positives pour la protéine Her2 (Mkhinini et al., 2016).

III.5.2 Classification TNM

La classification TNM est la plus fréquemment utilisée, elle repose sur 3 critères :

- «T» pour la taille et l'infiltration de la tumeur, allant de Tx (tumeur non évaluable) à T4.
- «N» pour le degré d'envahissement des ganglions lymphatiques, allant de Nx (envahissement des ganglions non évaluable) à N3.
- « M » pour la présence ou non de métastases à distance : avec Mx (renseignements insuffisants pour classer les métastases), M0 (absence de métastase) ou M1 (présence de métastases) (Valla et al., 2022) .

III.5.3 Classification moléculaire

Est basée sur l'expression génique puis sur le profil protéique et a permis de distinguer plusieurs groupes moléculaires : Luminal A, Luminal B, HER2+ et Triple négatif (figure 15)(Fouad et al., 2012).

- Luminal A** : correspond aux tumeurs exprimant fortement les récepteurs hormonaux et ayant un grade faible et une évolution lente (Fouad et al., 2012).
- Luminal B** : caractérisé par une expression plus faible de récepteurs hormonaux et un grade plus élevé avec deux sous type Her2+ et Her2- (Fouad et al., 2012).
- Profil Her2** : caractérisée par une surexpression de HER2 due à l'amplification du gène *erbb2*, responsable de l'augmentation des capacités de prolifération et de croissance des cellules tumorales (Yang et al., 2015).
- Profil basal-like (Triple négatif)** : caractérisé comme œstrogène (ER-) négatif, progestérone (PR-) négatif et Her2- négatif. Plus fréquent chez les femmes porteuses de mutations du gène BRCA1 et P53, et se comporte généralement de manière plus agressive que les autres types de cancer du sein (Fouad et al., 2012).

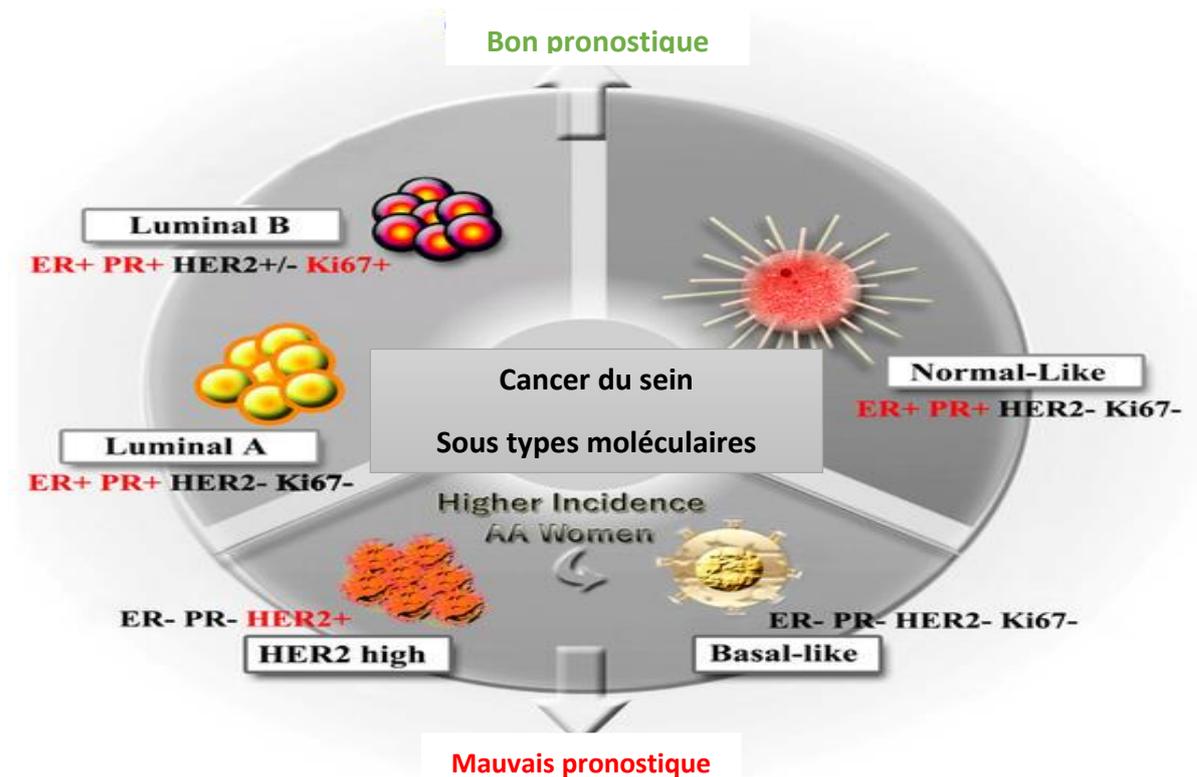


Figure 15 : Différents sous-types moléculaires de cancer du sein (Charan et al., 2020).

III.7 Diagnostic

Il se fait par 3 types d'examen

-Examen clinique

Est l'étape première de toute exploration de la glande mammaire. Un interrogatoire sera proposé à la patiente de ses symptômes, des facteurs de risque qu'il a (prise d'alcool, surpoids, tabac, prise de pilule, alimentation), ses antécédents personnels et familiaux de tumeur du sein surtout maligne, mais aussi tumeur de l'ovaire, endomètre et colique..., les antécédents gynéco-obstétricaux, des traumatismes mammaires....(CAID & Smaili, 2018).

Un examen clinique s'en suit qui lui permettra de définir la taille, la mobilité, la localisation de la tumeur mais aussi l'aspect de la peau et la forme du mamelon et de l'aréole, la présence ou non de ganglions anormaux et une éventuelle formation de métastases qui se manifestent essentiellement par des douleurs osseuses pour le cancer du sein (CAID & Smaili, 2018).

-Examen complémentaires

Basé principalement sur l'imagerie comme la mammographie, l'Echographie mammaire et/ou l'Imagerie par résonance magnétique (IRM) (CAID & Smaili, 2018).

-Examen anatomopathologiques

Tous les cancers ne sont pas détectés par imagerie, on a donc recours à un prélèvement afin de réaliser un examen anatomopathologique qui donne des informations précises sur le type de cancer du sein, le grade histologiques SBR, le pourcentage de carcinome *in situ* éventuellement associé et son grade nucléaire, avec la présence ou non des micro invasion, présence d'embolies vasculaires seront établies (CAID & Smaili, 2018).

Des études complémentaires comme l'immunohistochimie peuvent être requises afin d'affiner le diagnostic comme pour la détermination des marqueurs tumoraux impliqués et donc le type du cancer (CAID & Smaili, 2018).

III.7 Marqueurs biologiques et moléculaires

III.7.1 Les récepteurs hormonaux

Les récepteurs des œstrogènes (RE) sont des récepteurs membranaires (principalement des récepteurs couplés aux protéines G) et des récepteurs nucléaires de type alpha ($ER\alpha$) et de type bêta ($ER\beta$). Les $ER\alpha$ et les $ER\beta$ sont des facteurs de transcription qui activent ou répriment l'expression des gènes cibles après translocation dans le noyau. Les cellules cancéreuses du sein ont une expression relativement élevée de $ER\alpha$ qui joue un rôle majeur dans la pathogenèse des cancers du sein, environ 75 % des cancers du sein ont une expression positive de ce type spécifique de récepteur hormonal, tandis que le tissu mammaire normal exprime fréquemment $ER\beta$ et le niveau diminue avec la progression des tumeurs mammaires (Poulard et al., 2010; Yang et al., 2015).

Dans la cellule, il existe plusieurs voies de signalisation d' $ER\alpha$ (figure16) :

- Une voie dite génomique directe (voie a) où $ER\alpha$ fixé à son ligand et dimérisé se fixe sur l'ADN au niveau de ses éléments de réponse (ERE), puis recrute des corégulateurs primaires et secondaires qui vont permettre d'activer la transcription des gènes cibles. Ou indirectement via une interaction protéine-protéine avec d'autres facteurs de transcription sur leurs sites de réponse à l'ADN (par exemple les membres des complexes de transcription AP-1 ou SP-1 sur les sites AP-1 ou SP-1).
- Une voie indépendante des œstrogènes (voie b) mais dépendante d'hormones, telles que l'EGF (epidermal growth factor) et l'IGF (insulin growth factor) qui activent des kinases qui elles-mêmes activent $ER\alpha$, en le phosphorylant.

-Une voie non génomique (voie c) le récepteur recrute des protéines kinases qui activent différentes voies de signalisation (Nagaraj et al., 2015).

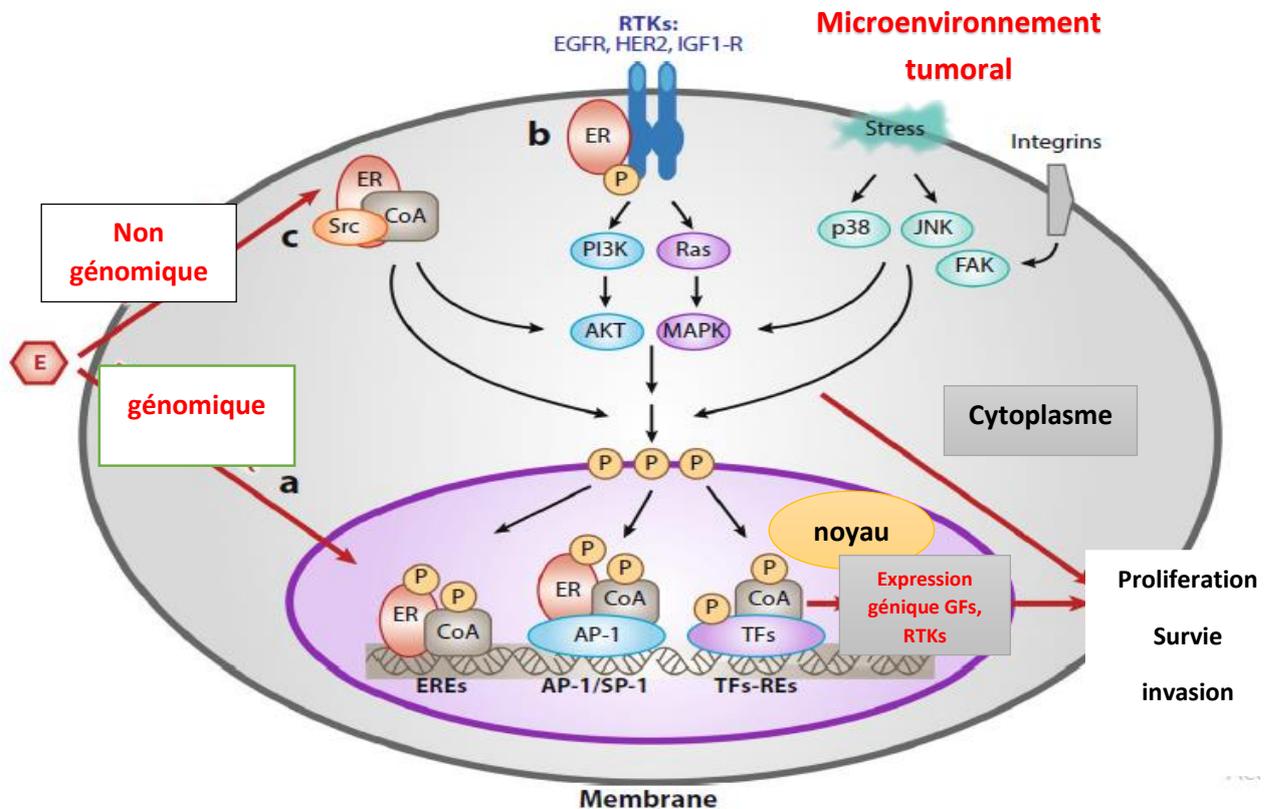


Figure 16 : Mécanismes d'action des récepteurs aux œstrogènes (RE) dans le cancer du sein (Nagaraj et al., 2015).

L'un des mécanismes les mieux caractérisés par lesquels ER α favorise la croissance des cellules tumorales mammaires est son interaction avec la cycline D1. Le complexe ER α /E2 (œstradiol) interagit avec la protéine tyrosine kinase Src, la sous-unité p85 de la PI3K et d'autres protéines accessoires, formant ainsi un macrocomplexe qui entraîne l'activation de cascades de signalisation, dont celle des voies MAPK et Akt. Ces voies de signalisation régulent la prolifération cellulaire, notamment par l'activation de la transcription de gènes comme celui qui code la cycline D1. La cycline D1 est un activateur important des kinases dépendantes de la cycline (CDK) 4 et 6, qui coordonne la transition du cycle cellulaire de la phase G1 à la phase S dans de nombreuses cellules cancéreuses (Canda et al., 2018; Poulard et al., 2010).

III.6.2 P53

Suppresseur de tumeur p53, codé par le gène TP53. Les mutations somatiques de ce gène sont courantes dans les cancers. Certaines mutations de p53 conduisent à ce que p53 devienne oncogène par des mécanismes de gain de fonction. Dans le cancer du sein plusieurs mutations ont été identifiées, la majorité est localisée dans la zone centrale de reconnaissance de l'ADN (figure 17) (Lehmann-Che *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2015).

Un certain nombre d'études ont identifié un taux accru de mutations p53 dans les cancers survenant chez les porteurs de mutations germinales BRCA1 et BRCA2 (figure 24). De manière frappante, dans les carcinomes médullaires typiques du sein, la mutation p53 survient dans 100 % des cas (Lehmann-Che *et al.*, 2007).

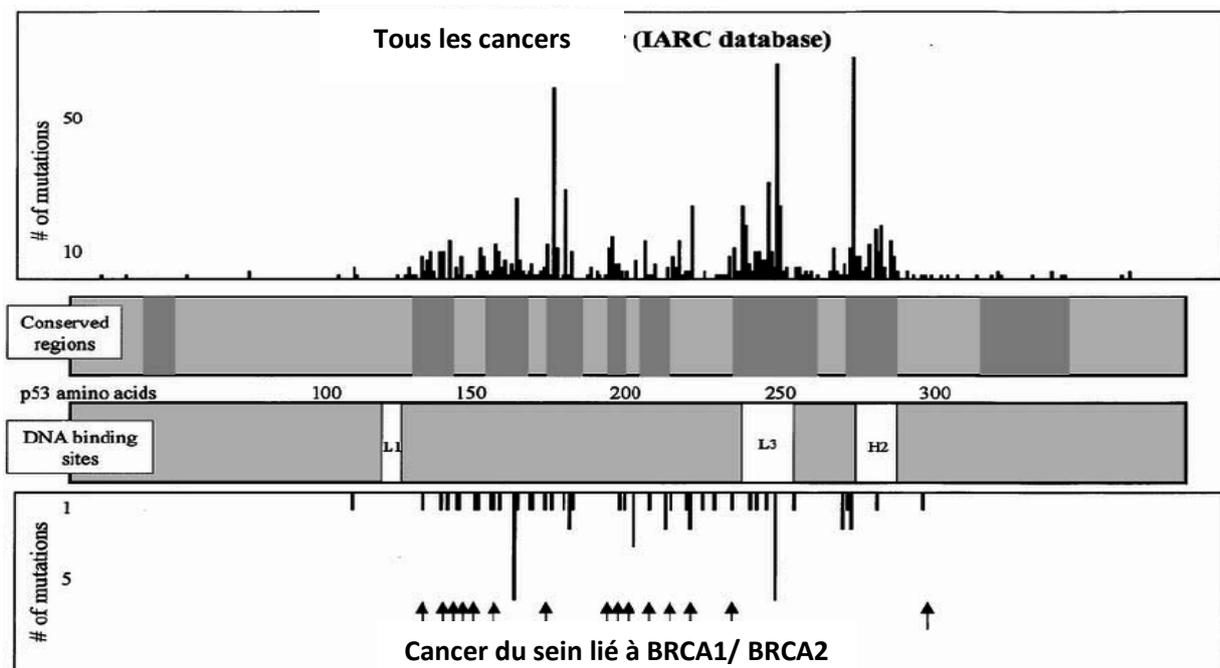


Figure 17 : carte linéaire montrant l'emplacement des mutations faux sens P53 dans les cancers du sein (Greenblatt *et al.*, 2001).

L'arrêt du cycle cellulaire piloté par p53 nécessite la transcription de p21, qui est un inhibiteur de kinase dépendant de la cycline, ou d'autres gènes cibles de p53 tels que 14-3-3s et GADD45. En général, les dommages à l'ADN ou le stress augmentent les niveaux de protéine p53, qui à son tour induit la transcription de p21 et conduit à l'arrêt du cycle. L'arrêt G1 est principalement régulé par p21, tandis que l'arrêt G2 est stimulé par GADD45, p21 et 14-3-3 cellulaire en G1, permettant aux cellules de survivre jusqu'à ce que les dommages soient réparés ou que le stress soit supprimé. P53 favorise également l'expression de l'AMPK, conduisant à la régulation négative de mTOR. La voie PI3K/Akt/mTOR peut supprimer l'apoptose et stimuler l'expression

des gènes pro-inflammatoires, qui à son tour favorise la croissance et la progression du cancer (figure 18) (Wang *et al.*, 2015) .

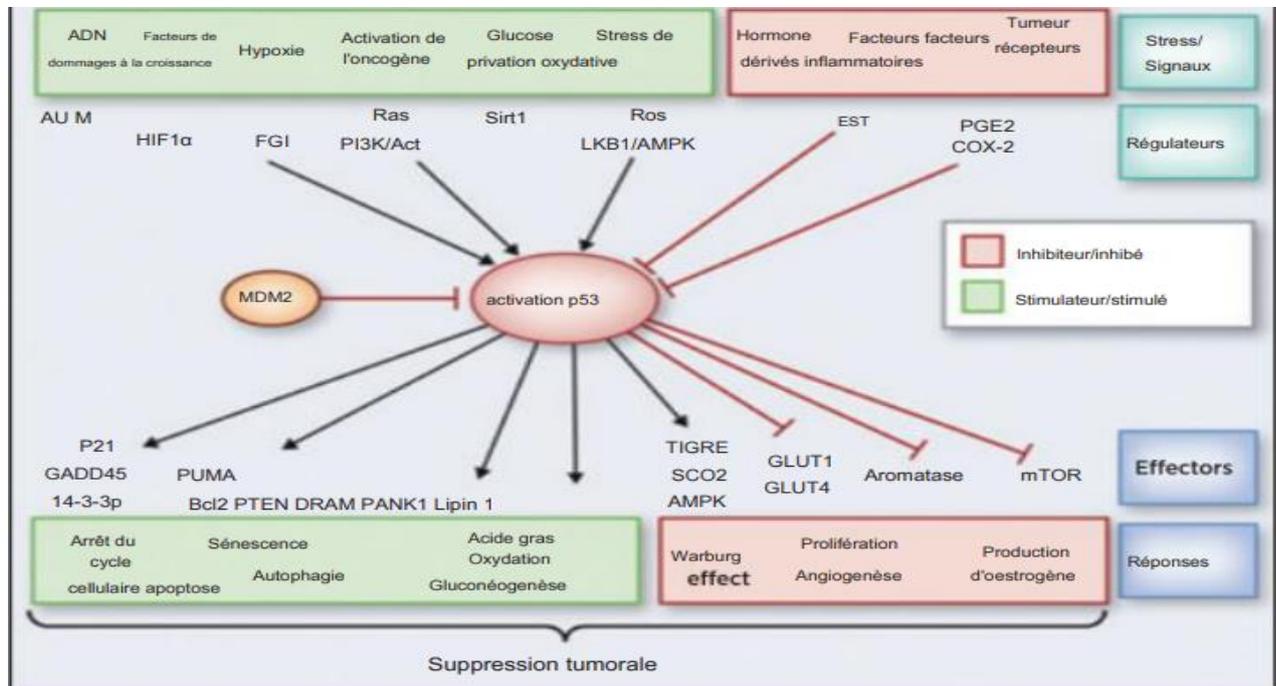


Figure 18 : Rôle et régulation de P53 dans la cancérogenèse mammaire (Wang *et al.*, 2015) .

III.6.3 Ki67

Est un antigène nucléaire humain. C'est une protéine nucléaire et un biomarqueur prolifératif codé par le gène MKI67 (figure 19), La protéine est exprimée sous forme d'isoformes de 320 et 359 kDa dérivée de variants d'ARNm à épissage différentiel initialement identifié dans les noyaux des cellules du lymphome hodgkinien (Vassilakos *et al.*, 2013) .

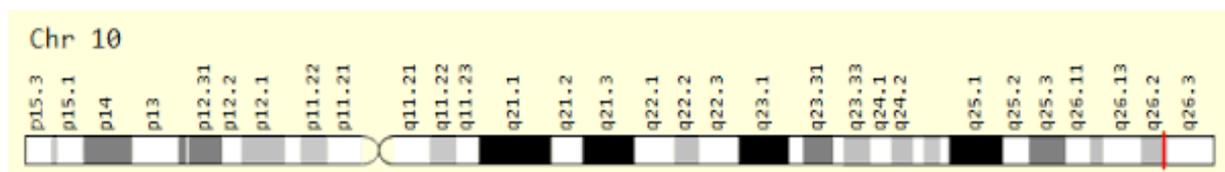


Figure 19 : Localisation de gène MKI67 sur le chromosome 10.

Les deux isoformes de Ki-67 remplissent une fonction similaire en tant que surfactant pour séparer les chromosomes mitotiques après la rupture de l'enveloppe nucléaire. En se liant à la protéine phosphatase 1, Ki-67 contribue à la formation du compartiment protéique

périchromosomique. De plus, il facilite l'attachement des chromosomes au fuseau mitotique et la mobilité des chromosomes individuels en recouvrant la surface des chromosomes et en créant un compartiment intracellulaire indépendant de la membrane. Il contribue également à l'organisation de l'hétérochromatine (Uxa *et al.*, 2021).

La quantité de Ki-67 présente à tout moment du cycle cellulaire est régulée par un équilibre précis entre synthèse et dégradation, comme indiqué par sa courte demi-vie de 60 à 90 minutes. Le Ki-67 reste actif pendant les phases G1, S, G2 et M du cycle cellulaire, ce qui en fait un excellent marqueur de la prolifération cellulaire et une caractéristique reconnue de l'oncogenèse. Pendant l'interphase, l'antigène Ki-67 peut être détecté exclusivement dans les noyaux cellulaires, tandis que dans la mitose, la majeure partie de la protéine est déplacée à la surface des chromosomes cellulaires. Le Ki-67 reste absent pendant la phase G0 au repos et les niveaux diminuent considérablement pendant l'anaphase et la télophase (figure 20) (Uxa *et al.*, 2021).

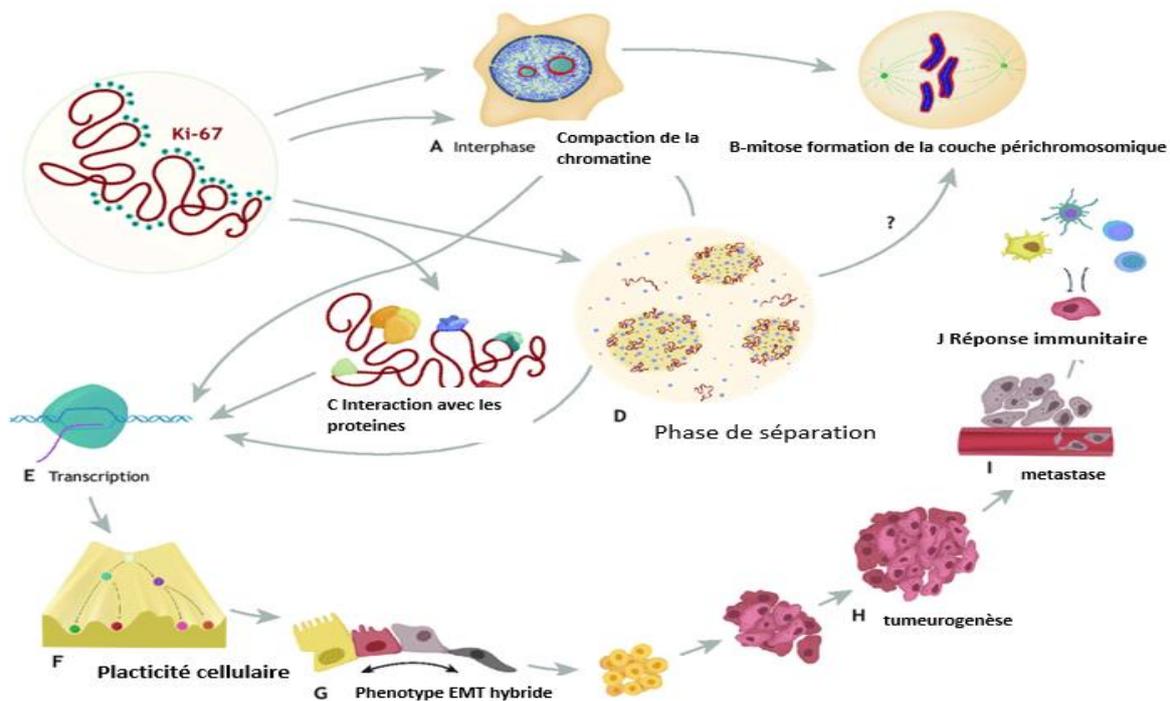


Figure 20 : Aperçu de la localisation et des fonctions du Ki-67. La localisation du Ki-67 est régulée par le cycle cellulaire. En interphase, il est localisé à l'hétérochromatine périnucléolaire et péricentromérique (A, rouge) et régule la compaction de la chromatine. En mitose, le Ki-67 se déplace à la surface des chromosomes et est responsable de la formation de la couche périchromosomique (B, rouge). Grâce à de nombreuses interactions protéine-protéine (C) et, éventuellement, à une implication dans la séparation de phase des compartiments sous-nucléaires (D). Ki67 organise l'hétérochromatine et régule les programmes transcriptionnels (E). Cela permet la plasticité cellulaire (F) et, dans les cellules cancéreuses, est nécessaire pour maintenir un phénotype hybride à l'état EMT (G). En conséquence, Ki67 est important pour la transformation cellulaire, le développement tumoral (H) et les métastases (I), ainsi que pour les réponses immunitaires anti-tumorales (J) (Andrés-Sánchez *et al.*, 2022).

Le Ki67 est surexprimé surtout dans les cancers du sein de type luminal B (figure 21). L'activité de prolifération est déterminée comme le pourcentage de cellules Ki67 positives parmi la population cellulaire globale (**Hacking et al., 2022**) :

- Prolifération faible si index < 15%
- Prolifération intermédiaire pour 16% < index < 30%
- Prolifération importante si index > 30%

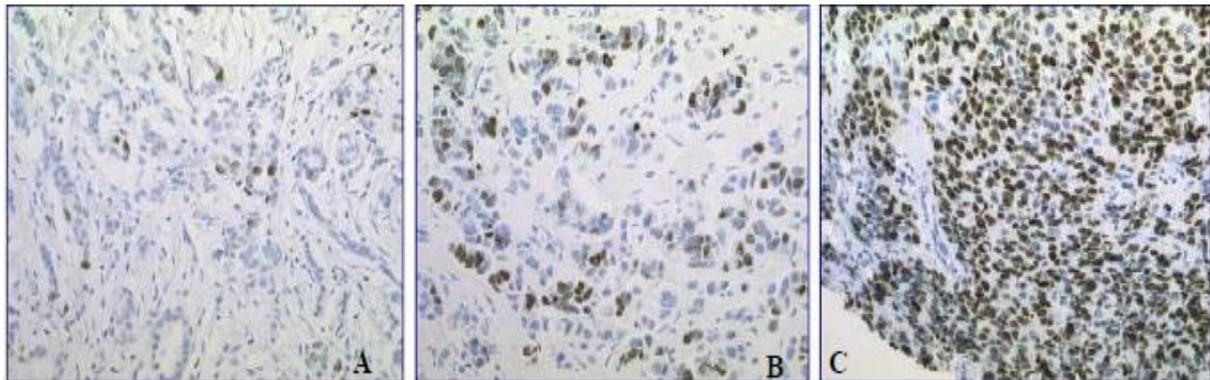


Figure 21 : Illustration des différents niveaux d'expression de Ki-67, A : Expression faible (Sous-type luminal A) ; B : Expression intermédiaire (Nécessite d'associer d'autres biomarqueurs) ; C : Expression importante (Sous type luminal B) (Hacking et al., 2022**).**

IV. Cancer du sein Her2 positif

IV.1 Oncogène Her2

L'oncogène Her2 (c-erbB2/neu) est localisé sur le bras long du chromosome 17 (en 17q1.2, de 35,109 à 35,138 Mb) a une longueur de 28 515 paires de bases (figure 22). Ce gène est un membre de la famille du récepteur à l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), famille de récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase (Her2 et cancer du sein). C'est un gène qui code pour une oncoprotéine transmembranaire à passage unique et à activité tyrosine kinase (Her) de 4626 nucléotides et de poids moléculaire 185 Kda et de 1255 acides aminés.

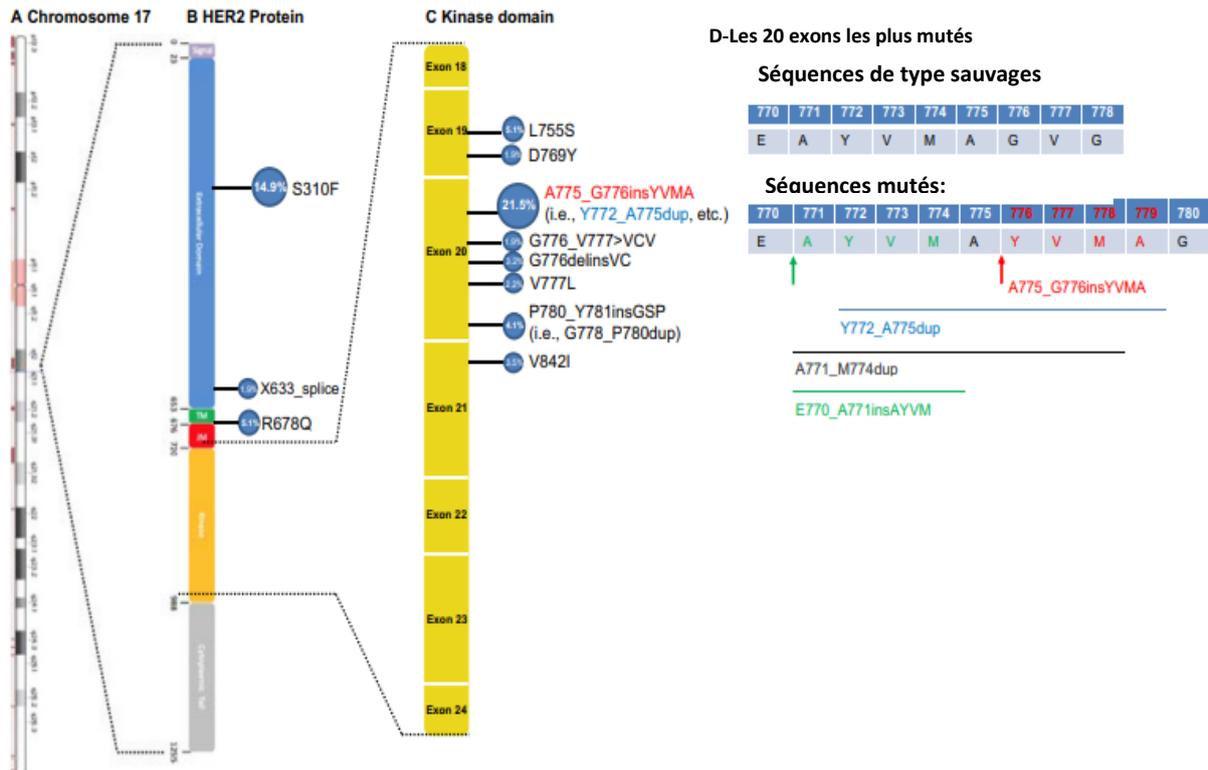


Figure 22 : (A) Le schéma illustre la localisation du gène HER2 (ERBB2) sur le chromosome 17. (B) et (C) Distribution et fréquence des mutations HER2 signalées dans le rapport de Fondation Médecine et dans la base de données cBioPortal dans le gène entier (B), et dans le domaine de la tyrosine kinase (C). (D) En fonction des mécanismes moléculaires proposés, les mutations HER2 les plus courantes sont : A775_G776 ins YVMA (insertion de l'YVMA entre A775 et G776), Y772_A775 dup (duplication de Y772-A775 YVMA), E770_A771ins AYVM (insertion de AYVM entre E770 et A771), ou A771_M774 dup (duplication de A771_M774 YVMA) (Zeng et al., 2021).

La famille des récepteurs EGFR comprend quatre récepteurs de surface cellulaire : ErbB1/EGFR/Her1, ErbB2/Her2, ErbB3/Her3 et ErbB4/Her4 (Zhang et al., 2023) . Her2 est le seul membre de la famille EGFR pour lequel aucun ligand n'a été trouvé. Cela peut s'expliquer par la structure unique du domaine extracellulaire HER2 (figure 23), qui n'est pas favorable à la liaison du ligand (Tan & Yu, 2007).

Les récepteurs ERbB sont activés par plusieurs ligands, ces ligands peuvent soit afficher une spécificité de récepteur (c'est-à-dire EGF, TGF- α , AR et Epigen se lient à l'EGFR) soit se lier à un ou plusieurs récepteurs apparentés ; les neurégulines 1–4 se lient à ErbB3 et ErbB4 tandis que HB-EGF, l'épiréguine et la β -celluline activent EGFR et ErbB4 (figure 23)(CIBLEES, 2011).

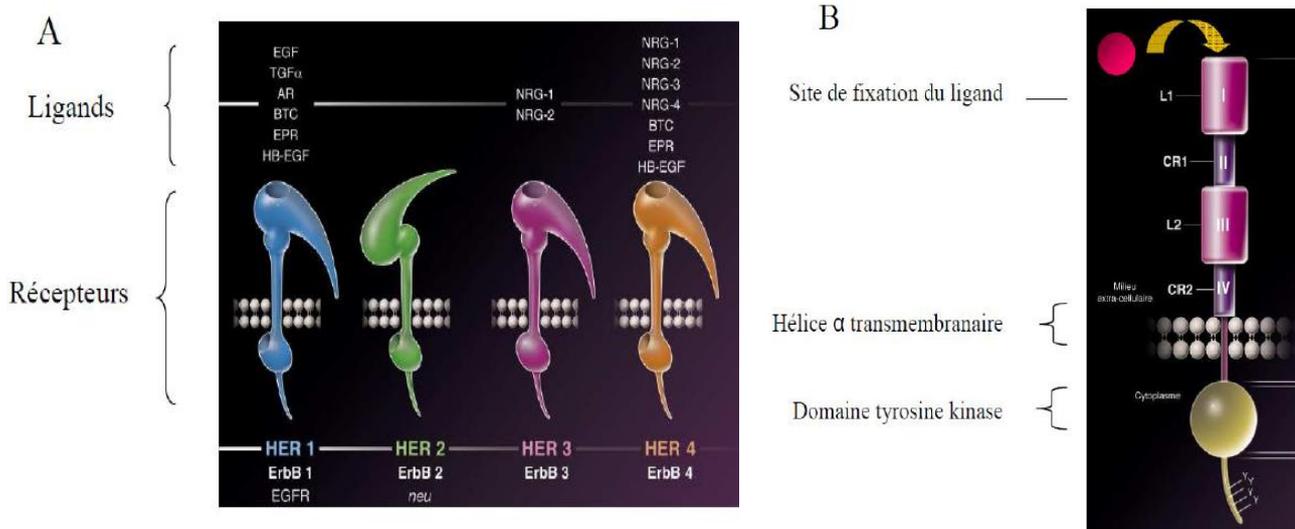


Figure 23 : A : famille des récepteur Her comprenant Her1 ou EGFR, Her2, Her3 et Her4 B : structure des récepteurs Her (CIBLEES, 2011) .

IV.2 La surexpression de Her2 dans le cancer du sein

La surexpression de la protéine Her2, soit par amplification génique, soit par dérégulation transcriptionnelle, entraîne une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire, la motilité, l'invasion, l'adhésion et l'angiogenèse. Se manifeste dans environ 25 à 30 % des cancers du sein. Les cancers du sein peuvent avoir jusqu'à 25 à 50 copies du gène Her2 et jusqu'à 40 à 100 fois l'expression de la protéine Her2, entraînant jusqu'à 2 millions de récepteurs exprimés à la surface des cellules tumorales (figure 34) (Moasser, 2007).

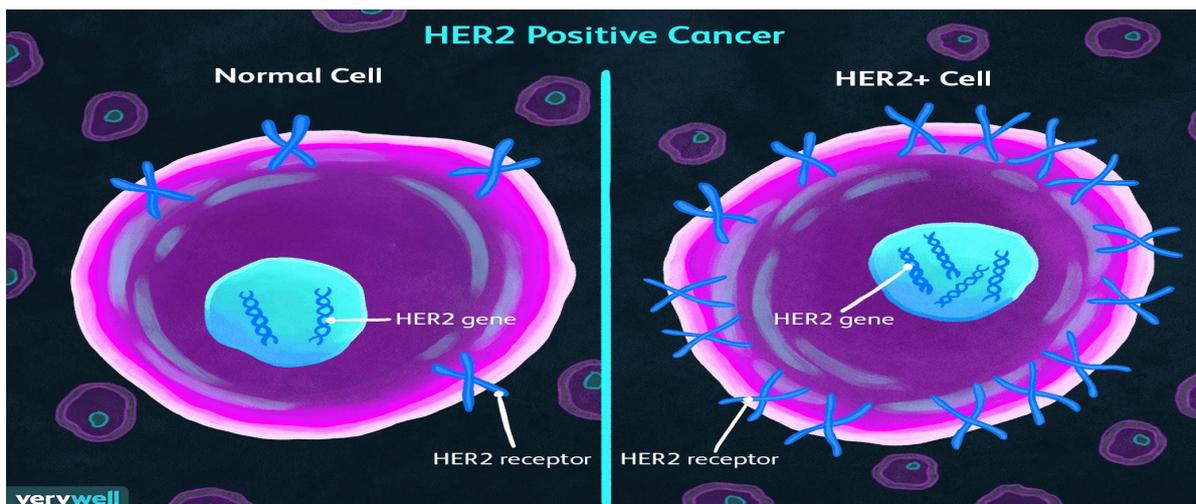


Figure 24 : la surexpression de Her2 dans les cellules cancéreuses(CIBLEES, 2011) .

La surexpression de Her2 provoque une hétérodimérisation accrue de Her2 avec EGFR, Her3 et Her4. L'hétérodimerisation de Her2 et EGFR peut activer STAT3 via la phosphorylation via SRC favorisant la survie cellulaire. Her2 en tant qu'homodimère ou hétérodimère avec EGFR médie les voies clés en aval de celui-ci, qui incluent la signalisation PI3K, MAPK et PLC (figure 25). La cascade MAPK comprend les kinases de signalisation RAS/RAF/MEK/ERK1/2, qui activent ensemble des facteurs de transcription spécifiques tels que c-MYC, c-JUN et FOS, entraînant la prolifération cellulaire (figure 25, 26) (**Moasser, 2007**) .

Les cibles en aval de la signalisation induite par la phosphorylation de PI3K/PDK/AKT/mTOR comme la protéine ribosomique p70 S6 kinase 1 stimulent la biosynthèse des protéines. De plus, la voie de PI3K est liée à la mTOR permettant un contrôle de croissance et apoptose, lorsque la voie de signalisation est activée, un grand nombre d'activités seront mises en jeu : induction et inhibition des Bad, FKHR, activation IKK inhibant l'apoptose, inhibition GSK3 arrêtant le cycle cellulaire et l'activation du mTOR activant elle-même la traduction et l'activation MDM2 inhibant la p53 qui induit l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN (figure 25) (**Valla et al., 2022**).

De plus, la dimérisation de Her2 favorise la mauvaise localisation et la dégradation rapide de l'inhibiteur de cycle cellulaire P27 (protéine Kip1) conduisant à la progression du cycle cellulaire (figure 26). Akt est activé dans les cancers du sein amplifiés par Her2 une fois activé phosphoryle p27 en inhibant sa fonction en l'excluant du noyau (figure 25) (**Moasser, 2007**).

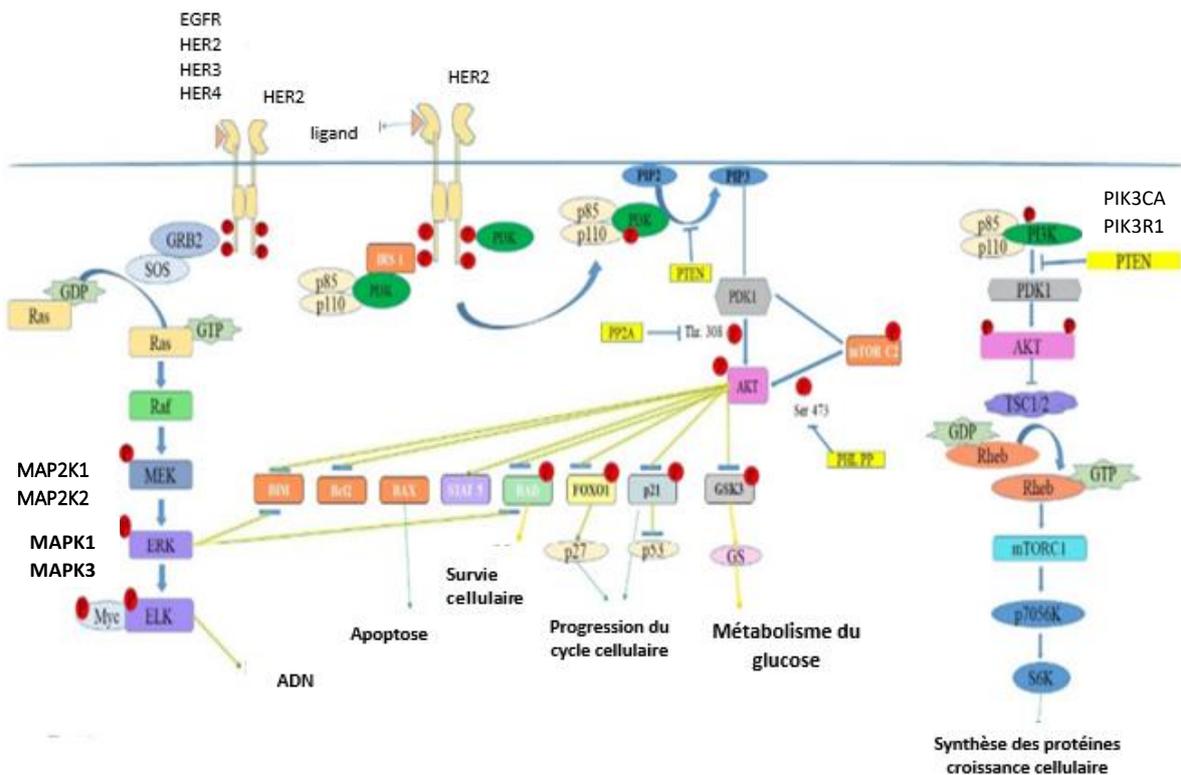


Figure 25 : Les voies PI3K, AKT, MTOR et MAPK en aval de la prolifération cellulaire du cancer du sein Her2 positif (Kumar & Rajnikanth, 2020).

Les PLC sont activés par différents stimuli pour médier l'hydrolyse de PtdIns en seconds messagers $InsP_3$ et DAG, qui favorisent ensuite la libération intracellulaire de Ca^{2+} du réticulum endoplasmique (ER) et l'activation de la PKC, respectivement. L'activation de la PKC après la libération de DAG et de Ca^{2+} favorise la migration cellulaire, la survie et la différenciation cellulaires. Certains automates sont activés par plusieurs mécanismes (figure 26) (Owusu Obeng *et al.*, 2020).

La fonction de signalisation oncogénique la plus importante du complexe Her2-Her3 semble être l'activation de la voie PI3K/Akt. Akt joue un rôle central dans la tumorigenèse, fonctionne au carrefour de plusieurs voies de transduction du signal qui régulent de nombreuses fonctions cellulaires d'une importance cruciale pour les cellules cancéreuses, notamment la prolifération et la survie des cellules, la taille des cellules et la réponse à la disponibilité des nutriments, le ressenti du glucose, la transition épithéliale-mésenchymateuse et l'envahissement cellulaire, la stabilité du génome et l'angiogenèse (figure 26) (Moasser, 2007).

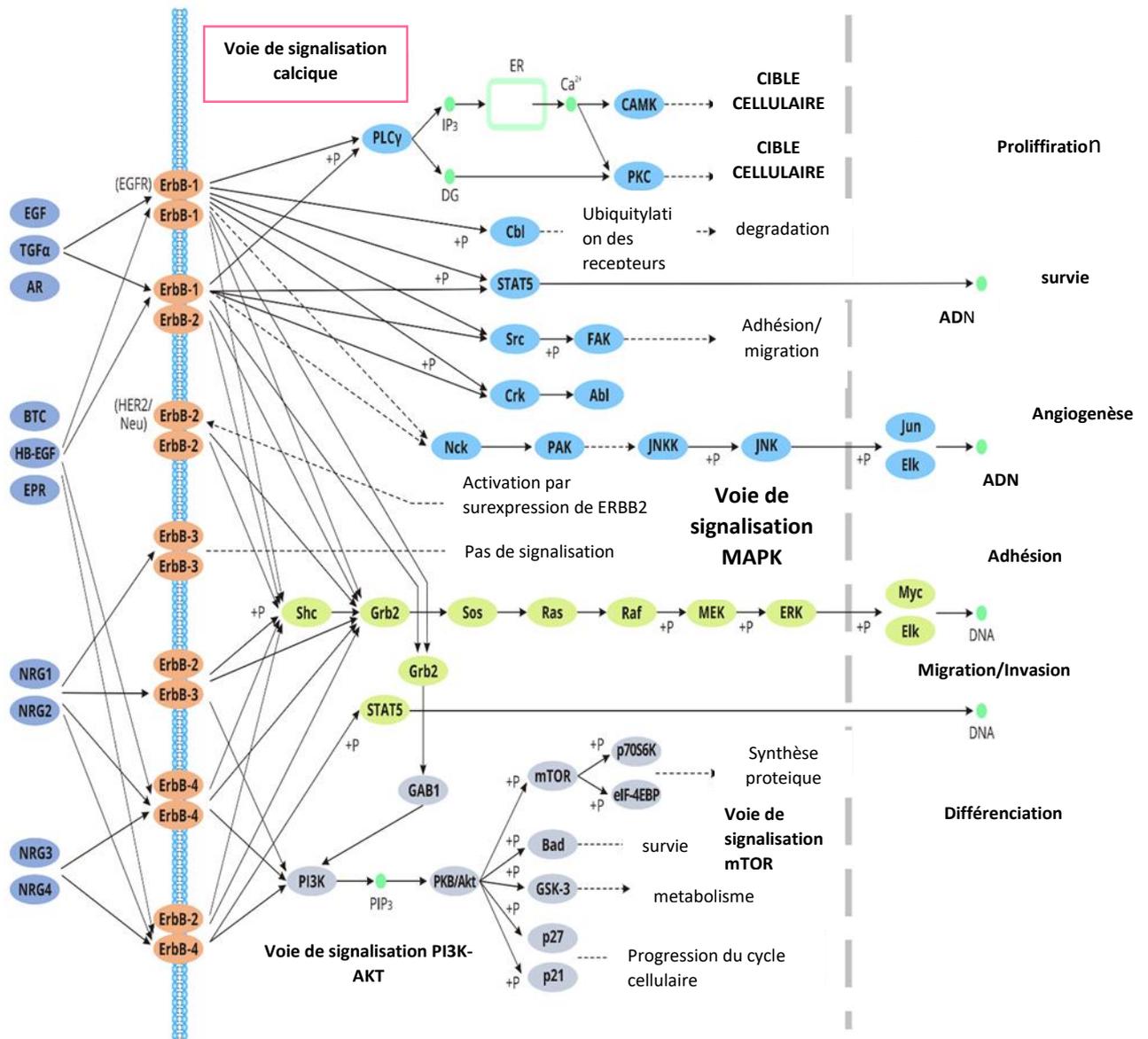


Figure 26 : voie de signalisation ERbB (Buonanno, 2010) .

L'hétérodimérisation de Her2 avec EGFR et Her3 provoquée par la surexpression interfère avec la régulation endocytaire de l'EGFR. L'EGFR est unique dans la famille HER en ce qu'il subit une dégradation endocytaire après activation et homodimérisation médiées par un ligand, contrairement aux autres membres de la famille qui subissent un recyclage endocytaire (figure 27). Les hétérodimères EGFR-Her2 échappent de la même manière à la dégradation endocytaire en faveur de la voie de recyclage et ont une durée et une puissance de signalisation accrues. Par conséquent, la surexpression de Her2 entraîne une augmentation de l'expression et de l'activité membranaire de l'EGFR (figure 27) (Moasser, 2007).

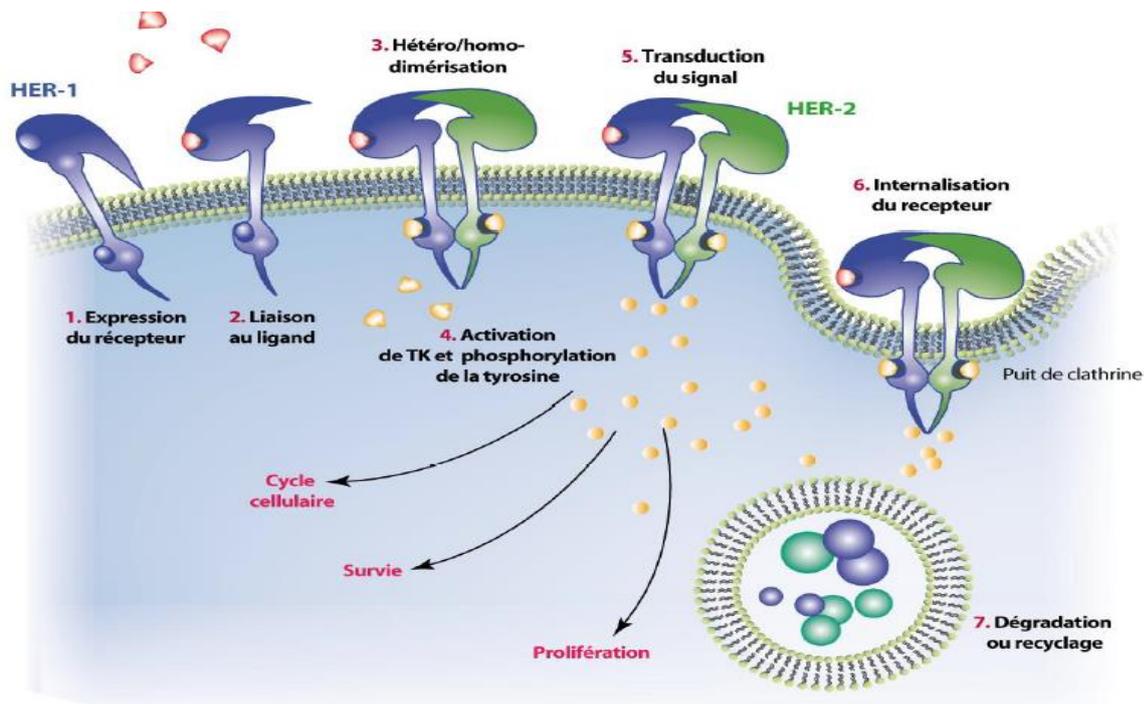


Figure 27 : fonctionnement d'un récepteur Her (DE PHARMACIE).

Plusieurs signaux en aval peuvent être à l'origine du phénotype invasif associé à la surexpression de Her2 dans les cellules tumorales telle que l'activation de PI3K, PKC- α et la proto-oncogène tyrosine-protéine kinase (src), la régulation négative de l'intégrine $\alpha 4$, l'induction de l'intégrine $\beta 4$ et transforming growth factor (TGF- β) (Moasser, 2007).

IV.3 Traitements

La prise en charge du cancer du sein Her2-positif a radicalement changé ces 20 dernières années, avec le développement de l'anticorps monoclonal anti-Her2 trastuzumab, traitement des cancers Her2-positifs, en situation néoadjuvante, adjuvante et métastatique (figure 28). Le pertuzumab, anticorps monoclonal qui reconnaît un autre épitope sur HER2 impliqué dans l'hétéro-dimérisation des molécules de la famille Her a été développé et constitue le traitement standard en première ligne des cancers du sein métastatiques Her2-positifs en association aux taxanes et au trastuzumab (figure 28). Le trastuzumab emtansine actuellement utilisé en deuxième ligne, permet de combiner l'activité du trastuzumab tout en délivrant un agent inhibiteur du fuseau mitotique (dérivé de la maytansine) directement aux cellules néoplasiques qui rejettent Her2. Ce traitement a supplanté en deuxième ligne l'association lapatinib et capécitabine, désormais utilisée en troisième ligne, avec une action d'inhibition réversible des domaines kinases de Her2 et Her1 (figure 28). Cependant, malgré ces avancées thérapeutiques

La méthode de notation recommandée est un système semi-quantitatif basé sur l'intensité du produit de réaction et le pourcentage de cellules positives à la membrane, donnant une plage de notation de 0 à 3+. Les échantillons notés 3+ sont considérés comme positifs sans équivoque et 0/1+ comme négatif. Les échantillons équivoques 2+ nécessitent une confirmation à l'aide d'un autre système d'analyse, idéalement FISH (figure 29) (Canda et al., 2018).

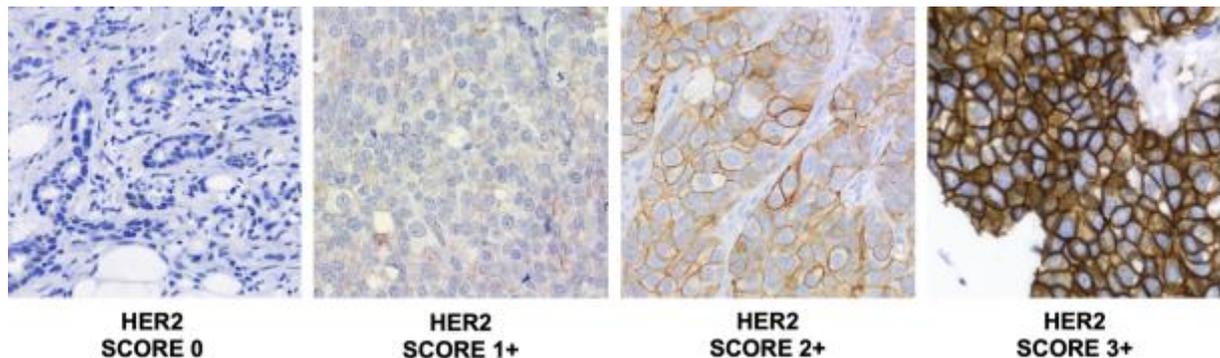


Figure 29 : changement de paradigme dans la définition du statut Her2 dans le cancer du sein par IHC (Marchiò et al., 2021).

b. PCR

La PCR est une technique très sensible qui peut être réalisée sur un petit volume de tissu tumoral et qui est facile à automatiser et à standardiser. Cependant, la valeur de la PCR est limitée par le fait qu'elle est difficile à quantifier et qu'elle implique une extraction d'ADN fournissant une valeur moyenne de l'expression de Her2 dans la tumeur (Schaller et al., 2001).

c. FISH

La FISH est un test très répandu et très utile. Les avantages de cette technique sont la stabilité de l'ADN chromosomique et la possibilité d'évaluer l'amplification des gènes à l'intérieur d'une même région chromosomique et la possibilité d'évaluer l'amplification génique dans les cellules tumorales individuelles d'une coupe de tissu. La FISH repose sur la visualisation in situ du gène Her2 à l'aide d'une étiquette fluorescente à l'aide d'une sonde oligonucléotidique spécifique marquée par fluorescence (figure30) (Fouad et al., 2012).

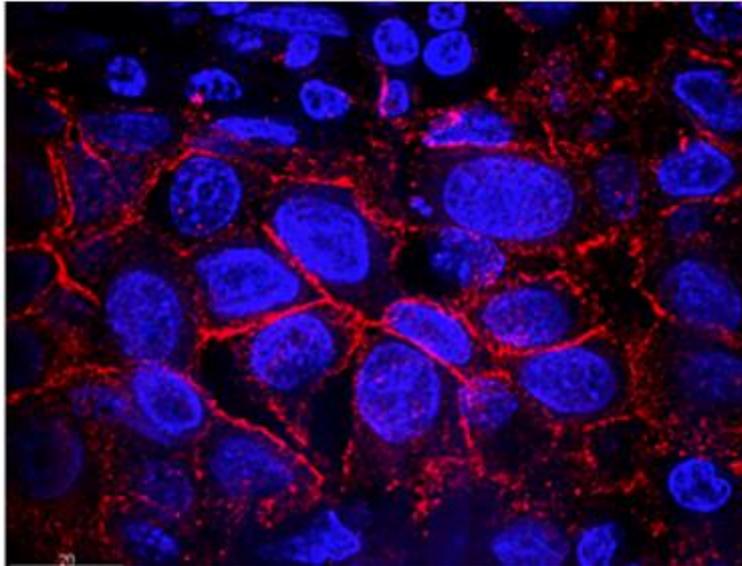


Figure 30 : évaluation du statut Her2 par FISH (Schaller et *al.*, 2001)

Les échantillons de tissus cliniques et y compris les spécimens biopsies, sont généralement fixés avec du formaldéhyde et enrobés de paraffine pour des examens histologiques et pathologiques ultérieurs. De nouvelles techniques de recherche ont été développées et l'utilisation d'ADN provenant de tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) a augmenté. En effet, divers types de mutations, notamment les mutations du récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) et les mutations de l'EGFR2 humain (Her2), sont la cible d'inhibiteurs thérapeutiques. Compte tenu de cela plusieurs méthodes d'extraction d'ADN ont été développées.



Chapitre II :
Matériels et méthodes



I. Matériels et méthodes

I.1 Matériels

I.2.2 Matériels biologiques

Pour l'extraction à partir d'un tissu FFPE nous avons utilisé 8 échantillons de tissu mammaire pathologiques (appartenant à une femme de 48 ans diagnostiquée cancer du sein Her2 positive) issues d'un bloc préalablement paraffinée fourni par le Service d'Oncologie et Anatomie cytopathologie du Centre de Sidi Ali Lebher, bloc réalisé à partir d'une mastectomie gauche. Ce travail a été réalisé au niveau des laboratoires de médecine de l'université A. MIRA-Aboudaou.

I.1.2 Matériels non biologiques

Tout le matériel est résumé dans l'annexe 1

I.2 Méthodes

I.2.1 Etude histopathologique

a. Réalisation des coupes

Consiste à réaliser de fines coupes en série à partir d'un tissu inclus dans la paraffine à l'aide d'un microtome.

Les coupes histologiques ont été réalisées comme suit :

- Placer le bloc sur une plaque réfrigérante afin d'optimiser les rubans ensuite il a été dans le microtome, en ajustant d'abord l'épaisseur à 20 μ m afin de dégrossir la couche superficielle de paraffine.
- Réaliser des coupes de 2 et 4 μ m, afin d'obtenir des rubans de paraffine contenant notre fragment d'intérêt.
- Le fragment d'intérêt est ensuite placé sur des lames préalablement mouillée et déposer dans un bain marie, afin de déplier les rubans et les étaler.
- Les rubans dépliés et étalés sur lames ont été séchés dans des portes lames avant de les incuber à 76°C pendant 1 heure.

b. Coloration

- Réhydratation

C'est une étape préparatoire à la coloration, qui consiste en un déparaffinage par un lavage au xylène pendant 30 min et la réhydratation en utilisant l'éthanol pendant 10 min. Ces étapes permettent aux colorants de pénétrer dans le tissu.

- Coloration

La coloration permet d'analyser la structure des cellules, leur pléomorphisme nucléaire, l'activité mitotiques et les constituants extracellulaires.

Les lames ont été colorées par des colorations standards successives d'hématoxyline de Mayer pendant 1 min colorant le noyau et les fibres en bleue-violet, et l'éosine pendant 1 min colorant le cytoplasme en rose.

- Montage

Consiste en l'élimination d'excès de colorant par passages successives dans des bains d'éthanol, éthanol xylène, xylène 1, xylène 2 pour avoir des lames propres, sur lesquelles nous avons fixé une lamelle en ajoutant une résine « Eukitt », cela offre une protection mécanique et chimiques au tissu et au colorant.

II.2.2 Etude immunohistochimique

Réalisation des coupes fines (3µm) à partir d'un bloc paraffiné et les placés sur des lames.

a. Prétraitement

Cette étape consiste en un déparaffinage et une réhydratation des lames :

- Déparaffinage dans l'étuve (75°C pendant 2 heures et plus).
- Déparaffinage au xylène (3 bains, 5 min chacun).
- Réhydratation dans les bains d'alcool (3bains ,5 min chacun).
- Deux lavages à l'eau distillée.

b. Démasquage

Le démasquage agit en cassant les liaisons entre les protéines. Cette étape consiste à émerger les lames dans un tampon pH6 puis à les incuber dans l'automate PT Link à 100°C

en descendant jusqu'à atteindre les 60°C (1H). Suivi d'un rinçage dans la solution Wash buffer (figure 31).



Emerger les lames dans un Tampon PH6

Figure 31 : Etapes de démasquage (Photo originale).

c. Traitement

- **Etape 1 : consiste en ajout d'une enzyme (peroxydase).**

A l'aide d'un DaKopen entourer d'un cercle hydrophobe l'échantillon. Les lames ont été ensuite déposées dans un milieu humide, de la peroxydase y a été ajoutée puis les échantillons incubés pendant 5min. les lames ont été rincées dans une solution Wash Buffer (figure 33).



Figure 32 : Utilisation du DaKopen pour encercler l'échantillon (photo originale).

- **Etape 2**

Cette étape consiste en l'ajout d'un anticorps primaire, en l'incubation des lames pendant 40min dans le noir et au lavage dans une solution Wash Buffer.

- **Etape 3 Ajout d'anticorps secondaires HRP (Horse Radish Peroxidase).**

Elle consiste en l'ajout d'un anticorps secondaire, en l'incubation des lames pendant 30min dans le noir et au lavage dans une solution Wash Buffer pendant 5min.

- **Etape 4**

Dans cette étape il a été ajouté du DAB (diaminobenzidine), il s'en est suivi une incubation pendant 10min l'abri de la lumière et un rinçage dans la solution Wash Buffer.

- **Etape 5 contre coloration à l'hématoxyline**

Les lames ont été émergées dans l'hématoxyline pendant 17 à 20 secondes puis Rinçées à l'eau distillée, le Wash Buffer, et enfin l'eau distillée successivement.

d. Séchage des lames

Les lames ont été séchées à l'étuve à 75°C pendant 10min

e. Montage des lames

Les lames ont été montées à l'Eukitt et visualisées au microscope optique.

I.2.3 Extraction de l'ADN

L'ADN a été extrait à partir d'un tissu déparaffiné et réhydraté selon le protocole de (**Pikor et al., 2011**), modifié par (**Boukhari et al .,2015**) selon les étapes suivantes.

a. Préparation des échantillons

- Des coupes de 10µm ont été réalisées à l'aide d'un microtome à partir d'un bloc paraffiné.
- Chaque coupe a été ensuite mise dans un tube ependorf de 1,5ml.

b. Déparaffinage

- 600µl de xylène ont été ajoutés dans chaque tube ependorf de 1,5ml contenant le tissu, suivis d'un retournement pendant 15min. le tout a été vortéxé et centrifugé à 14000 rpm pendant 3min. Cette étape a été répétée à trois reprises.

c. Réhydratation

- 800µl d'éthanol à des concentrations décroissante (100%, 70% et 50%) ont été ajoutés successivement.
- Chaque ajout d'éthanol est suivi d'une centrifugation à 14000rpm pendant 3min.
- Au dernier lavage, l'éthanol a été éliminé soigneusement en évitant de perturber le culot.
- Les tubes ependorf ont été retournés et séchés à température ambiante pendant 5min.

d. Extraction d'ADN

- 315µl de tampon de lyse ont été ajoutés à chaque tube suivi de 5 à 10µl de protéinase k (20mg/ml). Les tubes ont été Incubé sous agitation chaque 5 à 10min, pendant 1h 30 à 56°C. 100µl de NaCl 6M ont été ajoutés au mélange pour précipiter les protéines. Et Vortexés pendant 6min et centrifugés à 14000 rpm pendant 10min. 250µl du surnageant contenant l'ADN ont été récupérés et transférés dans un nouveau tube ependorf de 1,5 ml.
- 200µl d'isopropanol ont été additionnés au surnageant suivis d'un retournement et d'une agitation jusqu'à l'observation d'une pelote blanchâtre et compacte d'ADN. il s'en est suivi une centrifugation à 14000 rpm pendant 10min à fin de précipiter la pelote d'ADN et d'éliminer le surnageant d'isopropanol, cette étape doit être réalisée avec précaution afin de ne pas perturber l'ADN. De là, 300µl d'éthanol ont été ajoutés au culot d'ADN pour éliminer toutes traces d'isopropanol, puis centrifugés pendant quelques secondes afin d'éliminer le surnageant.
- Les culots ont été séchés à température ambiante pendant 3 à 5min pour éliminer toute trace d'éthanol.
- Les échantillons d'ADN extraits ont été suspendus dans 30µl d'eau distillée. Incubés à 50°C pendant 10min.
- L'analyse qualitative et quantitative a été réalisée par un spectrophotomètre NanoDrop et les échantillons ont été conservés à -20°C jusqu'à usage ultérieur (courte conservation).

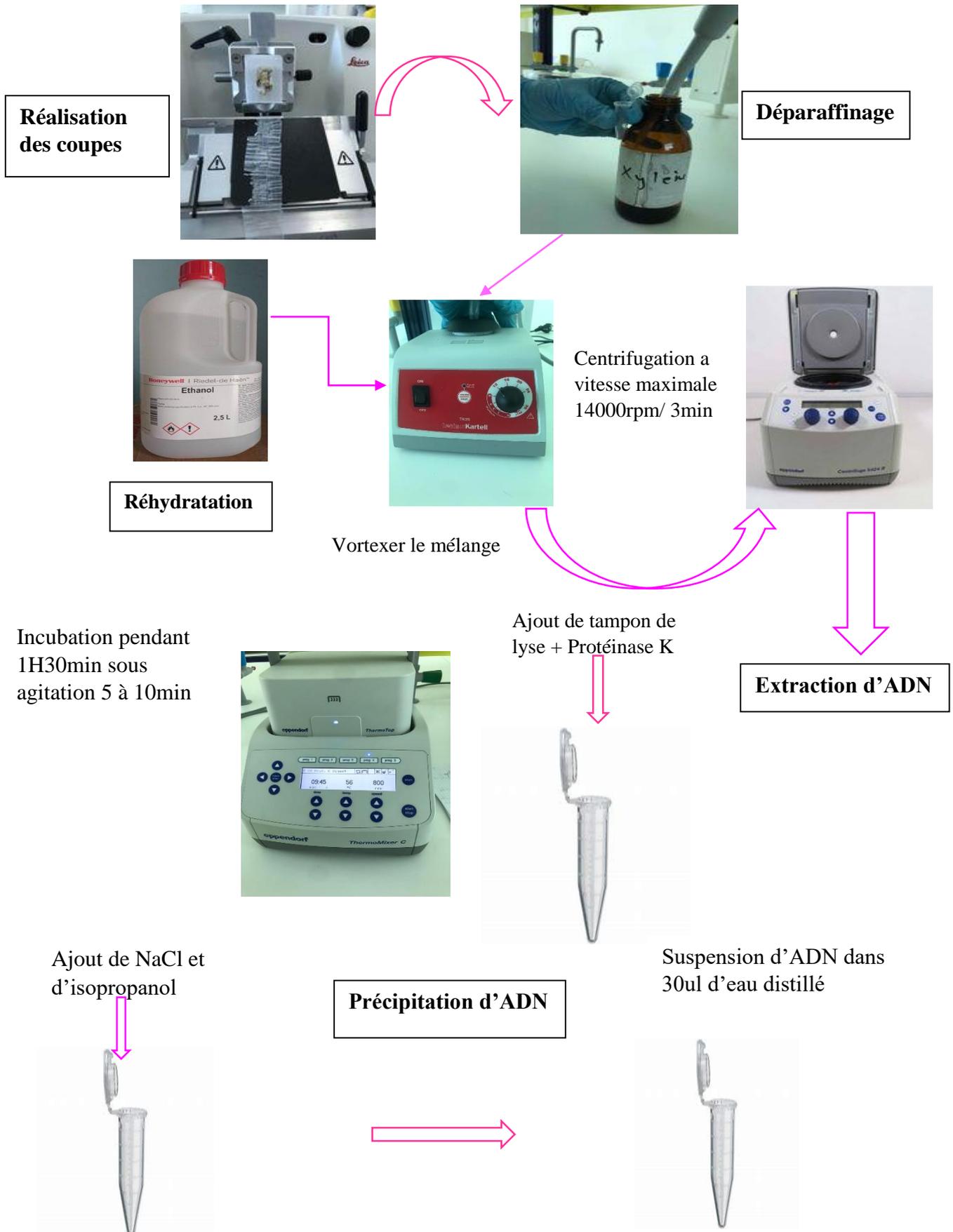


Figure 33 : Etapes d'extraction d'ADN selon le protocole (Boukhari., 2015).

I.2.4 La PCR

La PCR a été réalisée dans le but de cibler une mutation Her2. Pour cela quatre amorces ont été sélectionnées et conçues l'amorce sens (forward : F) Her2, anti-sens (reverse : R) Her2, et les b-actine (ACTB) ont été utilisées comme témoins.

Tableau I : Locus, Séquences d'amorce et température d'hybridation.

Locus marqueur	Séquence d'amorces (5' - 3')	Tm °c
F-Her2	AGAGTCACCAGCCTCTGCAT	59,4
R-Her2	GCAACTCCCAGCTTCACTTT	57,3
F-ACTB	CATGTACGTTGCTATCCAGGC	59,8
R-ACTB	CTCCTTAATGTCACGCACGAT	57,9

Les séquences ont été choisies après une étude bibliographique (**Koudelakova et al., 2015**) visant les séquences de mutation les plus répandues. Ces dernières ont été vérifiées par Blast sur le site NCBI et commandées et conçues par Eurofins Genomics.

La PCR a été réalisée en utilisant un kit PCR SuperMix High Fidelity contenant du Mg⁺⁺, des dNTP et un mélange d'ADN polymérase Taq recombinante et d'ADN polymérase de l'espèce *Pyrococcus* GB-D.

Selon le protocole spécifique (**Fidelity**) qui consiste en :

- La préparation des solutions d'amorce a été réalisée en suivant les recommandations du concepteur d'amorce et en ajoutant un volume nucléase free water (Ambion) fournis avec les caractéristiques des amorces afin d'obtenir une concentration finale de 200nM/μl (annexe).
- L'ajout dans un tube ependorfs 45μl d'eau distille et 5μl de solution d'amorce (F-Her2, R-Her2, F-actine et R-actine) puis vortexer.
- Transfère de 2μl de chaque tube ependorfs dans des tubes à PCR de 0,1ml (2μl de F-Her2 et 2μl de R-Her2, 2μl de F-actine et R-actine dans chaque tube)
- Ajout de 1μl d'ADN extrait dans chaque tube avec 45μl de la solution Mixer.
- Placer les tubes à PCR dans un thermocycler (Dénaturation initiale à 95°C pendant 1min, dénaturation à 95°C pendant 30s, hybridation à 50°C pendant 1min et élongation 72°C pendant 1min).

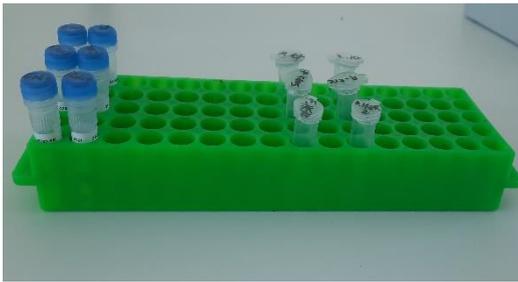
- Ajout de 1 μ l de bleu juice dans des tubes PCR (0,5 μ l), puis rajouter 10 μ l des échantillons de la PCR.
- Brancher l'électrophorèse et la charger à 100volt
- Verser 10 μ l du mélange (bleu juice + échantillon) dans les puits de l'électrophorèse
- Suivre la migration des échantillons d'ADN.

a. Préparation de tampon TAE 5X : (Annexe 3).

b. Préparation de dilution de TAE 5X (TAE 1X) : (Annexe)

c. Préparation de gel d'agarose

- Ajouter 4g d'agarose a 100ml de TAE 1X.
- Mettre le gel d'agarose au microonde pendant 1min, puis mélanger délicatement pour le faire refroidir.
- Ajouter 2 μ l de bromure d'ethidium (BET).
- Renverser le gel d'agarose + BET dans la chambre d'électrophorèse, attendre jusqu'à solidification, puis l'immerger dans le tampon TAE 1X.



Préparation des solutions d'amorces



Transfère de 2 μ l de la solution dans les tubes à PCR et 1 μ l d'ADN extrait dans chaque tube avec 45 μ l de la solution Mixer



Placer les tubes dans Themocyler.



Ajout de 1 μ l de bleu juice et 10 μ l de solution dans des tubes à PCR.



Verser 10 μ l du mélange dans les puits de l'électrophorèse.



Placer le gel d'agarose dans la cuve d'électrophorèse.

Figure 34 : les étapes de la PCR (Photos originales).



Chapitre III :
Résultats et discussion



I. Résultats de l'étude histopathologique

Les résultats histopathologiques du prélèvement réalisé sur la pièce de mastectomie gauche d'une femme de 48 ans sont représentés dans la figure 34. L'aspect histopathologique est en faveur d'un carcinome canalaire infiltrant CCI de grade III Nottingham (figure 35).

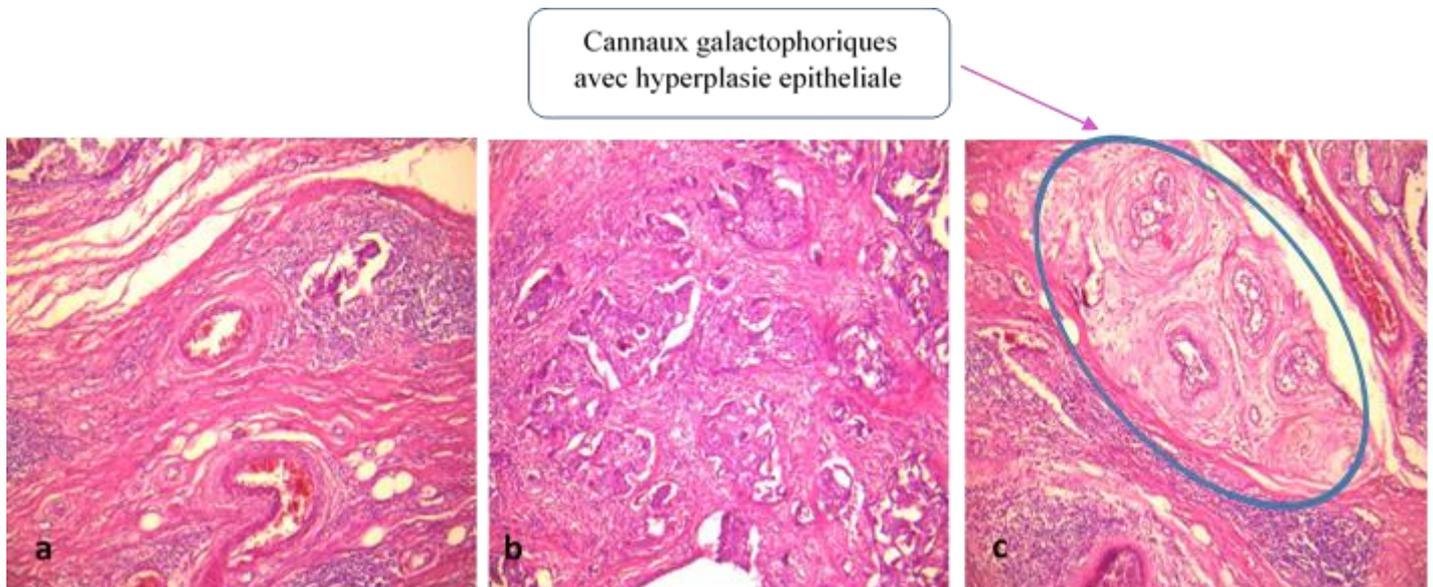


Figure 35 : Aspect histologique d'un carcinome canalaire infiltrant CCI (G 10) (photos originales).

II. Résultats de l'étude immunohistochimique

L'étude immunohistochimique a permis d'évaluer le taux d'expression de statut HER2 au niveau membranaire traduit par un marquage membranaires complet intense (score 3+) (figure 36).

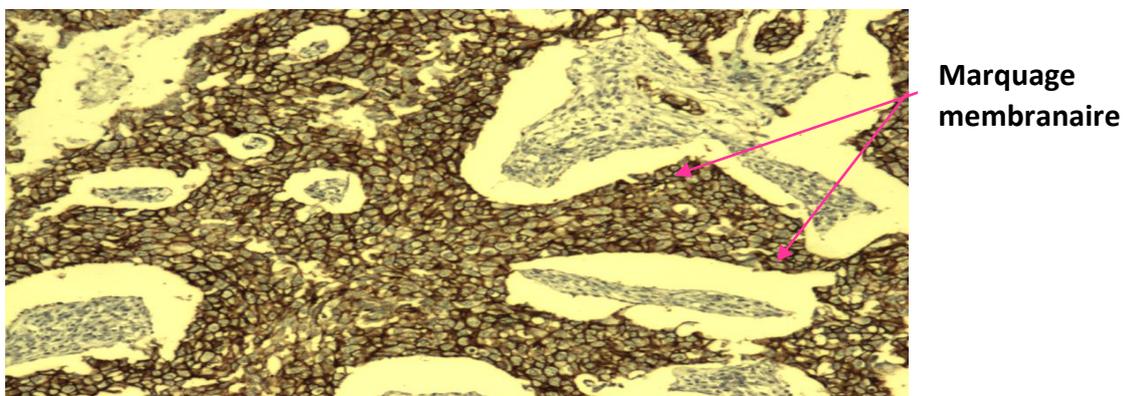


Figure 36 : Résultats d'immunomarquage de HER2 (Score 3+) (GX40) (photo originale).

Les résultats de l'immunomarquage démontrent qu'il s'agissait du score 3. L'immunoréactivité membranaire suffit pour une interprétation positive du signal IHC, Her2/*neu* est scoré sur une échelle arbitraire, le score le plus élevé (3 ; immunomarquage fort, circonférentiel, dans un minimum de 30% des cellules tumorales) étant considéré comme positif, alors que n'importe quel autre résultat est considéré comme négatif (score 0 ou 1) ou ambigu ou modéré (2 ; immunomarquage modéré avec maximum de 10% des cellules tumorales)(Lehr et al., 2009).

III. Résultats d'extraction d'ADN à partir d'un tissu FFPE

Les résultats obtenus lorsque nous avons appliqué et suivi le protocole de (Boukhari ., 2015) en utilisant des rubans entiers de 10 μ m, nous nous sommes exposées à non dissolution lors de l'étape de déparaffinage malgré les trois étapes de déparaffinage au xylène, ce qui nous a poussé à cibler la zone tumorale et éliminer l'excédent de paraffine avec un bistouri. Ce qui a remédié au problème (figure 37). Le déparaffinage, a été suivi de centrifugation après chaque étape à 14000rpm pendant 3min à 4°C, cette température a été ajustée à cause de la température d'auto-inflammation du xylène et le reste du protocole a été respecté.

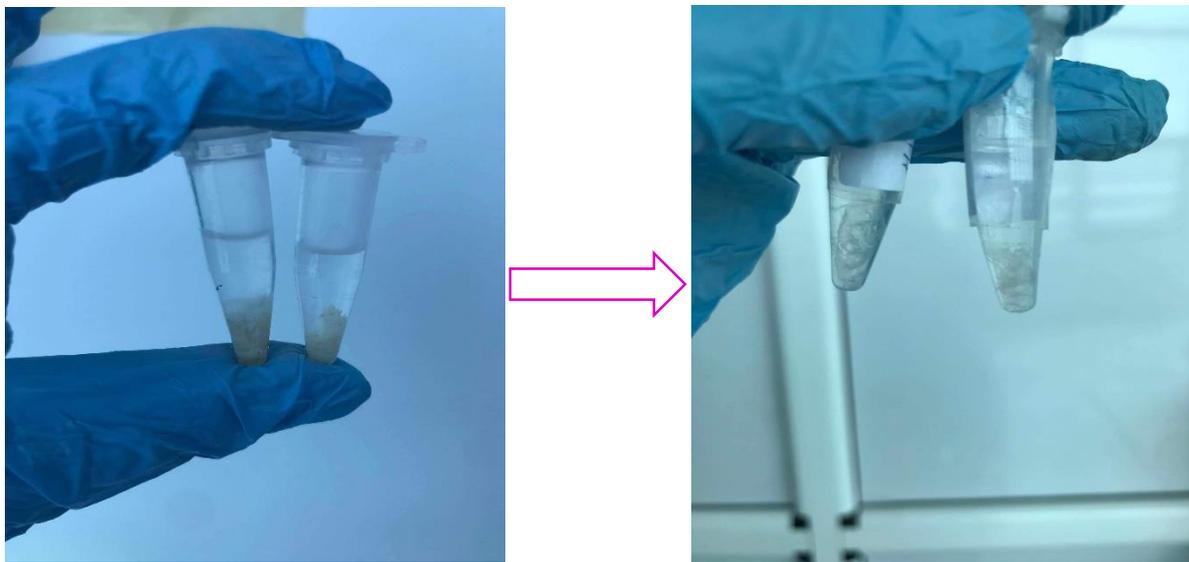


Figure 37 : Non dissolution de la paraffine.

Une fois arrivée à l'étape de digestion, nous avons observé que cette dernière ne s'était pas produite, le tissu avait un aspect compact. Pour cela, nous avons prolongé le temps d'incubation sous agitation (100h à 56°C, à 800rpm) et ajouté 285µl de tampon de lyse et 5µl de protéinase K (figure 38).

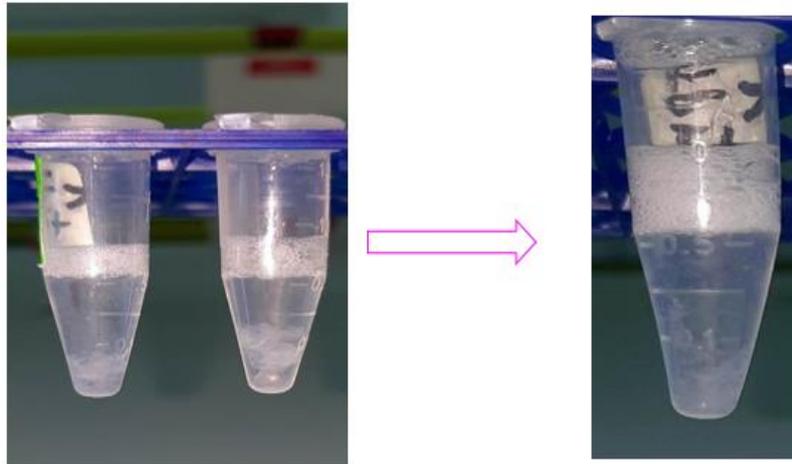


Figure 38 : La digestion enzymatique après incubation.

Après ajout de NaCl et d'isopropanol, la pelote blanchâtre caractéristique de l'extraction de l'ADN n'a pas été observée et ceci malgré diverses tentatives. Pour cela nous avons tenté d'optimiser la précipitation de l'ADN en incorporant une étape de congélation à -80°C, pendant 1h pour accélérer la précipitation. Puis l'échantillon a été centrifugé à 12000rpm pendant 10min à 4°C ce qui nous a permis d'obtenir la pelote blanchâtre et compacte d'ADN (figure 39).

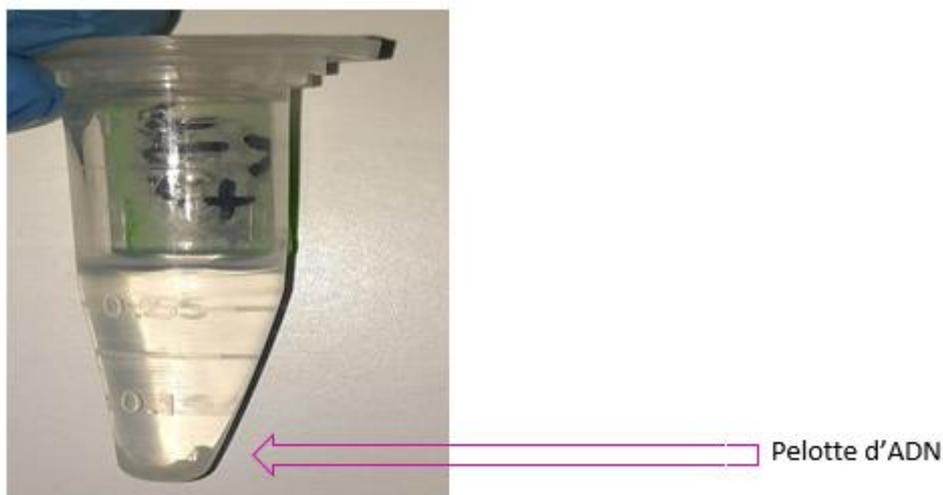


Figure 39 : Apparition d'une pelote d'ADN.

Afin de tenter de mieux décondenser l'ADN, nous avons joué sur les volumes et la température de l'éthanol à 70% (500 μ l, à 4°C) ajouté ainsi que sur l'agitation et la centrifugation à 10000rpm pendant 5min à 4°C.

L'ADN ainsi obtenu a été confirmé et quantifié par analyse au spectrophotomètre (Nanodrop) en mesurant son absorbance à 260nm et calculé le rapport 260/280 qui nous permet d'estimer la pureté de notre ADN. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 40.

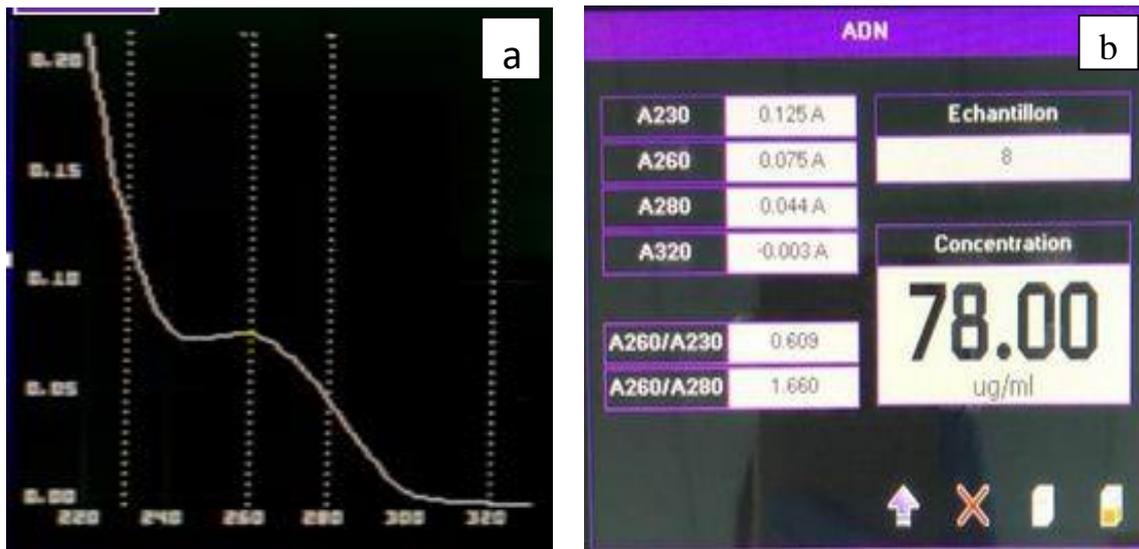


Figure 40 : a) graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b) figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre (photos originales).

Nous avons obtenu la présence d'ADN, mais à une concentration insignifiante (78 μ g/ml), et une contamination protéinique car le ratio est inférieur à 1.8 (1, 66). Pour cela, nous avons tenté une réflexion afin d'optimiser l'extraction.

Selon (Mathieson & Thomas, 2019) l'augmentation du nombre de coupes ou de leur épaisseur augmenterait le nombre de cellule à partir desquelles l'ADN peut théoriquement être obtenu.

À partir de ces observations une coupe de 60 μ m a été réalisée en délimitant le tissu, ces coupes étant plus épaisses et contenant des quantités plus importantes de paraffine que les coupes de 10 μ m, les volumes du xylène et le temps de retournement après chaque lavage ont été augmentés (1ml et trois lavage avec retournement pendant 20min qui corrobore avec le protocole de (Rivero et al., 2006). Afin d'optimiser la digestion, étape cruciale de l'extraction, nous avons augmenté les volumes de tampon de lyse (600 μ l) et de protéinase k (35 μ l) et le temps d'incubation (72h à 56°C sous agitation à 800rpm).

Suite à une analyse au spectrophotomètre, l'ADN a été confirmé et quantifié en mesurant son absorbance (figure 41).

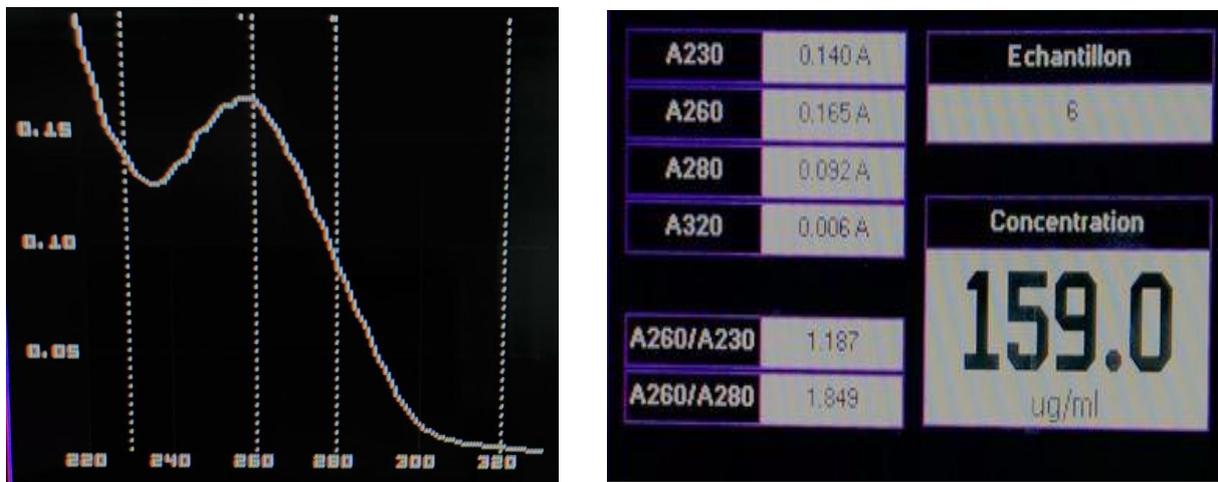


Figure 41 : a : graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b : figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre (photos originales).

Les résultats démontrent bien une augmentation de la quantité d'ADN ($159\mu\text{g/ml}$), et de sa pureté (1,84). Ces résultats nous paraissaient insuffisants par rapport à la bibliographie et nous voulions optimiser la quantité d'ADN pour l'étude ultérieure de la PCR.

Les protocoles de (Pikor *et al.*, 2011) et (Patel *et al.*, 2016), nous ont orientés vers la technique de prélèvement en carotte. Les carottes de tissu sont plus épaisses et sélectives de la zone tumorale que les coupes réalisées au microtome, caractéristiques utilisées dans les protocoles d'extraction FFPE. Pour cela, nous avons opté pour cette technique et nous avons utilisé un ustensile pour réaliser des carottes de 2mm de diamètre en 1cm de longueur (figure 42).

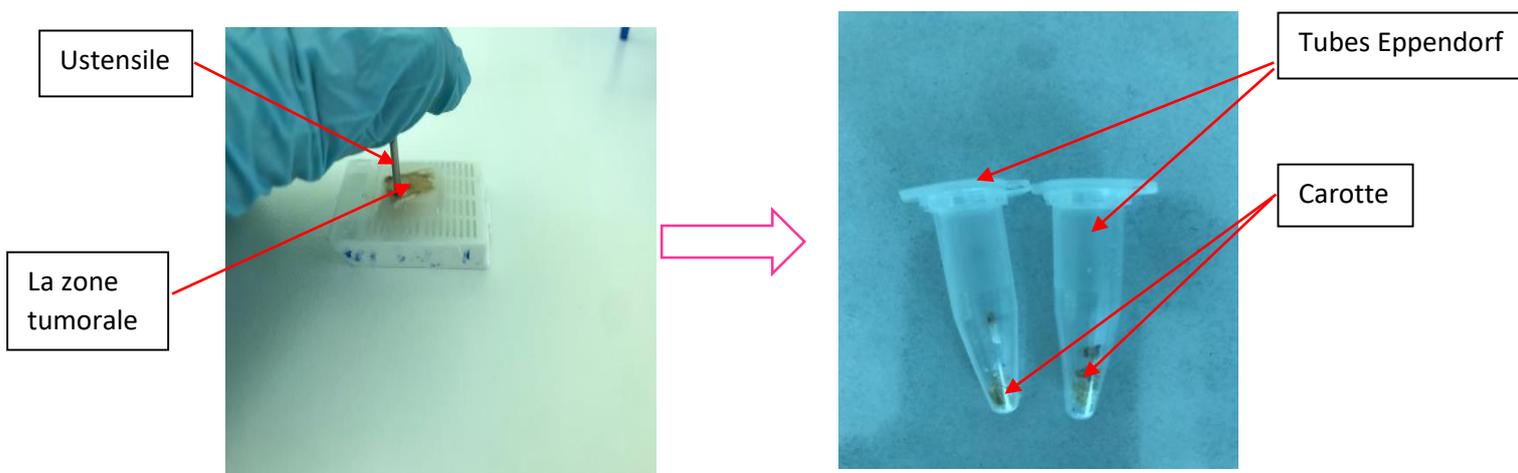


Figure 42 : Carottage de tissu (photo originale) .

Nous avons aussi renforcé le déparaffinage (vu l'importance de la quantité de paraffine) par la répétition des traitements de xylène et l'augmentation du temps de centrifugation (5min, 5min et 10min). Par ailleurs, la digestion a aussi été prolongée vu le volume du prélèvement pendant 3 jours (incubation avec ajout de 40um de protéinase K chaque jours) dans le but d'optimiser l'extraction de l'ADN (Pikor et al., 2011).

Après avoir obtenu la pelote blanchâtre, l'ADN a été quantifié par analyse au spectrophotomètre (Nanodrop) et les résultats obtenus sont représentés dans la figure 42.

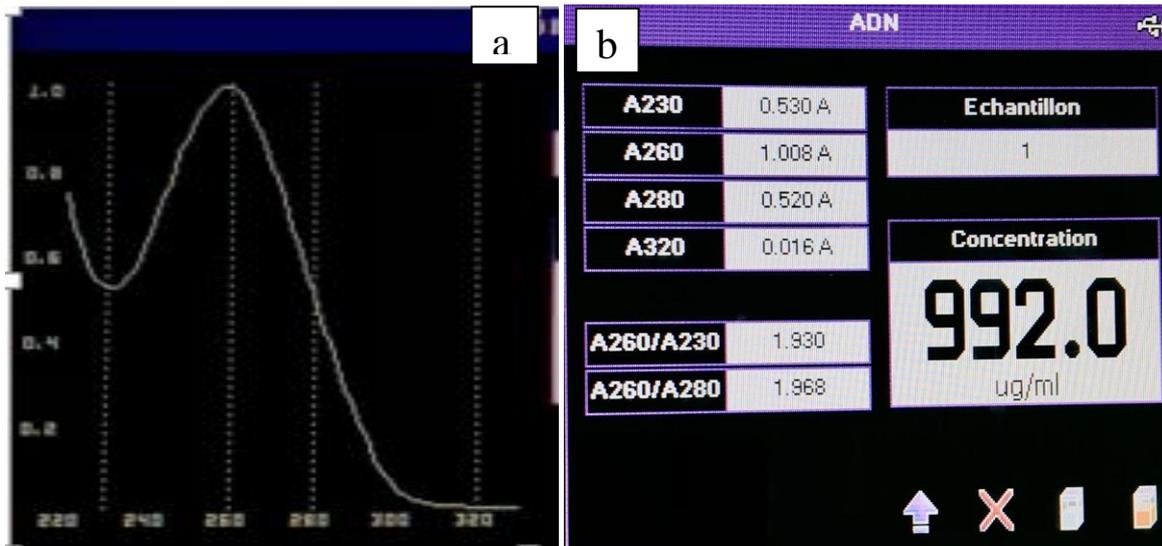


Figure 43 : a: graphe montrant l'absorbance de l'ADN ; b : figure montrant la quantité d'ADN par analyse au spectrophotomètre (photos originales).

Cette optimisation nous a permis d'obtenir une très bonne concentration d'ADN avec 992µg/ml et une pureté de 1.96 comparé à celle obtenue dans les deux autres méthodes.

Dans la présente étude, l'épaisseur de l'échantillon, le volume de protéinase K et le temps de la lyse ont été évalué en termes de l'influence sur la quantité du rendement de l'ADN extrait du tissu FFPE. 3 méthodes d'extraction d'ADN ont été utilisées : (Boukhari.,2015) (modifié) et (Pikor et al., 2011) (Tableau II).

Tableau II : tableau récapitulatif des 3 méthodes d'extraction d'ADN.

Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
Coupes de 10 µm	Coupes de 60 µm	Carotte
600µl de Xylène	1 ml de xylène	1 ml de xylène
Retournement pendant 15 min	Retournement pendant 20 min	Retournement pendant 20 min
15µl de protéinase K	35µl de protéinase K (20µg /ml)	120µl de protéinase K
315µl de tampon de lyse	700µl de tampon de lyse	600µl de tampon de lyse
Incubation pendant 100H	Incubation pendant 78H	Incubation pendant 72H
Quantité d'ADN 78µg/ml	Quantité d'ADN 159 µg/ml	Quantité d'ADN 992 µg/ml
Pureté A260/A280 : 1,70	Pureté A260/A280 : 1,84	Pureté A260/A280 : 1,96

La quantité d'ADN dépendait de la méthode d'extraction. La quantité d'ADN, après isolement avec le protocole (Pikor et al., 2011), était plus élevée (992ug/ml) qu'avec le protocole de (Boukhari.,2015) (78ug/ml) et (Boukhari.,2015) modifié (159ug/ml), cela est dû à la taille et l'épaisseur de l'échantillon qui est nettement supérieur par rapport aux autres échantillons.

Le volume de la protéinase k à jouer un rôle très important en termes de rendement quantitatifs de l'ADN, pour cela l'ajout de 120µl aux échantillons carottes a permis d'obtenir une quantité bien meilleurs que celle obtenue par les deux autres méthodes et à permet aussi de réduire le temps d'incubation ce qui suggère que le volume de protéinase k est inversement proportionnel au temps d'incubation.

IV. Résultats et discussion de la PCR

Notre gène cible a été amplifié dans des solutions de 50µl contenant chacune 1µl d'ADN, 4µl de l'amorce dilué (2µl de l'amorce sens, 2µl de l'amorce anti-sens) et 45µl du PCR SuperMix.

Nous avons opté pour des paramètres classiques pour optimiser le succès de la PCR qui sont les suivants : température d'hybridation 50°C pendant 1min sur 30 cycles.



Figure 44 : les paramètres de la PCR (1) (photo originale).

Après analyse des produits de PCR sur gel d'agarose en utilisant un gel 4% il a été démontré qu'il n'y a pas eu d'amplification (figure45).

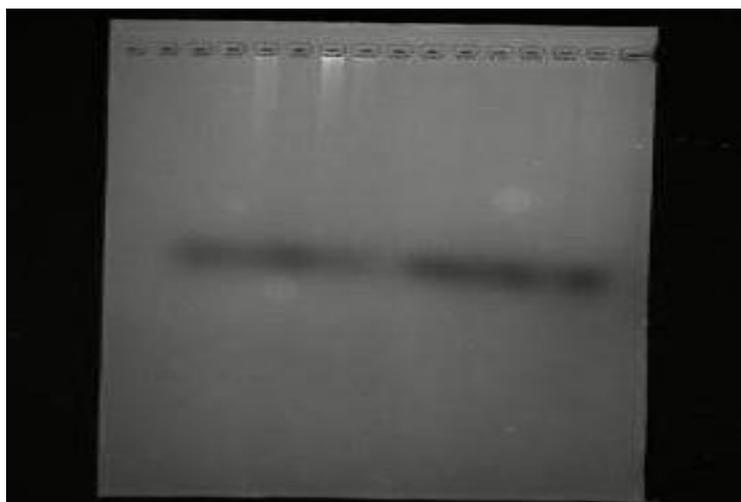


Figure 45 : Résultat de PCR avec Her2 (1) (photo originale).

Comme le montre la figure 45, aucune amplification n'est détectée. Ce résultat pourrait être expliqué par les paramètres de la PCR qui n'étaient pas optimale, ces derniers sont à réajuster. Ce résultat pourrait aussi être expliqué par l'ADN isolé du tissu FFPE lui-même qui présenterait un effet inhibiteur sur la PCR. Le processus de fragmentation affecte non seulement la séquence cible et conduit à une absence d'ADN matrice, mais conduit également à des débris d'ADN courts générés de manière aléatoire. Ces débris pourraient agir directement comme inhibiteur de l'ADN polymérase en se liant à la polymérase et en diminuant son activité, ce qui entraîne une diminution de la vitesse de réaction, ceci est en corcondonce avec l'étude de **(Dietrich et al. 2013)**. En conséquence, l'inhibition peut être atténuée en augmentant la concentration en substrat (dNTP) ou la concentration en enzyme polymérase (Taq).

Cela peut être aussi expliqué par le pourcentage d'agarose 4% qui serait peut-être élevé, car le pourcentage standard d'agarose utilisé pour séparer l'ADN est de 1,0 %, en général, plus la concentration d'agarose est élevée, plus la taille des pores est petite, un pourcentage d'agarose plus faible permet aux bandes plus petites de traverser rapidement le gel, offrant ainsi une meilleure résolution et une meilleure séparation des bandes plus grandes (Pie Yun Lee et al, 2012).

La première PCR ne nous a pas permis d'amplifier notre gène d'intérêt, donc une optimisation du protocole a été nécessaire en prenant compte la réévaluation des paramètres discutés préalablement.

Les paramètres variés dans cette PCR sont : le temps de la dénaturation initiale (30s), la température d'hybridation (55°C) et le pourcentage du gel agarose (1%) (figure 46).

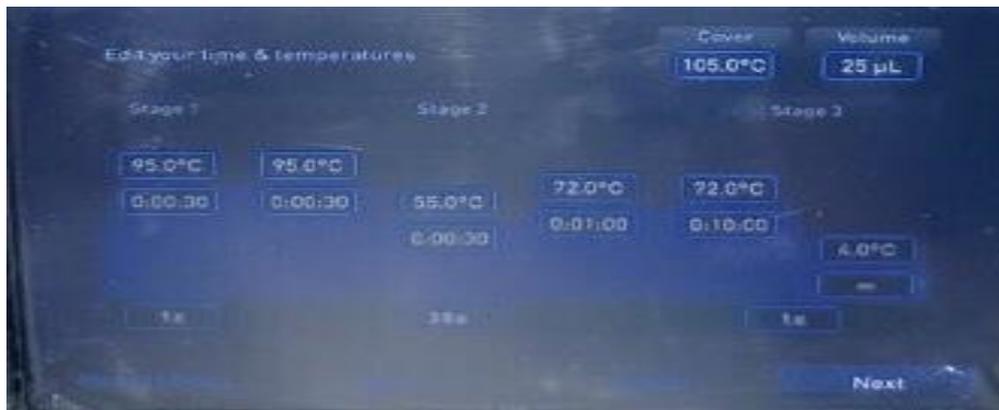


Figure 46 : les paramètres de la PCR (2) (photo originale).

Les résultats obtenus dans la figure 47 démontrent l'hybridation des amorces et la non amplification (figure47).

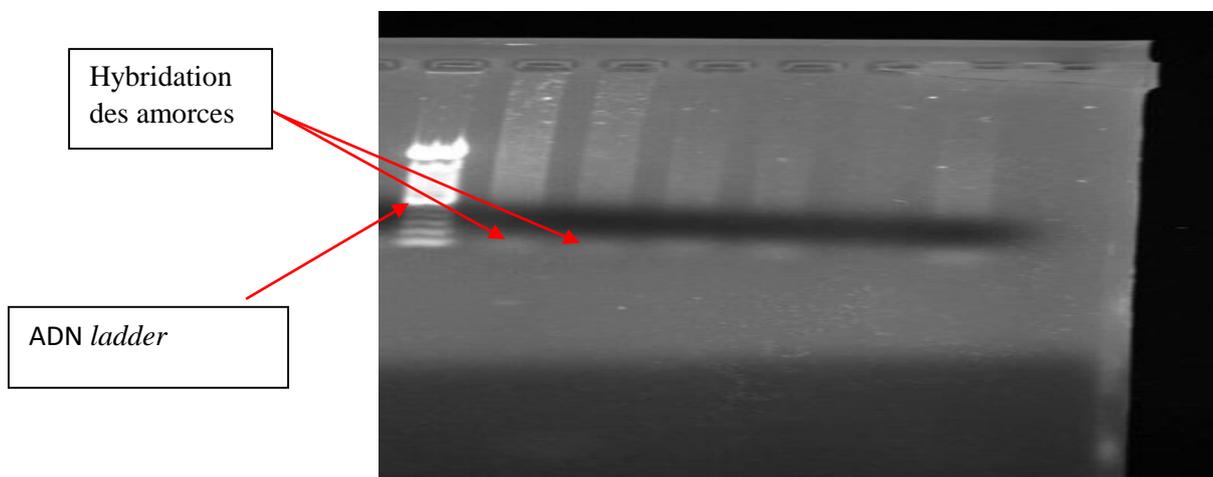


Figure 47: Résultat de PCR avec Her2 (2) (photo originale).

Ce résultat pourrait être expliqué par les paramètres de la PCR qui n'étaient pas optimale à savoir la température d'hybridation qui est un facteur crucial dans l'amorçage, et donc si la T_m est en dessous ou en dessus y'aura soit mésappariement ou pas d'hybridation. Celle utilisée était de 50°C pendant 1min, ces conditions peuvent être défavorables pour une hybridation spécifique, ce qui expliquerait l'hybridation des amorces entre elles. **(Lorenz, 2012)**.

Une autre possibilité qui pourrait expliquer ces résultats, est la fragmentation de l'ADN une forme courante de détérioration de l'ADN associé à la fixation au formol, observé dans les échantillons FFPE et associé à une diminution des rendements de la PCR et de la capacité à amplifier des produits plus longs. Plusieurs facteurs notamment un pH faible pour le formol, le temps de fixation la durée ou les conditions de stockage, peuvent conduire à un rendement réduit de la PCR ou à l'échec total de l'amplification **(Watanabe et al., 2017)**.

La Taq pourrait être inactivée et cela est peut-être dû aux conditions de conservation du kit, cette suggestion est renforcée par la non amplification du témoin β -actine. Les amorces pourraient être incomplémentaires aux brins d'ADN car nous ne connaissons pas les mutations Her2 retrouvées au niveau des cancers du sein en Algérie car aucune étude n'a été réalisée.



Conclusion et perspectives



Conclusion et perspectives

Les échantillons de tissu fixé au formol et inclut en paraffine FFPE constituent un vaste panel d'échantillon clinique pathologiquement bien caractérisé et ces coupes histologiques représente une ressource inestimable qui peut être utilisée pour mener des recherches sur les biomarqueurs du cancer du sein et surtout dans le criblage d'Her2.

L'extraction d'ADN génomique à partir de FFPE reste un problème majeur en biologie moléculaire, car la possibilité, l'aptitude et la capacité d'obtenir un rendement d'extraction d'ADN y reste très aléatoire et difficile. C'est pour cela les industries pharmaceutiques ont mise au point des Kit commerciaux visant à faciliter et à améliorer l'extraction d'ADN à partir de ce type de tissus en terme de quantité et qualité, mais ces Kit onéreux et à des prix exorbitant ont limités le recours aux études moléculaires et génomiques dans les pays sous développé.

Dans cette étude nous avons tenté d'établir un protocole non onéreux, reproductif, surtout ouvrir la voie à la popularisation de cette technique dans l'analyse d'ADN au niveau de la willaya de Bejaia et permettre à toutes les classes sociales de bénéficier de ce genre d'examens.

En perspective, l'amplification réussie de l'ADN à partir de tissus fixés au formol et inclut en paraffine peut être optimisée en améliorant les conditions de stockage et en réduisant le temps de fixation au formol qui est un facteur très déterminants, d'ailleurs plusieurs études ont concluent que l'allongement des durées de fixation avait un effet sur la qualité du séquençage.



*Références
bibliographiques*



A

- Ahmed, Munazza ., Daoud ., Grace Hope., Mohamed ., Asmaa Harati., Rania J Genes.(2021). New insights into the therapeutic applications of CRISPR/Cas9 genome editing in breast Cancer.723 (12).
- Andrés-Sánchez, N., Fisher, D., & Krasinska, L. J. J. o. C. S. (2022). Physiological functions and roles in cancer of the proliferation marker Ki-67. 135(11), jcs258932.

B

- BAB, H. E., & YELLES CHAOUCHE, S. N. *Contribution de l'immunohistochimie et de la biologie moléculaire au diagnostic anatomo-pathologique des cancers du sein.*
- Banerjee, S., Dowsett, M., Ashworth, A., & Martin, L.-A. J. N. C. P. O. (2007). Mechanisms of disease: angiogenesis and the management of breast cancer. 4(9), 536-550.
- Barakeh, D. H., Aljelaify, R., Bashawri, Y., Almutairi, A., Alqubaishi, F., Alnamnakani, M., . . . Alrashed, M. J. O. (2021). Landscape of somatic mutations in breast cancer: new opportunities for targeted therapies in Saudi Arabian patients. 12(7), 686.
- Benichou, E. (2021). *Rôle du facteur de transcription ChREBP dans la carcinogenèse hépatique.* Université Paris Cité.
- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., & Jemal, A. J. C. a. c. j. f. c. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. 68(6), 394-424.
- Buonanno, A. J. B. r. b. (2010). The neuregulin signaling pathway and schizophrenia: from genes to synapses and neural circuits. 83(3-4), 122-131.
- Burstein, H. J., Polyak, K., Wong, J. S., Lester, S. C., & Kaelin, C. M. J. N. E. J. o. M. (2004). Ductal carcinoma in situ of the breast. 350(14), 1430-1441.
- Boukhari, dalale (2015)..Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes de réparation par recombinaison homologue (RAD51, XRCC2et 3) et risque de cancer du sein chez les femmes algériennes. Université Mohamed Khider-Biskra.

C

- CAID, N., & Smaili, F. (2018). *Caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires du cancer du sein chez la femme jeune.*
- Canda, T., Yavuz, E., Özdemir, N., İlvan, S., Dizbay, S. S., Durak, M. G., . . . Onur, H. J. E. J. o. B. H. (2018). Immunohistochemical HER2 status evaluation in breast cancer pathology samples: a multicenter, parallel-design concordance study. 14(3), 160.
- Carney, W. P., Leitzel, K., Ali, S., Neumann, R., & Lipton, A. J. B. C. R. (2007). HER-2 therapy. HER-2/neu diagnostics in breast cancer. 9, 1-11.

Charafe-Jauffret, E., Chaffanet, M., Bertucci, F., Ginestier, C., Jacquemier, J., deLapeyrière, O., & Birnbaum, D. J. m. s. (2007). Les cancers du sein-Vers un modèle cellulaire et moléculaire intégré. *23*(6-7), 626-632.

Charan, M., Verma, A. K., Hussain, S., Misri, S., Mishra, S., Majumder, S., . . . Ganju, R. K. J. I. J. o. M. S. (2020). Molecular and cellular factors associated with racial disparity in breast cancer. *21*(16), 5936.

CIBLEES, A. T. (2011). FONCTIONNALITE DE LA SIGNALISATION EN AVAL DES RECEPTEURS HER: IMPLICATION DANS LA REPOSE CELLULAIRE ET TUMORALE.

Ø

DE PHARMACIE, U. D. M. E. Amplification de l'oncogène HER2 dans le cancer du sein chez la femme. Prise en charge thérapeutique par les inhibiteurs de tyrosine kinase et anticorps monoclonaux.

Deugnier, M.-A., Petit, V., Taddéi-De La Hossieraye, I., Faraldo, M., & Glukhova, M. A. J. m. s. (2007). Vers la caractérisation des cellules souches de la glande mammaire murine adulte. *23*(12), 1125-1132.

Dietrich, Dimo Uhl., Barbara Sailer., Verena Holmes., Emily Eva Jung., MariMeller., Sebastian Kristiansen, Glen .(2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *8*(10), e77771. 1932-6203.

ƒ

Fouad, A., Yousra, A., Kaoutar, Z., Afaf, A., & Sanae, B. J. T. P. A. M. J. (2012). Classification moléculaire du cancer du sein au Maroc. *13*.

Frei III, E., & Eder, J. P. (2003). Combination chemotherapy. In *Holland-Frei Cancer Medicine. 6th edition*: BC Decker.

Fidelity, P. S. K. H. PCR Selection Kit—High Fidelity-Invitrogen.

9

Greenblatt, M. S., Chappuis, P. O., Bond, J. P., Hamel, N., & Foulkes, W. D. J. C. r. (2001). TP53 mutations in breast cancer associated with BRCA1 or BRCA2 germ-line mutations: distinctive spectrum and structural distribution. *61*(10), 4092-4097.

Guyot, M. A.-C. (2021). Prise en charge à l'officine des patients stomisés.

H

Hacking, S. M., Wang, Y. J. J. o. C., & Pathology, T. (2022). Practical Issues of Ki-67 Evaluation in Breast Cancer Clinical Practice. *2*(2), 53-56.

K

Kumar, M., & Rajnikanth, P. J. C. N. (2020). A mini-review on HER2 positive breast cancer and its metastasis: resistance and treatment strategies. *10*(1), 36-47.

Koudelakova, V., Berkovcova, J., Trojanec, R., Vrbkova, J., Radova, L., Ehrmann, J., . . . Hajduch, M. J. T. J. o. M. D. (2015). Evaluation of HER2 gene status in breast cancer samples with indeterminate fluorescence in situ hybridization by quantitative real-time PCR. *17*(4), 446-455.

L

Lehmann-Che, J., Turpin, E., Bertheau, P., & Espié, M. J. m. s. (2007). La fonction de TP53-Facteur prédictif majeur de la réponse à une chimiothérapie dose-intense dans le cancer du sein. *23*(11), 1021-1023.

Lehr, H.-A., Schaefer, S. C., & Delaloye, J.-F. J. R. m. s. (2009). Valeur predictive de la surexpression/amplification de Her2/neu pour un traitement cible du cancer du sein. *5*, 1525-1529.

Lee, Pei Yun., Costumbrado., JohnHsu., Chih-Yuan., Kim ., Yong Hoon .(2012). Agarose gel electrophoresis for the separation of DNA fragments. (62). e3923. 1940-087X

Liang, Y., Zhang, H., Song, X., & Yang, Q. (2020). *Metastatic heterogeneity of breast cancer: Molecular mechanism and potential therapeutic targets*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Lorenz, T. C. J. J. (2012). Polymerase chain reaction: basic protocol plus troubleshooting and optimization strategies. (63), e3998.

M

Manse, L., & Boissierie-Lacroix, M. J. I. d. I. F. (2020). Maladie de Paget du mamelon. *30*(3), 131-133.

Marchiò, C., Annaratone, L., Marques, A., Casorzo, L., Berrino, E., & Sapino, A. (2021). *Evolving concepts in HER2 evaluation in breast cancer: Heterogeneity, HER2-low carcinomas and beyond*. Paper presented at the Seminars in cancer biology.

Mathieson, W., & Thomas, G. J. C. P. R. (2019). Using FFPE tissue in genomic analyses: advantages, disadvantages and the role of biospecimen science. *7*, 35-40.

Mkhinini, Ines Fatnassi, Ridha Saidi, Wassim Mansouri, Wadhah Rebhi, Ines Kraiem, Sabrina Ragmoun, Houcem (2016). Maladie de Paget du mamelon. *26*, 31-35.

Moasser, M. M. J. O. (2007). The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *26*(45), 6469-6487.

//

Nagaraj, G., Ma, C. J. B. c. r., & treatment. (2015). Revisiting the estrogen receptor pathway and its role in endocrine therapy for postmenopausal women with estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *150*, 231-242.

⊖

Owusu Obeng, E., Rusciano, I., Marvi, M. V., Fazio, A., Ratti, S., Follo, M. Y., . . .

Mongiorgi, S. J. I. j. o. m. s. (2020). Phosphoinositide-dependent signaling in cancer: a focus on phospholipase C isozymes. *21*(7), 2581.

ℙ

Patel, A., Unni, N., & Peng, Y. J. C. (2020). The changing paradigm for the treatment of HER2-positive breast cancer. *12*(8), 2081.

Poulard, C., Bouchekioua-Bouzaghrou, K., Sentis, S., Corbo, L., & Le Romancer, M. J. m. s. (2010). Les modifications post-traductionnelles orchestrent l'action du récepteur des œstrogènes $\epsilon R\alpha$ dans les tumeurs mammaires. *26*(6-7), 636-640.

ℛ

Rivero, E. R., Neves, A. C., Silva-Valenzuela, M. G., Sousa, S. O., Nunes, F. D. J. P.-R., & Practice. (2006). Simple salting-out method for DNA extraction from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *202*(7), 523-529.

Rofaida MESSALEM, F. Z. M. Mutation des gènes de réparation (RAD51) et cancer du sein à propos des cas cliniques de la population Algérienne.

ℳ

Schaller, G., Evers, K., Papadopoulos, S., Ebert, A., & Bühler, H. J. A. o. o. (2001). Current use of HER2 tests. *12*, S97-S100.

Servin-Vences, M. R., Richardson, J., Lewin, G. R., Poole, K. J. C., Pharmacology, E., & Physiology. (2018). Mechanoelectrical transduction in chondrocytes. *45*(5), 481-488.

Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. J. C. a. c. j. f. c. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *71*(3), 209-249.

ℒ

Tan, M., & Yu, D. J. B. C. C. (2007). Molecular mechanisms of erbB2-mediated breast cancer chemoresistance. 119-129.

Taneja, P., Maglic, D., Kai, F., Zhu, S., Kendig, R. D., Elizabeth, A. F., & Inoue, K. J. C. M. I. O. (2010). Classical and novel prognostic markers for breast cancer and their clinical significance. *4*, CMO. S4773.

ℳ

Uxa, S., Castillo-Binder, P., Kohler, R., Stangner, K., Müller, G. A., Engeland, K. J. C. D., & Differentiation. (2021). Ki-67 gene expression. *28*(12), 3357-3370.

ℴ

Valla, M., Klæstad, E., Ytterhus, B., Bofin, A. M. J. J. o. M. G. B., & Neoplasia. (2022). CCND1 Amplification in Breast Cancer-associations With Proliferation, Histopathological Grade, Molecular Subtype and Prognosis. *27*(1), 67-77.

Vassilakos, P., Albe, X., Redard, M., Weintraub, J., Schaefer, P., Forni, M., & Krauer, F. J. V. d. S. G. f. G. u. G. J. I., 13.–15. Juni. (2013). Relation entre un marqueur de prolifération tumorale (Ki-67) et des facteurs pronostiques dans les carcinomes mammaires. 138.

Viassolo, V., Ayme, A., & Chappuis, P. O. J. I. d. I. F. (2016). Cancer du sein: risque génétique. *26*(2), 95-104.

ℵ

Wang, X., Simpson, E. R., & Brown, K. A. J. C. r. (2015). p53: protection against tumor growth beyond effects on cell cycle and apoptosis. *75*(23), 5001-5007.

ℶ

Yang, X., Wu, J., Lu, J., Liu, G., Di, G., Chen, C., . . . Xu, X. J. P. O. (2015). Identification of a comprehensive spectrum of genetic factors for hereditary breast cancer in a Chinese population by next-generation sequencing. *10*(4), e0125571.

ℷ

Zarzynska, J. M. (2017). The Role of Stem Cells in Breast Cancer. In *Breast Cancer-From Biology to Medicine*: IntechOpen.

Zeng, J., Ma, W., Young, R. B., & Li, T. J. J. o. t. N. C. C. (2021). Targeting HER2 genomic alterations in non-small cell lung cancer. *1*(2), 58-73.

Zhang, Z., Bai, X., Sun, P., Wang, X., Long, C., Liao, S., . . . Zhang, X. (2023). Structure and dynamics of the EGFR/HER2 heterodimer.

U

Watanabe, M., Hashida, S., Yamamoto, H., Matsubara, T., Ohtsuka, T., Suzawa, K., . . .

Medicine, T. (2017). Estimation of age-related DNA degradation from formalin-fixed and paraffin-embedded tissue according to the extraction methods. *14*(3), 2683-2688.



Annexes



Annexes

Annexe 1 :

Tableau I : Matériels non biologiques

Appareillage	Réactifs	Matériaux
Plaque réfrigérante	Paraffine	Cassettes
Microtome	Xylène	Lame à microtome Lame bistouri
3 hottes aspirantes	Ethanol 100%, 70% et 50%	Compresse stérile
Vortex	Tampon de lyse	Lame et lamelle
Centrifugeuse	Protéinase K	Pince
Thermobloc	Isopropanol	Porte lames
Balance	Nacl	Tubes ependorf 1,5 ml
Agitateur	Hématoxyline de Mayer	Micropipette 1000ul, 200ul et 100ul
Spectrophotomètre	Eosine aqueuse 2%	Embouts bleus et jaunes
Etuve	Tampon PH6	Eu kit
Bain marie	DAB	Gants
Plaque chauffante	Peroxydase	Masque à filtre
Automate PT Link	Solution Wash Buffer	Lunette de protection
Thermocycler	Anticorps primaires	Dakopen
Cuve d'électrophorèse	Anticorps secondaires	Tube à PCR
Microonde	Bleu juice	
Générateur d'électrophorèse	Bromure d'ethidium (BET)	
Frigo -80°C, -20°C et 4°C	Tampon TAE	
	Nuclease free water	
	Amorces	
	agarose	
	Solution mixer	

Annexes

<p>Annexes 2: Tampon de lyse :</p> <p>Tris/Hcl 10mM</p> <p>EDTA</p> <p>SDS 0,5%</p> <p>Nacl</p>	<p>Annexe 3: Tampon TAE 5X :</p> <p>0,5M EDTA</p> <p>24,25mg de Tris</p> <p>484, 3 d'eau distillée</p>
<p>Annexe 4 : Tampon TAE 1X</p> <p>200ml TAE 5X</p> <p>800ml d'eau distillé</p>	

Annexe 5:

PCR SuperMix High Fidelity

Cat. No. 10790-020

Size: 100 reactions

Store at -20°C.

Description

PCR SuperMix High Fidelity provides qualified reagents for high fidelity amplification of nucleic acid templates by the polymerase chain reaction (PCR). It is effective for either short or long targets. PCR SuperMix High Fidelity contains Mg^{++} , dNTPs, and a mixture of recombinant *Taq* DNA polymerase and DNA Polymerase from *Pyrococcus* species GB-D, at concentrations sufficient to allow amplification during PCR. PCR SuperMix High Fidelity is supplied at a 1.1x concentration to allow approximately 10% of the final reaction volume to be used for the addition of primer and template solutions. This ready to use reagent offers a 6-fold improvement in fidelity over *Taq* DNA Polymerase and is effective in amplification over a large range of target sizes. Targets beyond 12 kb in length may require optimization of PCR cycling conditions and success is heavily dependent on primer and template quality. Reagents sufficient for 100 amplification reactions of 50 μ l each are provided.

PCR SuperMix High Fidelity may be stored at either -20°C or 4°C. Storage at 4°C avoids the necessity of thawing the mix before assembling the PCR.

Annexes

<u>Component</u>	<u>No. tubes</u>	<u>Amt./tube</u>
PCR SuperMix High Fidelity	4	1.125ml

PCR SuperMix High Fidelity

A 22 U/ml DNA polymerase mixture in 66 mM Tris-SO₄ (pH 9.1 at 25°C), 19.8 mM (NH₄)₂SO₄, 2.2 mM MgSO₄, 220 μM dGTP, 220 μM dATP, 220 μM dTTP, 220 μM dCTP and stabilizers.

Part no. 10790020.pps MAN0000901 Rev. date: 1 Jun 2010

For technical support, email tech_support@invitrogen.com.

For country-specific contact information, visit www.invitrogen.com.

Precautions

Since PCR is a powerful technique capable of amplifying trace amounts of DNA, all appropriate precautions should be taken to avoid crosscontamination. Ideally, amplification reactions should be assembled in a DNA-free environment. Use of aerosol resistant barrier tips is recommended. Take care to avoid contamination of PCR SuperMix High Fidelity with the primers or template DNA used in individual reactions. PCR products should be analyzed in an area separate from the reaction assembly area.

Protocols

The following general procedures are suggested as guidelines for use of PCR SuperMix High Fidelity. Assembly of the reactions on ice from pre-chilled components is recommended. Final reaction volumes described below are approximately 50 μl. Reaction size may be altered to suit user preferences.

PCR Assembly from Reaction Components:

- 1) Set up reaction tubes on ice.
- 2) Add the following components in any order to each reaction tube:
 - a) 45 μl PCR SuperMix High Fidelity
 - b) primer solution (200 nM final concentration of each is recommended.)

Annexes

- c) template DNA solution (Total volume of primer and template solutions added can be 0.5-5 μ l)
- 3) Mix contents of tubes and cover with mineral or silicone oil. Depending on the model of thermal cycler used, mineral or silicone oil may not be necessary.
- 4) Cap tubes and load thermal cycler at 94°C.
- 5) Start cycling program file.

PCR Assembly Using Reaction Cocktail

- 1) Set up reaction tubes on ice.
- 2) Add reaction component (*e.g.* primer solution) specific to individual reactions to tubes.
- 3) Prepare cocktail, making enough for an additional reaction to allow for loss during distribution to reaction tubes:
 - a) 45 μ l PCR SuperMix High Fidelity per reaction
 - b) Components (*e.g.* template solution) common to all reactions.
- 4) Mix cocktail well and distribute to reaction tubes (45 μ l plus volume added per reaction by addition of other components).
- 5) Mix contents of tubes and cover with mineral or silicone oil. Depending on the model of thermal cycler used, mineral or silicone oil may not be necessary.
- 6) Cap tubes and load thermal cycler at 94°C.
- 7) Start cycling program file.

Recommended Cycling Program

1 cycle of: 94°C for 30 seconds (Preamplification denaturation) 30–35 cycles of:

94°C for 30 seconds (Denaturation)

55–68°C for 30 seconds (Annealing)

68–72°C for 60 seconds per kb target length (Extension)

* Use of 68°C during extension step of PCR is strongly recommended for fragments > 5 kb in length

Quality Control

Annexes

The Certificate of Analysis provides detailed quality control and product qualification information for each product. Certificates of Analysis are available on our website. Go to www.invitrogen.com/support and search for the Certificate of Analysis by product lot number, which is printed on the box.

Limited Use Label License No. 1: Thermostable Polymerases

Use of this product is covered by one or more of the following US patents and corresponding patent claims outside the US: 5,789,224, 5,618,711, and 6,127,155. The purchase of this product includes a limited, non-transferable immunity from suit under the foregoing patent claims for using only this amount of product for the purchaser's own internal research. No right under any other patent claim, no right to perform any patented method, and no right to perform commercial services of any kind, including without limitation reporting the results of purchaser's activities for a fee or other commercial consideration, is conveyed expressly, by implication, or by estoppel. This product is for research use only. Diagnostic uses under Roche patents require a separate license from Roche. Further information on purchasing licenses may be obtained by contacting the Director of Licensing, Applied Biosystems, 850 Lincoln Centre Drive, Foster City, California 94404, USA.

Limited Use Label License No. 5: Invitrogen Technology

The purchase of this product conveys to the buyer the non-transferable right to use the purchased amount of the product and components of the product in research conducted by the buyer (whether the buyer is an academic or for-profit entity). The buyer cannot sell or otherwise transfer (a) this product (b) its components or (c) materials made using this product or its components to a third party or otherwise use this product or its components or materials made using this product or its components for Commercial Purposes. The buyer may transfer information or materials made through the use of this product to a scientific collaborator, provided that such transfer is not for any Commercial Purpose, and that such collaborator agrees in writing (a) not to transfer such materials to any third party, and (b) to use such transferred materials and/or information solely for research and not for Commercial Purposes. Commercial Purposes means any activity by a party for consideration and may include, but is not limited to: (1) use of the product or its components in manufacturing; (2) use of the product or its components to provide a service, information, or data; (3) use of the product or its components for therapeutic, diagnostic or prophylactic purposes; or (4) resale of the product or its components, whether or not such product or its components are resold for use in

Annexes

research. For products that are subject to multiple limited use label licenses, the terms of the most restrictive limited use label license shall control. Life Technologies Corporation will not assert a claim against the buyer of infringement of patents owned or controlled by Life Technologies Corporation which cover this product based upon the manufacture, use or sale of a therapeutic, clinical diagnostic, vaccine or prophylactic product developed in research by the buyer in which this product or its components was employed, provided that neither this product nor any of its components was used in the manufacture of such product. If the purchaser is not willing to accept the limitations of this limited use statement, Life Technologies is willing to accept return of the product with a full refund. For information about purchasing a license to use this product or the technology embedded in it for any use other than for research use please contact Out Licensing, Life Technologies, 5791 Van Allen Way, Carlsbad, California 92008 ; Phone (760) 603-7200 or email: outlicensing@lifetech.com.

Limited Use Label License No. 117: Thermostable DNA Polymerase Blend

This product is the subject of U.S. Patent No. 5,436,149 and corresponding foreign patents licensed by Takara Corporation to Life Technologies Corporation. This product may be used only for research purposes and may not be resold or used for therapeutic purposes.

©2010 Life Technologies Corporation. All rights reserved.

For research use only. Not intended for any animal or human therapeutic or diagnostic use.

Annexes

Annexe 6 :

Tableau 3 : Amorces, séquences température d'hybridation, code barre et volume pour 100pmol/ µl

Meriem Zaouch-Mehelleb
Pharmacie Wallace
Pharmacie

Order ID: 8447869/11108447869-1
Customer ID: 1353410
Your Order ID (PO#): 2

Order Date: 26.05.2023 13:40:32
Lab No: 5242
No of Oligos: 6/6

Eurofins Genomics
Anzinger Straße 7a
D-85560 Ebersberg

No	Oligo Name	Sequence (5'->3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Conc. [pmol/µl]	Vol for 100 pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Barcode IDO	QC Report
1	F-ACTB	CATGTACGTTGCTATCC AGGC	15,53	450.94	70.49		705	59.8	6397.15	52%	 34356526	QCReport Free
2	R-ACTB	CTCCTTAATGTCACGCA CGAT	17,75	512.11	80.76		808	57.9	6341.12	48%	 34356527	QCReport Free
3	F-Kras	AAGGCCTGCTGAAAATG ACTG	11,32	299.60	46.24		462	57.9	6479.25	48%	 34356528	QCReport Free
4	R-Kras	GTCCTGCACCAGTAATA TGC	16,38	463.43	76.26		763	57.3	6076.96	50%	 34356529	QCReport Free
5	F-Her2	AGAGTCACCAGCCTCT GCAT	13,1	372.63	61.47		615	59.4	6061.95	55%	 34356530	QCReport Free
6	R-Her2	GCAACTCCCAGCTTCA CTTT	14,45	432.21	72.18		722	57.3	5987.88	50%	 34356531	QCReport Free

Résumé :

Le cancer du sein avec récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (ErbB2) représente 15 à 30% des cancers du sein et la prise en charge de ce type de cancer est difficile ; les patientes atteintes de tumeurs mammaires ErbB2 ont une maladie agressive et un mauvais pronostic. L'incidence croissante du cancer du sein en Algérie et les limites des traitements existants posent des défis supplémentaires. Et en vue d'améliorer le diagnostic et augmenter le taux de survie les études moléculaires et génomiques sont primordiales. Notre étude avait comme objectif de tenter d'optimiser des protocoles d'extraction d'ADN à partir de tissus fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) et de déterminer une mutation d'un gène Her2 à partir d'un prélèvement mammaire par amplification génique (PCR). Nous avons suivis le protocole de Boukhari et col, (2014), et Pikor, (2011) auxquels nous avons apporté des modifications. Nos résultats étaient concluants, et selon ces derniers la variation de quelques paramètres étaient cruciales pour un meilleur rendement d'ADN.

Mot clés : cancer du sein, Her2, extraction d'ADN, FFPE, PCR.

Abstract :

Human epidermal growth factor receptor 2 (ErbB2) breast cancer accounts for 15-30% of breast cancers, and management of this type of cancer is difficult; patients with ErbB2 breast tumors have aggressive disease and a poor prognosis. The growing incidence of breast cancer in Algeria and the limitations of existing treatments pose additional challenges. In order to improve diagnosis and increase survival, molecular and genomic studies are essential. The aim of our study was to optimize protocols for extracting DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE) and to determine a Her2 gene mutation from a breast sample by gene amplification (PCR). We followed the protocol of Boukhari et col, (2014), and Pikor, (2011) to which we made modifications. Our results were conclusive, and according to them the variation of a few parameters was crucial for a better DNA yield.

Key words : breast cancer, Her2, DNA extraction, FFPE, PCR.

ملخص:

يمثل سرطان الثدي بمستقبل عامل نمو البشرة البشري 2 (ErbB2) إلى 30% من سرطانات الثدي، كما أن إدارة هذا النوع من السرطان صعبة؛ المرضى الذين يعانون من أورام الثدي ErbB2 يعانون من مرض عدواني وسوء التشخيص. يطرح تزايد الإصابة بسرطان الثدي في الجزائر والقيود المفروضة على العلاجات الموجودة تحديات إضافية. ومن أجل تحسين التشخيص وزيادة معدل البقاء على قيد الحياة، فإن الدراسات الجزيئية والجينومية ضرورية. كان الهدف من دراستنا هو محاولة تحسين بروتوكولات استخراج الحمض النووي من أنسجة الفورمالين الثابتة والمضمنة بالبارافين (FFPE) وتحديد طفرة في جين Her2 من عينة الثدي عن طريق تضخيم الجينات (PCR). لقد اتبعنا بروتوكول بخاري وآخرون (2014) وبيكور (2011) الذي أجرينا عليه التعديلات. كانت نتائجنا حاسمة، ووفقاً لها، كان تباين بعض المعلمات أمراً حاسماً للحصول على إنتاجية أفضل للحمض النووي.

الكلمات المفتاحية: سرطان الثدي، Her2، استخراج الحمض النووي، FFPE، PCR

