REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Yahia Fares de Medea

Projet de mémoire en vue de l'obtention du

Diplôme de Master 2 en Biologie

Option : Immunologie et maladies infectieuses

ANALYSE DE L'EXPRESSION DE P53 SUR RELIQUATS TUMORAL APRES CHIMIOTHERAPIE NEO ADJUVANTE DES CANCERS DU SEIN TRIPLES NEGATIFS

Présenté par
Meriem Harrar

Soutenu le 23 Septembre 2020

Devant le jury :

	Nom	Grade	Etablissement
Président(e) :	**Khames Mammar**	**Maitre de conférence**	**Université Yahia Fares Médéa**
Examinateur :	**Benhafri Nadir**	**Maitre assistant**	**Université Yahia Fares Médéa**
Promoteur :	**Kouchkar Amal**	**Professeur**	**CPMC - ALGER**
Co- promoteur :	**Oumouna Mustapha**	**Professeur**	**Université Yahia Fares Médéa**

REMERCIEMENTS

A dieu tout puissant et miséricordieux pour m'avoir donné la volonté, le courage et la patience pour réaliser et venir a bout de ce travail.

Je tiens d'abord à remercier M^{me} Kouchkar, Professeur au Centre Pierre et Marie Curie pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire et pour m'avoir accordé sa confiance.

Qu'il me soit permis de vous témoigner toute ma gratitude et mon profond respect d'avoir contribué à ce travail qui grâce à votre esprit rigoureux et précieux conseils ainsi que vos corrections a pu être réalisé.

Je vous pris de trouver ici le témoignage de ma reconnaissance éternelle, mon admiration et ma haute considération.

Je tiens à adresser mes sincères remerciements à Mr Oumouna, mon directeur de mémoire, maitre de conférence à l'université Yahia Farès de Médéa, pour avoir corrigé et suivi mon travail. Pour ses précieux conseils et sa disponibilité. Je lui exprime mes respectueuses considérations.

Je remercie Mr Benhafri pour l'honneur que vous me faite en acceptant d'examiner ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance, de mon profond respect et de ma haute considération.

Je remercie Mr Khames pour m'avoir fait l'honneur d'évaluer et juger ce travail. Veuillez retrouver ici l'expression de ma vive reconnaissance et ma respectueuse considération.

DEDICACES

A mon père

Homme de principes, sage et humaniste.

A toi papa qui aussi longtemps que je me souvienne t'es battu pour que je ne manque de rien pour mener a bien mes études.

Toi qui m'a soutenue encourager et toujours été présent pour moi dans tout mon parcourt.

Les mots ne sauront jamais exprimer ce que tu représente pour moi.

A mon tour cher papa de t'honorer aujourd'hui demain et aussi longtemps que je vivrai.

Bonheur et longue vie à toi mon cher papa.

DEDICACES

A ma mère

Je suis la ou j'en suis grâce à ta bénédiction, tes doux et précieux conseils.

Toi qui n'arrivais pas à dormir quand j'étais triste ou anxieuse

Toi qui m'as toujours assisté et réconforter

Les mots me manquent pour t'exprimer mon amour et ma gratitude.

Bonheur et longue vie à toi ma chère maman.

DEDICACES

A ma sœur Sarah

La fraternité est un lien précieux qu'il nous convient de consolider et garder.

Aujourd'hui je te remercie car malgré toutes nos chamailleries tu m'a toujours écouter et soutenue dans mes projets.

Puissions-nous toujours garder ce lien et cette complicité qu'il nous a été donné d'avoir.

Bonheur et longue vie à toi

DEDICACES

A toute la famille Harrar et Benfarès

A mes grands parents.

A mes oncles et tantes ainsi que tous mes chers cousins et chères cousines.

Enfin, à tous mes amis (es).

DEDICACES

A toute la famille Oumouna

A monsieur et madame Oumouna, Amira, Imene et Rym

Merci pour tout ce que vous m’avez apport

RESUME

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et malgré une baisse de la mortalité ces dernières années, attribuable à une détection précoce et une meilleure prise en charge, il reste la première cause de mortalité par cancer et demeure donc un problème majeur de santé publique. La mortalité par cancer du sein s'avère être plus élevée dans le cas des cancers dits agressifs ou de mauvais pronostic tel que le cancer du sein triple négatif (CSTN).

Avec près de 80% de mutations, le gène p53 est fortement impliqué dans la multiplication et la progression de la maladie.

Le cancer du sein étant une maladie hétérogène, individualiser les traitements des patientes est désormais l'un des objectifs premiers des praticiens. C'est autour de cet objectif commun que s'est articulée notre étude.

Notre objectif a porté sur l'analyse du profil du p53 sur des résidus tumoraux post chimiothérapie néo adjuvante des cancers du sein triples négatifs grâce à une technique immuno-histochimique sur un total de 10 patientes. Cette base nous permet de mettre en avant l'intérêt de la chimiothérapie néo adjuvante pour déterminer de nouveaux facteurs pronostics, prédictifs et bio-marqueurs.

Nous avons observé que la tranche d'âge la plus touchée se situe entre 40 et 50 ans. Le type histologique a été pour l'ensemble des patientes du Carcinome canalaire infiltrant.

Le grade histopronostique de Scarff-Bloom et Richardson indique que 8 patientes ont un grade III et 2 patientes ont un grade II.

Les résultats immunohistochimiques ont montrés que 6 patientes étaient des triples négatifs basal-like et 4 patientes étaient non basal-like.

Mots clés : cancer du sein triple négatif, p53, récidives, chimiothérapie néo adjuvante, immuno-histochimie, reliquat tumoral, thérapie ciblée, bloc TMA, anticorps anti-P53, bio-marquer.

الملخص

سرطان الثدي هو أكثر أنواع السرطانات شيوعًا بين النساء ، وعلى الرغم من انخفاض معدل الوفيات في السنوات الأخيرة ، والذي يُعزى إلى الاكتشاف المبكر والإدارة الأفضل ، إلا أنه يظل السبب الرئيسي للوفيات الناجمة عن السرطان وبالتالي يظل مشكلة. تخصص في الصحة العامة. تم العثور على معدل وفيات سرطان الثدي أعلى في ما يسمى سرطانات عدوانية أو سيئة التشخيص مثل سرطان الثدي السلبي الثلاثي (CSTN).

مع ما يقرب من 80٪ من الطفرات ، يشارك الجين p53 بقوة في تكاثر المرض وتطوره.

لكون سرطان الثدي مرضًا غير متجانس ، أصبح تخصيص علاجات المريض الآن أحد الأهداف الأساسية للممارسين.

حول هذا الهدف المشترك تم تنظيم دراستنا.

كان هدفنا تحليل ملف p53 على بقايا الورم بعد العلاج الكيميائي الجديد لسرطان الثدي الثلاثي السلبي باستخدام تقنية كيميائية مناعية على ما مجموعه 10 مرضى. تسمح لنا قاعدة البيانات هذه بتسليط الضوء على اهتمام العلاج الكيميائي المساعد الجديد لتحديد عوامل الإنذار والتنبؤ والعلامات الحيوية الجديدة.

لقد لاحظنا أن الفئة العمرية الأكثر تضررًا تتراوح بين 40 و 50 عامًا.

كان النوع النسيجي لجميع المرضى الذين يعانون من سرطان الأقنية الغازية.

تشير درجة التشخيص النسيجي في سكارف بلوم وريتشاردسون إلى أن 8 مرضى من الدرجة الثالثة ومرضى من الدرجة الثانية

أظهرت النتائج الكيميائية المناعية أن 6 مرضى يشبهون القاعدية السلبية الثلاثية وأن 4 مرضى غير قاعديين

الكلمات الرئيسية: سرطان الثدي السلبي الثلاثي ، p53 ، الانتكاس ، العلاج الكيميائي المساعد الجديد ، الكيمياء المناعية بقايا الورم ، العلاج الموجه ، TMA ، الجسم المضاد لـ P53 ، المرقم الحيوي.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common cancer in women and despite a decline in mortality in recent years, attributable to early detection and better management; it remains the leading cause of cancer mortality and therefore remains a major problem in public health. Breast cancer mortality is found to be higher in so-called aggressive or poor prognosis cancers such as triple negative breast cancer (CSTN).

With nearly 80% mutations, the p53 gene is strongly involved in the multiplication and progression of the disease.

Breast cancer being a heterogeneous disease, individualizing patient treatments is now one of the primary objectives of practitioners. It is around this common objective that our study has been structured. Our objective was to analyze the profile of p53 on tumor residues post neoadjuvant chemotherapy of triple negative breast cancers using an immunohistochemical technique on a total of 10 patients. This base allows us to highlight the interest of neoadjuvant chemotherapy to determine new prognostic, predictive and biomarker factors.

We have observed that the most affected age group is between 40 and 50 years old.

The histological type was for all the patients an invasive ductal carcinoma.

The histopronostic grade of Scarff-Bloom and Richardson indicates that 8 patients have grade III and 2 patients have grade II.

The immunohistochemical results showed that 6 patients were basal-like triple negative and 4 patients were non-basal-like.

Key words: triple negative breast cancer, p53, recurrence, neoadjuvant chemotherapy, immunohistochemistry, tumor residue, targeted therapy, TMA block, anti-P53 antibody, biomarker.

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction…….09

Chapitre I : Introduction bibliographique : ……11

1- Anatomie du sein……...11

2- La glande mammaire……..13

3- Cancer du sein et épidémiologie……....15

4- Facteurs de risques du cancer du sein……17

5- Facteurs histopronostics du cancer du sein : …….20

5.1- Facteurs cliniques

5.2- Facteurs histopathologiques

5.3- Facteurs immuno-histochimiques

6- Classification du cancer du sein : ……..24

6.1- Classification histologique

6.2- Classification moléculaire

7- Stratégies thérapeutiques du cancer du sein : ……32

7.1- Thérapie ciblée

7.2- Thérapie néo-adjuvante dans le cancer du sein

7.3- La réponse pathologique complète

8- Classification histopathologique de la réponse à la chimiothérapie : ……35

8.1- La charge cancéreuse résiduelle

9- La protéine P53 : …….36

9.1- Le gène

9.2- La structure

9.3- Voies de signalisation de p53

9.4- P53 et cancer du sein

9.5- L'anti oncogène P53

Chapitre II : Matériels et méthodes ……..49

Chapitre III : Résultats et discussion ……59

Conclusion…….66

Références bibliographiques ……..67

Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique du sein

Figure 2 : Place du cancer du sein dans le monde

Figure 3 : Tendances du cancer du sein-femmes 2008-2015

Figure 4 : Classification moléculaire des CSTN

Figure 5 : Calculateur virtuel de la charge cancéreuse résiduelle

Figure 6 : Structure biochimique de la p53 et schéma des domaines protéiques de la p53

Figure 7 : Signalisation P53-MDM2

Figure 8 : Voies de signalisation de P53

Figure 9 : Prévalence des mutations de p53 dans les cancers sporadiques

Figure 10 : Modèle structural de p53 et p53-Ab

Figure 11 : Schéma de la technique d'immuno-histochimie

Figure 12 : Appareil à TMA

Figure 13 : Schéma récapitulatif des différentes étapes de la technique TMA par un automate

Figure 14 : Principe de la technologie TMA manuelle

Figure 15 : Répartition des patientes selon l'âge

Figure 16 : Répartition des patientes selon la taille tumorale

Figure 17 : Répartition des patientes selon le grade SBR

Figure 18 : Répartition des patientes selon l'étude immunohistochimique

Figure 19 : Répartition des patientes selon la réponse histologique au niveau du sein

Figure 20 : Répartition des patientes selon la réponse au niveau des ganglions

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

AG/AC: Antigène/Anticorps

ARF: Alternate reading frame

ARN : Acideribonucléique

BL: Basal-like

Bl1/BL2: Basal-like 1/Basal-like2

BLIA: Basal-like immune-activated

BLIS: Basal-like immune-suppressed

BRCA : Breast cancer gene

CCIS : Carcinomecanalaire in situ

CIC : Carcinome invasive canalaire

CIL : Carcinome invasive lobulaire

THS : Traitement hormonal substitutif

CLIS : Carcinome lobulaire in situ

CSTN : Cancers du sein triples négatifs

CTNA: Chimiothérapie néo-adjuvante

DDR: DNA damage response

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor 2

IHC : Immunohisto-chimie

IM: Immunomodulatory

LAR: luminal androgen receptor

M: Mesenchymal-like

MAPK : Mitogen-activated protein kinase

MES: Mesenchymal

MDM2: Murine double minute2

MSL: Mesenchymal stem-like

P53 : Protéine 53

pCR: Réponse pathologique complète

Protein RB: Rétinoblastomaprotein

RCB : Residual cancer burden

RCH : Réponse complète histopathologique

RE : Récepteur estrogènes

RH : Récepteurs hormonaux

RP : Récepteur progestérone

SBR : Scarff-Bloom et Richardson

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse

TMA: Tissue Micro Array

TN : Triple négatif

TNM : T-taille tumorale

N-envahissement ganglionnaire

M-métastases

TSP-1: Thrombospondine-1

VEGF: Vascular endothelial growth factor

Introduction

Le cancer du sein représente la première cause de morbidité et mortalité chez la femme. Se caractérisant par son extrême fréquence.

Dans le monde, c'est plus de un million de nouveaux cas qui sont recensés chaque année

En Algérie on assiste à une nette progression, son incidence ne cesse de croitre et se rapproche de l'incidence mondiale (80 nouveaux cas pour 100 000 femmes). Plus de 7000 nouveaux cas sont recensés chaque année.

C'est une maladie multifactorielle et à évolution lente atteignant les femmes à des âges différents.

Le terme « cancer du sein » couvre une grande variété de pathologies cancéreuses affectant ce même organe, lui conférant le caractère d'hétérogénéité.

Cette variété est révélée par une grande diversité des caractères histologiques de ces tumeurs ainsi que leur évolution clinique.

L'histopathologie occupe une place importante parmi les méthodes de diagnostic du cancer du sein. Il se développe à partir des cellules épithéliales des canaux et lobules : des carcinomes représentant 98% des cas de cancers mammaires.

Le carcinome canalaire infiltrant (CCI) occupe la première place avec 70% des cas, le carcinome lobulaire infiltrant (CLI) est retrouvé dans 5 à 15% des cas. Les carcinomes in situ représentent 15% des cas.

La recherche d'expression de certaines molécules en relation avec l'état pathologique reste l'outil principal de dépistage, suivi thérapeutique, de rémission ou récidives.

Parmi les patientes atteintes de cancer du sein métastatique, 15 à 20% présentent une forme particulièrement grave de la maladie : le cancer du sein triple négatif caractérisé par l'absence d'expression des récepteurs hormonaux ainsi que l'absence de l'oncorécepteur HER2. Cette absence d'expression se traduit par une augmentation de la résistance de la tumeur au traitement aggravant encore plus leur mauvais pronostic.

Des mutations sur des gènes, transmises d'une génération à l'autre ou bien acquises au cours de la vie peuvent causer un cancer du sein. Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des gènes qui codent pour des protéines régulant négativement la prolifération cellulaire ou exerçant un effet répresseur sur certains oncogènes. Ils sont des gardiens de l'intégrité du matériel génétique et correspondent aux gènes d'arrêt du cycle cellulaire. La perte ou l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs peut contribuer à la cancérogénèse. Parmi ces gènes, on trouve le gène p53 qui a de multiples fonctions biologiques du gène suppresseur (régulateur de l'expression de gènes cruciaux du cycle cellulaire, de la réparation et de la division cellulaire...). Depuis plusieurs années, la compréhension des fonctions de p53 et des moyens de la réguler constitue un important défi de la recherche contre le cancer.

L’objectif de notre travail a été d’analyser l’expression de la protéine P53 sur 10 blocs de reliquats tumoraux de patientes diagnostiquées avec un cancer du sein triple négatif après avoir reçu une chimiothérapie néo-adjuvante.

Rappels bibliographiques

I- **Anatomie du sein**

Le sein est un organe qui contribue à l'intégrité de l'image corporelle de la femme, il revêt une importance cruciale en représentant à la fois le symbole de la féminité et de la maternité.

Dans ce cas là toute blessure ou mutilation de cet organe entraine des traumatismes psychiques nécessitant pour les surmonter des processus d'adaptation parfois défaillant.

Une meilleure connaissance du sein contribue à une meilleure préservation de cet organe.

Les seins occupent la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum en avant des muscles pectoraux, en regard de l'espace compris entre la 3ème et la 7ème côte, le mamelon se situant au niveau de la 9ème vertèbre dorsale. En position debout, sous l'influence de son propre poids, le sein tombe légèrement, ce qui créé le sillon infra-mammaire entre la moitié inférieure du sein et le thorax.

Cliniquement le sein est divisé en quatre quadrants :

- Supéro-externe
- Supéro-interne
- Inféro-externe
- Inféro-interne.

Ceci ne correspond à aucune réalité anatomique, c'est une convention de « repérage ».

Configuration externe :

Le sein comporte d'avant en arrière le tégument, le tissu conjonctif sous-cutané et le corps mammaire renfermant la glande mammaire, ainsi qu'un tissu conjonctif lâche permettant au corps mammaire discoïde de glisser en arrière sur le plan musculaire du grand pectoral.

On distingue dans chaque sein 3 zones :

La zone périphérique : **Peau** fine se continue vers l'aréole parfois duveteuse.

La zone moyenne : **l'Aréole** : disque cutané circulaire de 15 à 30mm de diamètre, coloration plus foncée que la peau Sa surface est irrégulière, on y observe de petites saillies (12 à 20) les tubercules de Morgagni : ce sont des glandes sébacées qui, pendant la grossesse sont plus volumineuses et plus nombreuses : les tubercules de Montgoméry.

La zone centrale : le Mamelon, cylindrique, pigmenté, séparé de l'aréole par un sillon A la surface du mamelon, les orifices d'abouchement (les pores) des canaux galactophores sont

disposés de façon circonférentielle. Chacun est bordé d'un épithélium kératinisant. En période de repos, hors grossesse et allaitement, ils sont habituellement comblés de kératine. (Roux.M.2013)

Le mamelon et l'aréole forment une unité**, la plaque Aréolomamelonnaire**.

Structure du sein :

Peau, mamelon, aréole et muscle aréolaire, glande mammaire, tissu adipeux (adipocytes) et un tissu conjonctif (Figure 1).

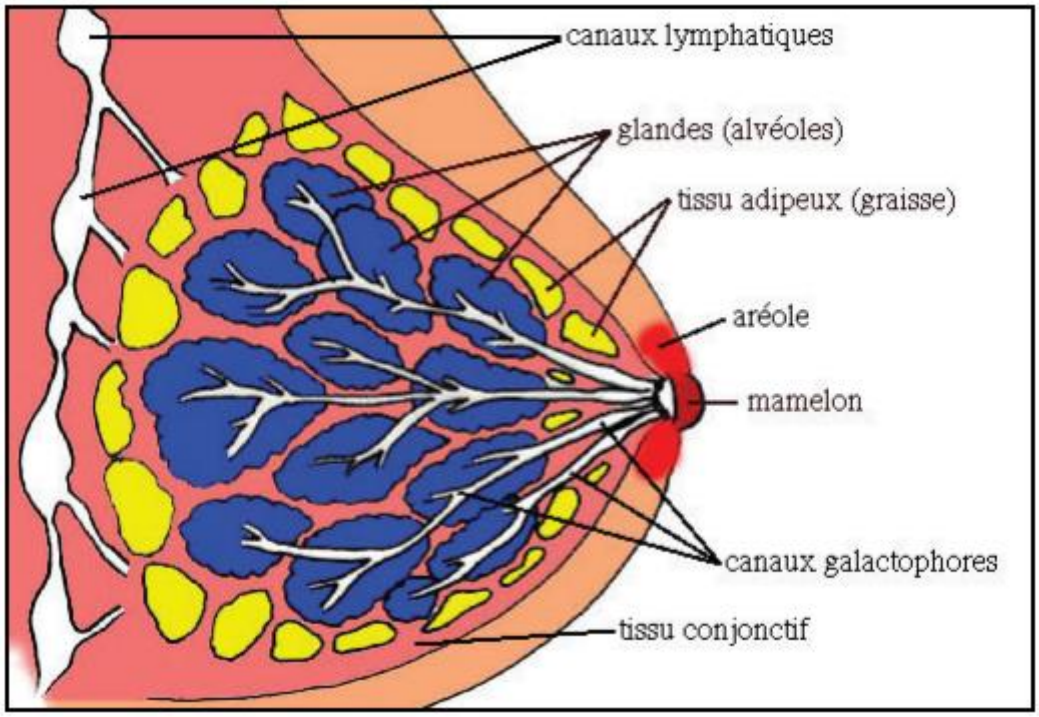


Figure 1 : représentation schématique du sein

La Glande mammaire :

Chacune des deux glandes mammaires est une glande exocrine, tubulo-alvéolaire composée, sécrétant le lait. On y trouve un système ramifié de canaux excréteurs terminés en cul-de-sac par des portions sécrétrices tubulo-alvéolaires

Chaque glande mammaire est constituée de 10 à 20 lobes drainés par des canaux galactophores collecteurs « lactifères » s'ouvrant individuellement à la peau au niveau du mamelon. Chaque lobe est lui-même constitué de 20 à 40 lobules, et chaque lobule étant constitué de 10 à 100 alvéoles, ou acini, correspondant à la partie sécrétrice de la glande.

Les canaux galactophores convergents vers le mamelon, ils s'élargissent pour former les sinus lactifères, puis se rétrécissent et débouchent au niveau des pores du mamelon. (Roux.M. 2013).

Les éléments lobaires :

l'Acinus (Alvéole) : c'est l'unité de base il est bordé de dedans en dehors par une couche de cellules cubiques, puis une couche de cellules myoépithéliales plates et étoilées, enfin d'une membrane basale.

Les canaux excréteurs : ils présentent de dehors en dedans: une vitrée renforcée d'une gaine conjonctivo-élastique; des cellules myoépithéliales longitudinales; d'une couche de cellules épithéliales cubiques.

Le tissu de soutien : c'est un tissu conjonctif parsemé de nombreux lobules adipeux ; les glandes mammaires se logent dans ce tissu où l'on distingue :

• **Le tissu inter-lobulaire** : il est situé entre les lobules et loge les canaux excréteurs et les vaisseaux.

• **Le tissu intra-lobulaire** : plus délicat, il loge les acini, les canaux intra-lobulaires et les dispositifs vasculaires et nerveux.

Cancer du sein :

La notion de « cancer du sein » révèle d'une nomenclature générique qui fait référence à tout un ensemble de prolifération néoplasique de la glande mammaire qui différent tant du point de vue histologique qu'en ce qui concerne leur comportement évolutif.

Le terme « cancer du sein » ne désigne que les tumeurs malignes potentiellement agressives du sein tandis que le terme « tumeur du sein » désigne à la fois les tumeurs malignes et bénignes.

Le cancer du sein est une prolifération maligne des cellules épithéliales au niveau canalaire ou lobulaire, le cancer du sein humain est le résultat final d'une série de mutations somatiques acquises ou germinales (héréditaire) ,peut exprimé le plein potentiel malin dans une série d'événements qui se produisent de manière séquentielles et aléatoires . (Mombelli.S.2014).

Epidémiologie du cancer du sein :

A l'échelle mondiale :

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes dans le monde et représente 16% de l'ensemble des cancers féminins. C'est l'un des principaux cancers dans le monde en termes de nombre de nouveaux cas : on estime à environ 2,1 millions le nombre de diagnostics de chacun de ces cancers en 2018, qui représentent environ 11,6 % de l'incidence du cancer (Globocan2018).

Les taux d'incidence varient énormément dans le monde, moins de 10% des cancers du sein surviennent avant 40ans et 75% se déclarent après 50ans l'incidence augmente ensuite régulièrement jusqu'à 65ans. (INCA Avril 2016).

Le cancer du sein chez la femme vient au cinquième rang des causes de décès (627 000 décès, ou 6,6 % du total), son pronostic étant relativement favorable, du moins dans les pays développés (Globocan2018).

Il représente le cancer le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les femmes dans 156 pays parmi les 185 couverts par Globocan en 2018 (Figure 2).

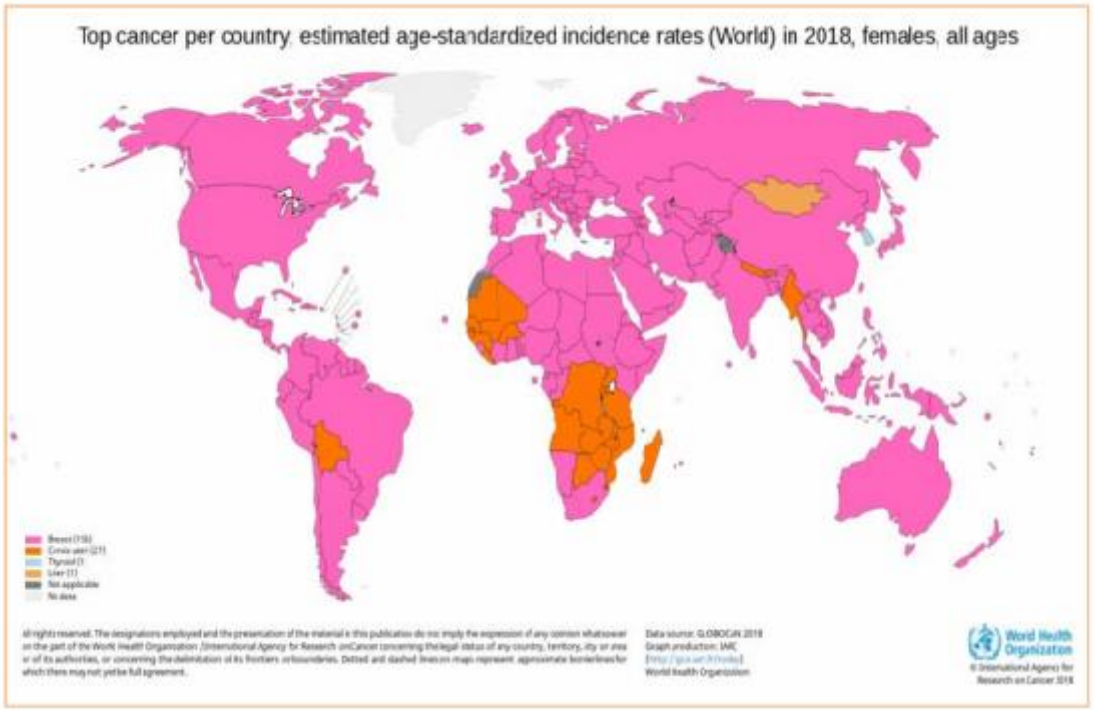


Figure 2 : place du cancer du sein dans le monde

En Algérie :

En Algérie on assiste à une véritable transition épidémiologique avec 7500 nouveaux cas sont diagnostiqués et enregistrés chaque année avec plus de 3500 décès. Le cancer du sein est devenu un problème de santé publique majeur avec une réelle urgence d'intervention et de prise en charge (Hamdi.C.2015).

37.4% des cancers féminins sont représentés par le cancer du sein, son incidence ne cesse de croitre et se rapproche de l'incidence mondiale (80 nouveaux cas pour 100 000 femmes) (Registre des tumeurs d'Alger 2015) (Figure 3).

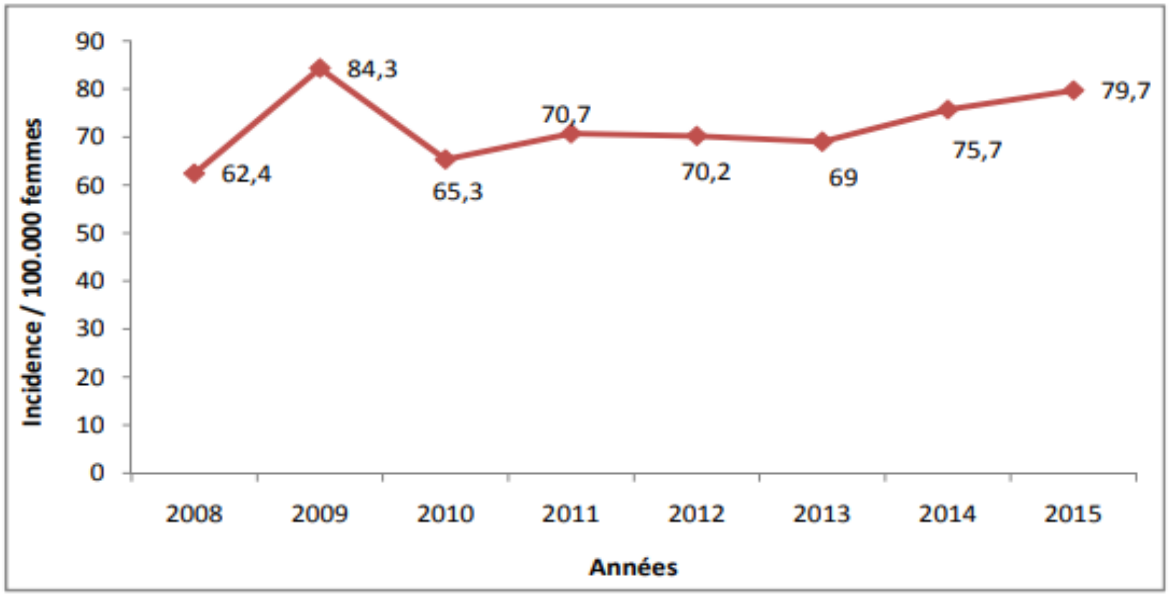


Figure 3 : tendances du cancer du sein – femmes- 2008-2015.

Facteurs de risques :

Bien que les causes exactes du cancer du sein restent encore inconnues et mal défini , plusieurs facteurs de risques ont pu être identifiés .

Le cancer du sein est considéré comme étant multifactoriel.

Pendant très longtemps la maladie a été considérée comme étant une « punition du ciel » la médecine faisait alors appel au surnaturel, le médecin faisait figure de prêtre intercédant auprès du ciel pour obtenir la guérison. Après qu'Hippocrate répudia la magie et les superstitions il instaura la théorie des humeurs dont l'équilibre assure une bonne santé. Elle sera définitivement réfutée et abandonnée en 1751. (Rouesse J.2011).

La science moderne a sans doute définitivement régulée la grande majorité des superstitions et théories de la carcinogenèse, cependant un bon nombre de facteurs de risques sont évoqués :

1- Le sexe :

Il est noté que 99% des cancers du sein touche le sexe féminin ; le cancer du sein masculin ne représente que 1% des cancers du sein. (Institut National du cancer).

Lorsqu'il ya une atteinte masculine dans des familles regroupant de nombreux cas de cancer du sein c'est une mutation du BRCA2 (Breast cancer gene) qui est la plus fréquemment observée. Un homme apparenté à une femme atteinte de cancer du sein voit son risque multiplié par 2. (Espié M.2007).

2- L'âge :

Le risque d'avoir un cancer du sein augmente avec l'âge même s'il peut atteindre des femmes a des âges très différents, En effet on estime que 80% des cancers du sein se développe après 50 ans. (Institut National du cancer) .

3- Facteurs gynéco-obstétriques :

Le rôle des facteurs gynéco-obstétriques dans la genèse du cancer du sein est évoqué de façon indirecte depuis fort longtemps. Aujourd'hui il est reconnu de façon consensuelle que le cancer du sein est un cancer hormonaux-dépendant.

A- Age précoce des premières menstruations :

De nombreuses études montrent que la survenu des premières règles avant l'âge de 12 ans augmente le risque du cancer du sein (Kelsey JL et al.1993) , en effet l'âge de la ménnarchiedétermine le moment de la production des œstrogènes et progestérone par les ovaires et ce jusqu'à la ménopause ou celle-ci cesse.

B- Ménopause tardive :

Un âge tardif à la ménopause est également un facteur de risque reconnu du cancer du sein, associé à une augmentation de risque de cancer de 3% par année supplémentaire (Chapelon.C.2002).

La survenue de la ménopause après 50ans constitue un risque accrue au cancer du sein.

C- Contraception orale :

Dans la littérature le lien entre le cancer du sein et les contraceptifs oraux est très controversé.

Une méta-analyse de 54 études montre que la prise de contraceptifs oraux est associée à une augmentation du cancer du sein (Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast.1996) .les résultats de cette étude montrent que les femmes en cours d'utilisation de contraceptifs oraux ont un risque relatif augmenté de cancer du sein comparativement aux non utilisatrices. Cette augmentation diminue progressivement et disparait complètement 10 ans après cet arrêt.

D- Ovariectomie et traitement hormonal substitutif (THS) :

Dans la population générale et chez les femmes porteuse d'une mutation BRCA 1/2 l'ovariectomie prophylactique bilatérale réduit le risque de cancer du sein d'au moins 50%.

Le traitement hormonal substitutif (TSH) de la ménopause est prescrit aux femmes pour palier la carence oestrogénique consécutive à l'arrêt de la fonction ovarienne survenant à la ménopause, il peut améliorer voir faire disparaitre complètement certains symptômes de la ménopause et à long terme il prévient l'ostéoporose. Les femmes sous THS présentent un risque augmenté de cancer du sein si on les compares aux femmes qui ne l'ont jamais utilisé, pour les femmes ayant suivit un traitement THS pendant 5ans ou plus il peut y avoir une augmentation de risque de 26% à 35% (Chapelon.C.2002) (Nadi S et al 1995).

4- Histoires familiales :

Plus de 50 études ont mis en évidence la relation entre le risque de cancer du sein et une histoire familiale du cancer du sein, le document le plus ancien d'histoire de cancer du sein date de 1757 et a été rédigé par le Dr Dran (chirurgien français) à l'occasion du diagnostic de cancer du sein chez une jeune femme de 19 ans (Serin D et al .Lancet 1998).

De manière générale l'histoire familiale est associée à un risque accru de cancer du sein, le risque relatif est d'environ 2 pour toute forme de parenté et l'excès de risque est plus marqué chez les jeunes femmes et lorsque la maladie s'est manifestée chez un proche parent (mère, fille ou sœur…) avant l'âge de 50ans (Pharoah PD et al, Int J Cancer 1997).

5-mutations génétiques :

Seuls 5 à 10% des cas de cancer du sein sont liés à des anomalies génétiques héréditaires, le pourcentage qu'une femme de 30ans ayant une mère ou une sœur atteinte d'un cancer du sein développe cette pathologie avant l'âge de 70ans est situé entre 7% er 18% (Sakorafas et al.2002) (13) (KaabiBatoul 2015-2016).

Plusieurs gènes impliqués dans la carcinogenèse mammaire héréditaire ont été identifiés, les principaux sont BRCA1, BRCA2 (Breast Cancer Gene), p53, PTEN, CHEK2 et Ataxiatelengiectasia (AT) mais la plus grande majorité des cancers du sein héréditaires sont attribués aux gènes BRCA1 et BRCA2 (Dumitrescu et al.2005).

Le BRCA1 est localisé sur le chromosome 17 et code pour une protéine nucléaire impliquée dans le contrôle de la recombinaison mitotique. Le BRCA2 est localisé sur le chromosome 13 impliqué dans la régulation de la transcription avec une fonction suppresseur de tumeurs et interagit avec BRCA1 dans les voies d'activation de la protéine p53.

Le gène p53 situé sur le chromosome 17 est un des gènes les plus mutés dans les cancers humains (environ 50% des cancers). Les femmes affectées par une mutation de p53 ont un risque plus élevé de développées un cancer du sein avant l'âge de 45ans.

Les femmes portant des mutations de BRCA1 et BRCA2 présentent un risque considérable de développer un cancer du sein (80%).

Ce risque est dix fois supérieur à celui de la population générale, chez l'homme ce risque est estimé à 6%. (KaabiBatoul 2015-2016) (14) (Daly, P.A, et al. 2005) (16) (Ford D, et al. Am J Hum Genet 1998).

6- Obésité et indice de masse corporelle (IMC) :

L'obésité est défini par un indice de masse corporelle supérieur ou égale à 30Kg/m2 a un effet controversé elle augmente le risque du cancer du sein d'environ 50% chez les femmes ménopausées, probablement à cause de l'augmentation des concentrations sérique d'œstradiol libre (KaabiBatoul 2015-2016) .alors qu'elle diminue le risque de cancer du sein avant la

ménopause, en effet avant la ménopause les femmes obèses ou en surpoids ont un plus faible nombre d'ovulations et un effondrement du taux d'hormones sanguins, à la ménopause la production d'œstrogènes est stoppée dans les ovaires mais elle se poursuit dans le tissue adipeux.

Le tissu adipeux est également un site de stockage et de métabolisme des stéroïdes sexuels, après la ménopause l'aromatisation des androgènes dans le tissu adipeux est l'une des plus considérables sources d'œstrogènes circulants. (KaabiBatoul 2015-2016)

7- Manque d'activité physique :

L'activité physique quelle soit professionnelle, domestique ou de loisir joue un rôle protecteur reconnu dans la survenu du cancer du sein. Sur le plan biologique l'activité physique permet la réduction de la production d'œstrogènes et le maintien de l'équilibre énergétique (Eliassen AH. Et al 2010) (Lahman PH. Et al 2007) (Gonclaves AK. Et al 2014) (Speck RM. Et al 2011) (Monninkhof EM. Et al 2007).

L'activité physique modérée (30 à 60min au moins 4fois par semaine) diminue le risque de cancer du sein d'environ 35% , notamment chez les femmes ménopausées .

Une activité physique intense chez la jeune fille peut perturber et retarder la puberté et diminuer le taux d'hormones circulantes, par conséquent elle diminue l'exposition aux œstrogènes endogènes et donc le risque de cancer du sein va diminuer avec l'intensité de l'activité physique (Monninkhof EM et al 2007).

L'obésité après la ménopause est un facteur de risque indépendant du cancer du sein ; elle peut être évitée par l'activité physique qui permet de maintenir l'équilibre énergétique.

8- Facteurs environnementaux :

Tels que l'exposition aux **radiations ionisantes** avant l'âge de 40ans sont capables de générer un cancer du sein dans les années ultérieures notamment du fait que les radiations causent des dommages à l'ADN et ses constituants et le sein est l'un des organes les plus sensibles aux radiations (Lahman PH. Et al 2007).

La **consommation de tabac:** le tabagisme passif semble être associé à un risque augmenté d'environ 60% ; ce risque est multiplié par trois chez la femme ménopausée (Johnson KC et al.2000).

La **consommation d'Alcool** provoque une augmentation des hormones dans le sérum et une production accrue de facteur de croissance IGF (Insulin-likeGrowth Factor). Les IGF agissent comme des mitogènes, inhibant l'apoptose et interagissant avec les œstrogènes augmentant ainsi le risque de cancer du sein surtout avant la ménopause (Yu H.1998).

Facteurs histopronostics du cancer du sein :

Le cancer du sein étant une maladie hétérogène aussi bien sur le plan clinique, biologique et morphologique deux principaux facteurs ont été défini en vue de prédire l'évolution clinique de la maladie (risque de récidives et décès) à fin d'être en mesure d'attribuer un quelconque traitement aux patients : les **facteurs pronostics** permettent en absence de traitement de prédire l'évolution de la maladie, les **facteurs prédictifs** évaluent la capacité de réponse tumorale à un traitement médicale (Monbelli.S.2014) ceci devra prendre en compte :

-la taille histologique

-le type histologique

-compte des mitoses

-le grade histologique

-statut histologique des ganglions lymphatiques

-statut des récepteurs hormonaux

-statut HER2

Facteurs clinique :

A- **Age :**

Des études ont montré que des patientes âgées de moins de 40ans au moment du diagnostique ont une moins bonne survie ainsi qu'un taux de rechute locorégionale plus important (Fredholm, H. et al 2009) De plus ces patientes présentent plus souvent des tumeurs agressives non hormonosensibles avec un index de prolifération Ki67 élevé par rapport aux tumeurs rencontrées chez les patientes âgées de plus de 50ans (Morrison DH. et al.2012).

Le facteur « jeune âge » semblerait être de moins bon pronostic.(Keegan.et al.2012)

B- **Stade clinique et taille tumorale** :

Il s'agit de la taille tumorale macroscopique mesurée avant la réalisation de la fixation. La classification **TNM** de l'*International Union Against Cancer* permet de classer la tumeur en tenant compte de sa taille (T), l'existence d'un envahissement ganglionnaire (N), et l'existence de métastases (M) (Annexe 4).Le stade du cancer du sein est donc un facteur pronostic important : un stade inférieur engendre moins de risque de récidives et un pronostic plus favorable contrairement à un stade supérieur (Neville AM. Et al 1992).

Facteurs histo-pathologiques :

A- **Envahissement des ganglions axillaires :**

En cancérologie mammaire c'est le facteur pronostic le plus important et le mieux connu, l'étude de l'envahissement ganglionnaire axillaire est effectué via le curage axillaire, qui pour être représentatif doit comporter l'étude d'au moins dix ganglions (Fitzgibons, P.L. et al 2000).

Actuellement quatre sous groupes selon le nombre de ganglion métastatique sont proposés : 0, 1-3, 4-9, 10 et plus. De nombreuses études ont corrélé la survie globale et la survie sans rechute au nombre de ganglions envahis ; de plus le pronostic est d'autant plus péjoratif que le nombre de ganglions envahis est important (Atahan, I.L. et al 2008). Plus récemment une méta analyse de the EarlyBreast Cancer Trialists Collaborative Groupe (EBCTCG) a confirmé ces données en montrant que le risque d'évolution métastatique à 5ans chez des patients de moins de 50ans sans atteinte ganglionnaire axillaire était de 27.4% tandis qu'il était de 55.2% lorsqu'il existait une atteinte ganglionnaire axillaire (EarlyBreast Cancer Trialists Collaborative Groupe « EBCTCG » 2005).

B- **Taille histologique :**

La taille histologiquue de la tumeur est beaucoup plus précise que la taille clinique, elle représente un facteur pronostic puissant de la survie globale et sans rechute. Elle intervient dans le choix du traitement locorégionale ou chimio thérapeutique aussi bien chez des patientes sous chimiothérapie adjuvante que néo adjuvante (Bonadonna. G. et al 1998) (Chen, S. et al 2010).

C- **Grade histologique** :

Actuellement le grade le plus utilisé est celui de Scarff-Bloom et Richardson (SBR). (Bloom, H.J. et Richardson 1957). (Annexe 3)

Le grade SBR est basé sur la somme de trois scores déterminés à partir de 3 caractéristiques histologiques indépendantes : différenciation glandulaires, pléomorphisme et l'activité mitotique :

Le score total permet ainsi de séparer les tumeurs en trois catégories :

-Grade I pour les tumeurs très différenciées.

-Grade II pour les tumeurs moyennement différenciées.

-Grade III pour les tumeurs faiblement différenciées.

Ce grade est utilisé pour tous les carcinomes infiltrant.

Facteurs immuno-histochimie (Bio-marqueurs) :

Les bio-marqueurs sont des molécules présentes dans le milieu intra cellulaire ou à la surface des cellules tumorales, il peut s'agir de protéines ou de gènes.

Aujourd'huigrâce à la techniques immuno-histochimique (IHC) 4 bio-marqueurs de routine ont été défini : RE (récepteur d'œstrogènes), RP (récepteur de la progestérone), HER2 et Ki67 (Ni, Y.B. et al 2014).

Il existe un nombre croissant d'anticorps pour la détection de bio-marqueurs spécifique à chaque type de cancer du sein.

A- **Récepteurs hormonaux** :

L'expression des récepteurs hormonaux (RH) des œstrogènes (RE) et de la progestérone (RP) correspond à un meilleur pronostic notamment fort utile comme facteur prédictif de réponse à un traitement hormonale (Mombelli 2014).

L'œstrogène et la progestérone sont deux hormones qui peuvent favoriser la croissance de certaines cellules, dont celles du cancer du sein. Les récepteurs d'œstrogènes et de progestérone sont nucléaires. C'est sur ces récepteurs que les hormones se fixent aux cellules. Une fois qu'elles s'y sont fixées, les hormones peuvent affecter le comportement ou la croissance des cellules.

Connaître le statut des récepteurs hormonaux permet de décider si l'hormonothérapie est une option de traitement. Une tumeur RH positive réagit à l'hormonothérapie. Une tumeur dont les récepteurs hormonaux sont négatifs (ER- et PR-) ne réagira probablement pas à l'hormonothérapie (Société Canadienne du Cancer 13Dec2015).

B- **Oncogène HER2 :**

Le HER2 (HumanEpidermalGrowth Factor Receptor 2) code pour une glycoprotéine de 180 kilos Daltons. Le récepteur HER2 est présent à la surface des cellules normales où il participe à la croissance et à la différenciation cellulaire. L'amplification et/ou la surexpression de HER2 serait une des causes de transformation cancéreuse des cellules par un mécanisme de potentialisation de la croissance cellulaire. HER2 se comporterait donc comme un amplificateur de signaux de la croissance cellulaire par l'intermédiaire de son activité **tyrosine kinase intrinsèque** (N Ravanel et al)

Dans le cancer du sein ce gène est amplifié chez 20% à 30% des patientes, de par la surexpression de la protéine HER2 qui représente un facteur de mauvais pronostic.

Le cancer du sein HER2+ est de loin le plus agressif que les autres types de cancer du sein (Semba, K. et al 1985) (Slamon, D.J. et al 1987).

C- **Antigène Ki67** :

Le Ki67 est un antigène nucléaire exprimé par les cellules en proliférations. L'index Ki67 permet donc d'évaluer le taux de proliférations des cellules tumorales, c'est donc un paramètre très important dans le pronostique du cancer du sein.

L'évaluation de Ki67 est principalement utilisée afin de guider dans le choix du traitement (Romero, Q. et al 2014).

D- **la Protéine P53** :

Le gène suppresseur de tumeurs peut être retrouvé muté dans près de 80% des cancers du sein triples négatifs (TNBC) (Duffy et al.2018) ce qui rend la p53 mutée un bio-marqueur potentiel pour détecter ce type de cancer du sein. Actuellement les résultats sont mitigés sur le potentiel pronostic de l'expression de la p53 dans le cancer du sein. Certaines études l'ont associé à un pronostic positif et d'autres à un négatif (Li et al.2019).

Classification des cancers du sein :

1- **Classification histologique** :

Permet de classer les tumeurs en fonction de leur nature anatomo-pathologique, qui est à ce jour utilisé par l'OMS. (Annexe 1).

La plus part des lésions mammaires (98%) sont issues du revêtement des canaux galactophores ou des lobules : « carcinomes » qui représentent la presque totalité des tumeurs malignes du sein. Les tumeurs malignes non carcinomateuses (sarcomes, métastases intra-mammaires) sont rares (moins de 1% des cancers du sein) (Rouëssé J 2002)

Selon leur localisation, ils seront qualifiés de canalaires (85% à 90% des cas) ou lobulaires (10% à 15%).

A- **Carcinomes In Situ :**

Il s'agit d'une prolifération tumorale maligne épithéliale qui se développe dans la lumière des canaux ou lobules (limitée à cet épithélium) et n'ayant donc pas encore franchit leur membrane basale ni envahir le tissu conjonctif.

Le **carcinome canalaire in situ (CCIS)** est le plus fréquent : huit à neuf cancers in situ sur dix sont des cancers canalaires in situ. Il représente des lésions hétérogènes caractérisées par des aspects cliniques, mammographique et histologique très varié.

Il est constitué de cellules de type canalaire plus ou moins atypiques, et se classe en 4 sous types (papillaire, cribiforme, massif et comédocarcinome) mais il arrive que les CCIS

infiltrent les tissus voisins et deviennent des cancers infiltrant (Saglier J. 2009) (Tavassoli , F. 2008).

Le **carcinome lobulaire in situ (CLIS)** est plus rare. Il représente 10 à 15% des cancers du sein in situ. Il est considéré comme un facteur de risque de développer un cancer du sein et non comme un précurseur direct de cancer car le plus souvent il est découvert fortuitement histologiquement sur une pièce opératoire d'une patiente opérée pour une autre lésion (Institut National du Cancer 2015)

B- **Carcinome Infiltrant (invasif) :**

Les carcinomes deviennent infiltrants lorsque les cellules cancéreuses franchissent la membrane basale et envahissent le tissu conjonctif de soutien. Elles entrent alors en contact avec des vaisseaux sanguins et lymphatiques ou encore se propager vers les ganglions axillaires et être à l'origine d'une possible diffusion métastatique (MATRAY et al)

Le carcinome canalaire infiltrant est de loin le plus fréquent (80% des cas). Il se présente le plus souvent selon l'aspect classique d'une lésion stellaire, dure, blanchâtre et parfois rétractile (tumeur palpable sur le plan, microscopique).

Le carcinome lobulaire infiltrant est moins fréquent (environ 10%) et se définit par l'absence d'architecture glandulaire et par des cellules rondes et régulières. Macroscopiquement la tumeur est de couleur grise, blanche ou beige clair. L'évolution du CLI se caractérise par des dissémination**s**multiples en particulier au niveau des séreuses (plèvre, péritoine) et des ovaires, entrainant une surveillance particulière de ces sites (Saglier J. 2009) (Monbelli S. 2014).

2- **Classification moléculaire** :

Les premières études d'expression génique des cancers du sein issue d'études sur puces ADN notamment par Pérou et al (Pérou, C.M. et al 2000) et Sorlie et al (Sorlie, T. et al 2001) ont montré l'hétérogénéité de la maladie au niveau moléculaire. Selon la nouvelle taxonomie cinq sous-types majeurs du cancer du sein ont été défini comme suit :

A- **Sous-type Luminal A :**

Récepteurs aux œstrogènes RE et à la progestérone RP sont positifs, le HER2 (HumanEpidermalGrowth Factor Receptor 2) est négatif et un indice Ki67 faible (<20%).

C'est le sous-type le plus commun représentant approximativement 50% à 60% des cancers du sein (Goldhirsh, a et al 2013). La prolifération est lente et leur évolution favorable, elles sont caractérisées par une forte positivité aux récepteurs aux hormones RH avec un fort potentiel de sensibilité à l'hormonothérapie et une faible chimio-sensibilité.

B- **Sous-type Luminal B :**

Les RE positifs, les RP faibles ou négatifs, HER2 négatif et un indice Ki67 élevé (>20%), représentant 10% des tumeurs du sein, le génome tumoral est plus instable, on peut retrouver quelques amplifications (dont HER2) et délétions et mutations (comme P53) ils sont caractérisés par une forte prolifération et un pronostic significativement moins bon que les Luminaux A.

C- **Sous-type des tumeurs HER2 positifs (HER2+) :**

Représentent environ 15% des cancers du sein, également divisés en deux sous catégories : tumeurs pures HER2+ avec RH négatifs (non luminales) : HER2 surexprimé et RH absents, et tumeurs luminales HER2+ avec RH positifs.

Ces tumeurs agressives présentent une forte prolifération et un mauvais pronostic et sont caractérisées par une forte sensibilité aux thérapies anti-HER2 et aux chimiothérapies.

D- **Sous-type triple négatif TN :**

Les récepteurs hormonaux RH sont absents et HER2 négatif, il apparait dans 15% à 20% des cas et est particulièrement agressif avec de fort taux de rechutes et un mauvais pronostic.

Les cancers du sein triples négatifs CSTN sont majoritairement constituées de carcinomes canalairesinfiltrantsClassiques de haut grade(III) et sont associés à un risque de récidive invasive et décès plus important que les autres sous-types (dans les 5 premières années de suivi) (Dent R.et al 2007). Leur mauvais pronostic est notamment lié à l'impossibilité d'utiliser les hormonothérapies, les anti-HER2 et également à l'absence de thérapie spécifique (ciblée) il reste le seul type de cancer du sein dont le traitement médical repose exclusivement sur la chimiothérapie cytotoxique conventionnelle Les CSTN représentent 17% des cancers du sein ils surviennent le plus souvent chez la femme jeune non ménopausée (Abbas F et al 2012).
Il est intéressant de noter que 9 ans plus tôt, C.M. Perou et T. Sorlie publiaient leur travail soulignant l'hétérogénéité moléculaire des cancers du sein et introduisant pour la première fois le groupe des tumeurs basal-like (BL).

Depuis, plusieurs travaux ont été mené et durant des années il a été décrit que les CSTN se regroupent principalement en deux groupes : les **« basal-like »** ainsi que le groupe« **Apocrine» :**

> **Basal-like BL :** Le plus fréquent, représentant près de 80% des cas et qui présente des similarités aves les cancers développé suite aux mutations du gène BRCA1 (Haffty BG. Et al 2006). Il présente quasiment toujours des altérations de P53 (95% à 100%), une activation de la voie AKT avec fréquentes mutations de PTEN (Marty B. et al. 2008) et une grande instabilité génétique, une forte prolifération et l'expression variable de EGFR(EpidermalGrowth Factor Receptor)

Les tumeurs BL sont habituellement RE-négatives, RP-négatives et HER2-négatives et expriment un ou plusieurs des marqueurs spécifiques basaux (CK5/6, CK14, CK17 et EGFR) CKIT, FABP7, cavéolines 1 et 2. Le gène de la P-cadhérine est également fortement exprimé

ainsi que les gènes de prolifération comme STK6, BUB1 et TOPOIsomérase 2alpha. (Rakha EA.et al 2007). Les tumeurs ainsi identifiées comme BL par l'immuno-histochimie constituent un groupe très hétérogène et il faut distinguer 2 sous-groupes :

– les BL de phénotype BL pur exprimant les cytokératines basales,

– les BL de phénotype myoépithélial exprimant la P63, l'actine muscle lisse ou la PS100.

En pratique les tumeurs BL sont souvent assimilées aux CSTN et sélectionnées à partir de ce groupe, or ces 2 groupes ne sont pas synonymes (Rakha EA.et al 2007). En effet, il semble plus exact de dire que la majorité, et non la totalité, des tumeurs TN ont un phénotype BL et que la majorité, et non la totalité, des tumeurs BL ont un phénotype TN.

Les derniers chiffres de la littérature internationale montrent que 80 % des tumeurs TN ont un phénotype BL (Weigelt B. et al 2010), qu'environ 80 % des tumeurs BL sont des tumeurs TN (Foulkes WD.et al 2010).

2- **le Phénotype apocrine** :

Si un CSTN n'exprime ni les cytokératines de haut poids moléculaire, ni EGFR, ni c-KIT, on retient un phénotype apocrine se définissant par une positivité aux récepteurs aux androgènes (RA) à l'immunohistochimie (Bertucci F. et al 2008). Cette observation ouvre des perspectives de nouvelles possibilités thérapeutiques hormonales anti androgène (Farmer P.2005).

- **Les Claudin-low :**

Très récemment, un nouveau sous-groupe moléculaire bas en claudine a été mis en évidence, appelé claudin-low. Les tumeurs de type claudin-low expriment pas/ faiblement les protéines des jonctions intercellulaires (les claudines 3, 4 et 7) et se caractérisent par une expression basse ou absente des marqueurs de différenciation luminale. Par ailleurs, elles expriment fortement les marqueurs de transition épithélio-mésenchymateuse, gènes de la réponse immunitaire et les marqueurs des cellules souches cancéreuses (ALDH1…). Il s'agit du sous-type moléculaire le moins fréquent (12-14 %) avec des tumeurs typiquement de haut grade (Prat A.et al 2011). Souvent richement infiltrées par des lymphocytes. La plupart des tumeurs claudin-low sont des carcinomes canalairesinfiltrants auxquels s'ajoutent de fréquents carcinomes médullaires et métaplasiques.le type claudin-low, proche du phénotype des cellules souches, correspondant à la première étape de différenciation d'une cellule tumorale, et d'autre part le type BL, plus tardif dans la carcinogénèse, secondaire à l'altération du gène BRCA1

Aujourd'hui le sous type des Claudin-Low n'est plus plus considéré comme faisant parti des sous types moléculaire des CSTN.

- Mutation de BRCA1 et tumeurs BL/TN :

Il existe un recouvrement entre tumeurs TN et mutations germinales de BRCA1. Ainsi parmi les tumeurs survenant chez des patientes porteuses de mutations germinales de BRCA1, 80 % sont des CSTN et 80 à 90 % sont des tumeurs BL. Parmi les CSTN, 10 % sont diagnostiqués chez des patientes présentant des mutations germinales de BRCA1 (Mavaddat N.et al 2012).

Un lien très fort est donc décrit entre la voie BRCA1 et les cancers du sein TN ou BL.

- Tumeurs BL/TN sporadiques :

Les cancers du sein BL sporadiques et ceux survenant chez des patientes porteuses de mutation BRCA1 ont des profils génétiques moléculaires proches mais ils diffèrent par l'absence de mutations
BRCA1 dans le groupe des tumeurs BL sporadiques. Cependant, il existe dans ces tumeurs un important dysfonctionnement de BRCA1 par d'autres mécanismes qu'une mutation germinale : Un dysfonctionnement de la voie BRCA1 est présent dans la majorité des cancers du sein BL
Sporadiques.
Un niveau d'expression significativement plus faible de la protéine BRCA1 est retrouvé dans les tumeurs de phénotype BL, mais aussi dans les tumeurs de haut grade (SBR3) ou n'exprimant pas les récepteurs hormonaux (Abd El-Rehim DM.et al 2005) (60).
Les tumeurs BL sporadiques ont une inactivation somatique (c'està-dire intratumorale, acquise) de BRCA1.
Des hypothèses de sous-régulation médiée par des mécanismes épigénétiques ont été envisagées (Reis-Filho JS.et al 2008). A type de méthylation de gènes promoteurs et/ou de transcription silencieuse de BRCA1. Les mutations de BRCA1 entraînent la perte de la fonction de réparation, et une grande instabilité génomique (perte d'hétérozygotie, mutation de gènes tels que P53…) au sein de la tumeur (Venkitaraman AR.et al 2002).

En pratique clinique, le phénotype BL ou TN d'un cancer du sein doit faire évoquer la possibilité d'une mutation du gène BRCA1.

Nouvelle classification :

Depuis 2005, la recherche en routine des marqueurs théranostiques RE, RP et HER2, plus ou moins accompagnés de Ki-67, et le développement intensif de technologies d'analyse à haut débit de gènes et de protéines ont augmenté de manière significative la connaissance du profil génotypique et phénotypique des CSTN.

Un travail récent a montré que des mutations hautement clonales de TP53 étaient présentes dans environ 80% des CSTN alors que des mutations sous-clonales dans les voies PI3K, RAS-RAF-MAPK et dans les régulateurs du cycle cellulaire, n'étaient retrouvées que dans 29,8%, 8,7% et 14,4% des cas, respectivement (Kriegsmann M et al 2014). Une petite partie des CSTN présente des réarrangements complexes et des mutations dans les domaines PEST de Notch 1, Notch 2 et Notch 3 (Wang K, Zhang Q et al 2015).

Ces études ont identifié un nombre relativement limité de mutations récurrentes dans les CSTN, mais, récemment, à l'aide d'une analyse génomique à l'échelle d'une cellule, il a été

montré que les CSTN ont un taux élevé de mutations, caractérisé par des mutations ponctuelles variées, acquises durant l'évolution de la maladie (Wang Y, Waters J et al 2014).

Cela conduit à une forte diversité clonale des CSTN, où les sous-clones diversement mutés sont probablement le siège des métastases à distance (Ding L, et al 2010). Beaucoup de ces mutations ont été découvertes dans des CSTN résiduels, après chimiothérapie néoadjuvante, et sont fréquemment présentes dans moins de 5% des cohortes de CSTN évaluées (Balko JM, et al 2014). Néanmoins, une portion significative de ces altérations est aujourd'hui "actionnable", ce qui montre qu'une classification reposant sur les mutations des CSTN permet une approche thérapeutique plus personnalisée, au moins dans les études cliniques.

Les études transcriptomiques à haut débit ont récemment permis de mettre en évidence plusieurs sousgroupes de CSTN, avec des profils géniques, une biologie et une sensibilité aux traitements différents. L'équipe de l'université Vanderbilt (États-Unis), dirigée par J. Pietenpol et B. Lehmann, a analysé les profils transcriptomiques de 386 CSTN, strictement sélectionnés par l'absence des expressions géniques d'ER, PR et HER2, ainsi que par celle de l'amplification d'ERBB2/HER2. Ils ont décrit l'existence de 6 sous-types moléculaires de CSTN : basal-like 1 et 2 (BL1, BL2), mesenchymal-like (M), mesenchymal stem-like (MSL), immunomodulatory (IM) et luminalandrogenreceptor (LAR). (Lehmann BD,et al 2011) (Figure 4).

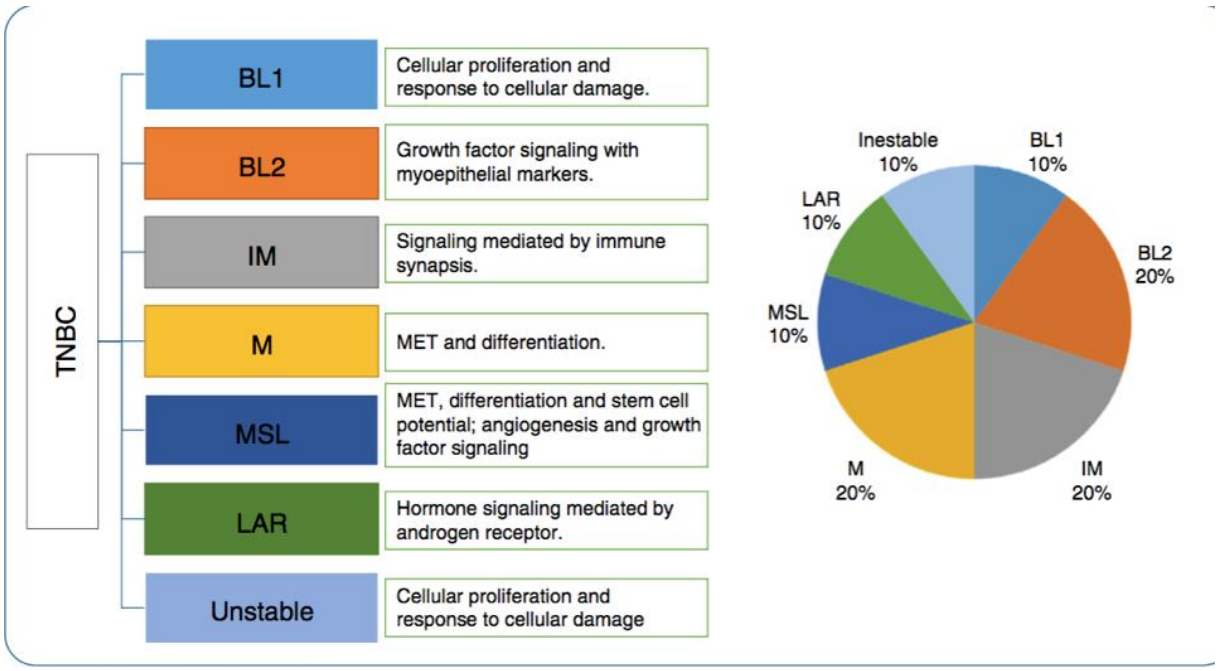


Figure 4 : classification moléculaire des CSTN (G.I. Uscanga-Perales et al.)

-Le sous-type BL1 est caractérisé par les signatures génomiques de type “réponse aux dommages de l’ADN” (DNA damage response : DDR) et “cycle cellulaire”, tandis que BL2 partage avec BL1 une partie des gènes du cycle cellulaire, mais n’est pas enrichi en gènes de DDR.

-BL2 contient des gènes surexprimés de la voie de signalisation de la famille des récepteurs des facteurs de croissance et de la différenciation myoépithéliale.

-Les sous-types M et MSL sont tous les 2 enrichis pour les gènes régulant la motilité cellulaire, l’invasion et la différenciation mésenchymateuses ainsi que des similarités impliquant des voies de signalisation TGF-B, mTOR, Rac1, B-caténine ou encore le VEGF mais le sous-type MSL est le plus enrichi pour les gènes régulateurs de la TEM « transition épithélio-mésenchymateuse » (passage d’un groupe de cellules épithéliale à une forme mésenchymateuse) et des cellules souches cancéreuses. En outre, le sous-type MSL partage avec le sous-type IM de nombreux gènes impliqués dans la régulation de la réponse immune. Cependant, le sous-type IM est enrichi en gènes responsables des interactions entre l’hôte et le cancer, c’est-à-dire les antigènes immuns et les gènes impliqués dans les voies de transduction du signal immunitaire.

-Le sous-type LAR est caractérisé par la surexpression de gènes codant pour la différenciation luminale et pour les régulateurs de la voie de signalisation du RA.

D’autres études génomiques très récentes ont ouvert la possibilité à d’autres classifications moléculaires des CSTN. Après profilage de l’ADN et de l’ARN de 198 CSTN, M.D. Burstein et al. ont distingué 4 soustypes moléculaires, identifiés par des amplifications spécifiques: basal-like immune-activated (BLIA), basal-like immune-suppressed (BLIS), mesenchymal (MES) etLuminalAndrogenReceptor LAR (BursteinMD,et al 2015).

Lorsque l’on compare les classifications de B.D. Lehmann et al. et de M.D. Burstein et al.Un chevauchement est observé entre les sous-types MSL et MES, IM et BL1 avec BLIA, M avec BLIS et les deux LAR. (Tabeau II).

Tableau II : comparaison des classifications moléculaires des CSTN de B.D Lehman et M.D Burstein (Clinical Cancer Res .2015; 21: 1688–98)

Sous-type de cancer du sein TN selon Lehmann	**Sous-type de cancer du sein TN selon Burstein**
Basal-Like 1 (BL1) Basal-Like 2 (BL2)	Basal-Like Immuno-Supresseur (BLIS)
Immuno-modulatory (IM)	Basal-Like Immuno-Activateur (BLIA)
Mesenchymal (M) Mesenchymal Stem Like (MSL)	Mesenchymal (MES)
Luminal Androgen Receptor (LAR)	Luminal Androgen Receptor (LAR)

P. Jézéquel et al. Ont analysé le profil moléculaire de 107 CSTN et distingué 3 sous-types: BL avec forte réponse immune, BL avec faible réponse immune et LAR (Jézéquel P, Loussouarn et al 2015). Avec les classifications de B.D. Lehmann et al. Et de M.D. Burstein et al.Cette nouvelle classification moléculaire des CSTN confirme qu'environ 30% d'entre eux sont caractérisés par l'activation de la réponse immune de l'hôte contre la tumeur. Cela a placé une catégorie des CSTN dans celle des cancers immunogéniques, à l'instar des mélanomes et cancers ovariens, et a suscité de nombreux travaux afin de voir si les agents ciblant les checkpoints immunitaires ou les néoantigènes tumoraux pourraient être effectifs pour la catégorie de CSTN enrichis en gènes de la réponse immune.

Ces analyses transcriptomiques ont montré que les CSTN étaient des cancers bien plus complexes qu'initialement supposé après les profils mutationnels. Mais plus importantes encore ont été les découvertes que certaines catégories de CSTN pouvaient soit avoir une valeur pronostique propre (pronostic), soit être associées à des thérapeutiques spécifiques (prédiction).

- **Facteurs pronostiques histologiques :**

Les CSTN forment un groupe hétérogène. L'étude histologique permet d'isoler des tumeurs triplesnégatives.
Il est indispensable d'individualiser ces sous-types à meilleur pronostic auxquels des chimiothérapies agressives pourraient être épargnées.

Ainsi les carcinomes apocrine (définies en IHC par l'expression des récepteurs aux androgènes) et les carcinomes lobulaires pléomoprhes sont affiliés au CSTN de type Apocrine.

Les cancers médullaires, quant à eux, ou encore les Adénoide kystique et les Métaplasiquessont souvent de type BL et partagent leur taux élevé de mutation de p53 et certaines altérations génomiques ainsi que leur pronostic péjoratif (Bertucci F.et al 2008) (Bauer KR.et al 2007).

Stratégies thérapeutique du cancer du sein :

Le but du traitement du cancer du sein est non seulement d'éliminer la tumeur primaire, mais aussi les métastases. Pour cela plusieurs stratégies sont utilisées et sont souvent associées. Elles reposent sur la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie ainsi que des thérapies plus ciblées.

- **la Chirurgie** est le plus souvent réalisée en premier et peut être suivie d'une chimiothérapie et/ou d'une radiothérapie et/ou d'une hormonothérapie. Elle a pour objectif d'enlever les tissus atteints par les cellules cancéreuses. Deux types d'interventions chirurgicales peuvent être pratiqués : une chirurgie mammaire **conservatrice**, appelée tumorectomie ou une chirurgie mammaire non **conservatrice**, appelée mastectomie.

- **La Chimiothérapie** est un traitement à base de médicaments (on parle aussi de traitement médical). Les médicaments de chimiothérapie agissent sur les mécanismes de la division cellulaire. C'est un traitement général (appelé traitement systémique), qui agit dans l'ensemble du corps. Cela permet d'atteindre les cellules cancéreuses quelle que soit leur localisation dans le corps, même si elles sont isolées et ne sont pas détectables par les examens de diagnostic.

Les médicaments de chimiothérapie sont administrés le plus souvent par perfusion, ou parfois par voie orale sous forme de comprimés..

La Chirurgie conservatrice (ou tumorectomie ou segmentectomie) consiste à retirer la tumeur et une petite quantité des tissus qui l'entourent de façon à conserver la plus grande partie de votre sein. Elle est privilégiée aussi souvent que possible, en concertation avec vous. Elle est toujours complétée d'une radiothérapie.

La Chirurgie non conservatrice (ou mastectomie) consiste à retirer la totalité du sein y compris l'aréole et le mamelon.

- **La Radiothérapie** utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules cancéreuses en les empêchant de se multiplier. Elle consiste à diriger précisément ces rayonnements (appelés aussi rayons ou radiations) sur la zone à traiter, tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants, dits organes à risque.

- **L'hormonothérapie :** Certaines tumeurs du sein ont pour caractéristique d'être hormonosensibles, ce qui signifie que les hormones féminines (œstrogènes, progestérone) stimulent leur croissance. L'hormonothérapie est un traitement qui consiste à empêcher l'action stimulante des hormones féminines sur les cellules cancéreuses.

Thérapie ciblée :

La chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie et l'hormonothérapie apportent des résultats positifs dans le traitement des cancers. Cependant ces stratégies thérapeutiques ne sont pas efficaces à 100% et impliquent de nombreux effets secondaires car ils n'agissent pas uniquement sur la tumeur. Dans cette optique, de nouvelles thérapies ciblées sont mises au point.

Une thérapie ciblée peut être indiquée en thérapie principale ou en thérapie adjuvante, L'existence de marqueurs spécifiques permet le développement de thérapies ciblées.

Les traitements ciblés regroupent plusieurs familles de médicaments anticancéreux qui sont des molécules thérapeutiques liant spécifiquement une protéine impliquée dans le développement tumoral. Cette molécule cible n'est pas forcément le point de départ de la cancérogénèse mais elle peut être impliquée plus en aval dans la prolifération tumorale (Charles Sawyers.2004).

Elles agissent sur les processus de régulation, multiplication, différenciation, appoptose et angiogenèse. On compte :

◆ Les anticorps monoclonaux (inhibiteur extracellulaire): Les anticorps monoclonaux proviennent d'un clone de cellule unique ET sont dirigés vers un seul épitope sur l'antigène.

Ils reconnaissent spécifiquement des antigènes exprimés par les cellules cancéreuses, et sont donc employés pour cibler et détruire ces cellules tumorales. Actuellement, plusieurs anticorps monoclonaux sont utilisés en thérapeutique contre le cancer et ont des cibles différentes. Parmi ceux utilisés on retrouve le Trastuzumab connu aussi sous son nom commercial Herceptin® il a été spécialement conçu pour bloquer la protéine HER2. (Institut National du cancer)

◆ Les inhibiteurs des protéines kinase (inhibiteurs intracellulaires) : Ces inhibiteurs comprennent d'une part les agents qui vont cibler des récepteurs transmembranaires à activité tyrosine kinase, et d'autre part les agents qui vont cibler des protéines tyrosines kinases cytoplasmiques. On peut citer l'exemple du Lapatinib(Tyverb®) ou encore le Léverolimus (Afinitor®) (Robert J. 2011).

◆ Les inhibiteurs de l'angiogenèse : l'angiogenèse est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins à partir de vaisseaux préexistant. Les cellules tumorales ont besoin d'un apport important en nutriments et en oxygène pour leur développement. Pour cela, elles ont la capacité d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins grâce à la production de VEGF. L'utilisation d'anticorps monoclonaux comme le Bévacizumab (Avastin®) contribue à l'inhibition de ce processus (il se lie au facteur de croissance endothélial vasculaire VEGF) (Oudard S.et al 2010).

La Thérapie néo-adjuvante dans le cancer du sein :

La chimiothérapie néo-adjuvante se défini comme étant un traitement donné avant une chirurgie curative du sein, elle est administrée dans le but de faire diminuer la taille tumorale ou d'obtenir rapidement le contrôle de tumeurs agressives (comme les tumeurs HER2+ et triples négatives) Les thérapies néo-adjuvantes sont apparues dans les années 80 (elles furent introduites dans le traitement des ostéosarcomes), lorsque les chimiothérapies palliatives ayant fait la preuve de leur efficacité, on a voulu améliorer le pronostic loco-régional et général des femmes ayant un cancer du sein inflammatoire ou localement avancé (L. Mauriac. Et al 2008).

Les traitements du cancer du sein varient en fonction notamment de la taille et de la position de la tumeur dans le sein. Les cancers du sein opérables sont définis par des tumeurs de taille égale ou supérieure à 2 cm et/ou en position centrale dans le sein et traités par CTNA (chimiothérapie néo-adjuvante). La CTNA est le traitement de référence des cancers du sein localement avancé ou inflammatoire, en revanche, les tumeurs de petite taille (inférieure à 2cm) sont généralement traitées par chirurgie première suivie d'une radiothérapie, puis si nécessaire, les patientes peuvent recevoir une chimiothérapie et/ou une hormonothérapie dites alors adjuvantes.

La chimiothérapie néo-adjuvante (CTNA) correspond à l'utilisation d'un traitement cytotoxique systémique avant le traitement locorégional : chirurgie et/ou radiothérapie (Mombelli.S.2014).

Classification histopathologique de la réponse à la chimiothérapie :

Plusieurs équipes de pathologistes ont proposé des classifications histopathologiques de la réponse à la chimiothérapie néoadjuvante. Il faut cependant souligner qu'il n'existe pas, à l'heure actuelle, de consensus permettant de privilégier une classification plutôt qu'une autre. Cela complique notablement les comparaisons des taux de réponses complètes histopathologiques (RCH) obtenues dans différentes études.

Il existe six différentes classifications citées dans la littérature : la classification de Feldman (1986), La classification de Chevallier(1993), La classification de Viens(1998), La classification de Honkoop (1998), La classification d'Aberdeen(1999) et enfin la classification de Sataloff (1995).

- **La Classification de Sataloff** : c'est la plus couramment utilisée elle évalue la réponse sur le tissu mammaire et sur les ganglions lymphatiques. Cette classification est plus proche de la réalité, car elle tient compte de la viabilité cellulaire. En effet, elle isole un groupe de très bons répondeurs en prenant en compte les reliquats tumoraux très nécrosés, non mesurables macroscopiquement, dont la signification clinique est très proche des répondeurs complets. De plus, elle stratifie les répondeurs partiels en "bons répondeurs" (effet thérapeutique supérieur à 50%) et "mauvais répondeurs". Les auteurs ont pu mettre en évidence une survie prolongée pour les patientes qui présentaient une RCH (Sataloff DM.et al 1995).

- Classification du MD Anderson « RCB »:

La charge cancéreuse résiduelle ou « Residual cancer burden » (RCB) est estimée à partir des coupes pathologiques de routine du site primaire de la tumeur du sein et des ganglions lymphatiques régionaux après la fin du traitement néo-adjuvant.

Le calcul de la RCB implique la prise en compte de paramètres définis donnés par le centre de cancer MD Anderson de l'université de Texas (consulter le lien sélectionné)

- Taille microscopique du carcinome infiltrant résiduel sur 2 dimensions

- Cellularité tumorale globale au site tumoral initial

- Pourcentage de carcinome canalaire in situ associé

- Nombre de ganglions axillaires positifs

- Taille microscopique de la plus grande métastase ganglionnaire

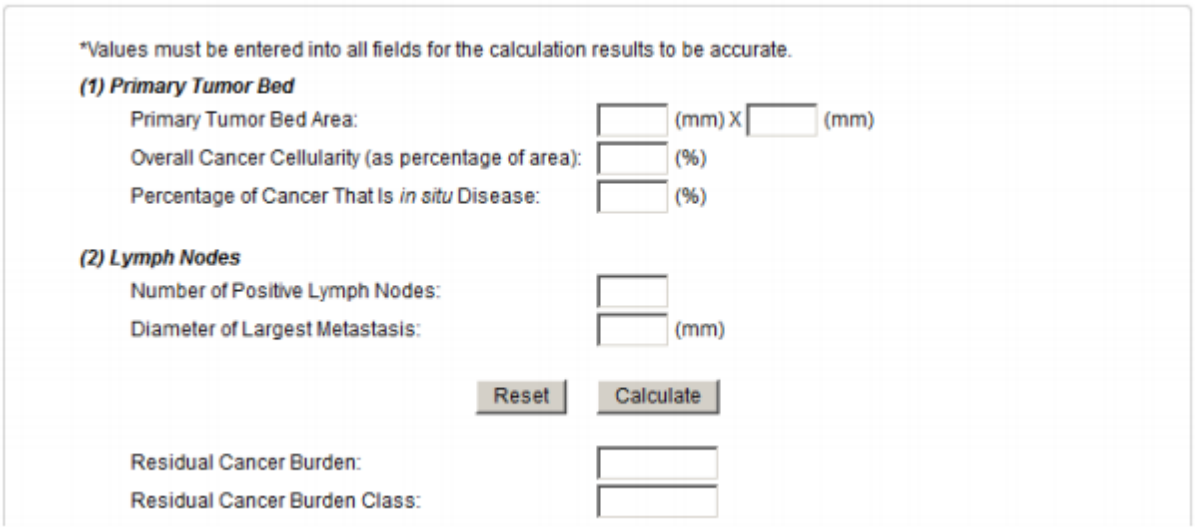


Figure 5 : calculateur virtuel de la charge cancéreuse résiduelle(http://www3.mdanderson.org/app/medcalc/index.cfm?pagename=jsconvert3)

La Réponse pathologique complète :

La plupart des études suivent la recommandation de vonMinckwintz définissant La réponse pathologique complète « pCR » comme aucun résidu invasif et in situ dans le sein et les ganglions et peut mieux distinguer les patientes avec des résultats favorables et défavorables. Elle est considérée aujourd'hui comme le but ultime de la chimiothérapie néo-adjuvante efficace CTNA et est désormais utilisée comme objectif principal dans presque tous les essais cliniques néoadjuvants. Les patients présentant des résidus non invasifs (présence de reliquats tumoraux suite à la CTNA)ne doivent pas être considérés comme ayant atteints la pCR.

La pCR est un critère de substitution approprié pour les patients atteints d'un cancer luminale B/HER2 négatif, HER2 positif (non luminale) et les triples négatifs mais pas pour ceux atteints de tumeurs luminales B/HER2 positives ou luminale A (vonMinckwitz G.et al 2012).

La Protéine p53 :

Le Tp53 pour «*TumorProtein 53* » également appelé « le gardien du génome », « tumorsuppressor p53 » ou encore « Antigen NY-CO-13 » est un facteur de transcription régulant de multiples fonctions cellulaires : régulation du cycle cellulaire, l'autophagie ou encore l'apoptose (mort cellulaire programmée) il intervient dans la réponse aux dommages à l'ADN. Le gène p53 est à 50% muté dans la majorité des cancers (*Surget* .et al 2013).Ce gène code pour des protéines qui se lient à l'ADN pour réguler l'expression génique afin de prévenir d'éventuelles mutations (*LevineAj.* Et al 2010).

Gène :

A la fin des années 70, la protéine était co-précipitée avec l'antigène T du virus simien 40 dans des cellules transformées par ce virus (Lane& Crawford, 1979, Linzer&levine, 1979). Cette protéine a été baptisée p53 en raison de son poids moléculaire de 53 kDa déterminé sur gel SDS-polyacrylamide. Le gène p53 n'a été découvert que quelques années plus tard dans des cellules transformées de souris (Oren&levine, 1983).

Il fut tout d'abord assimilé à un oncogène (Jenkins &Sturzbecher, 1984a) avant d'être classé, en 1989, parmi les gènes suppresseur de tumeur (Hinds et al., 1989, Finlay et al., 1989).

Ce gène a été décrit chez plus de onze espèces de Vertébrés et ses fonctions biologiques ont été partiellement élucidées. Il est muté dans tous les types de cancers connus à ce jour et pratiquement un individu sur deux atteint de cancer présente une altération du gène p53 (Soussi, 1993a) (*Matlashewski G.*et al 1984).

L'homme ne disposent que d'une seule copie fonctionnelle du gène par génome haploïde située sur le bras court du chromosome 17 (17p13.1) ((Benchimol et al., 1985). Le gène s'étend sur 20Kb Il est composé de 20303 nucléotides, divisés en 11 exons (le premier n'étant pas codant) et 10 introns Ce gène est transcrit en un ARNm de 2,2 kb puis traduit en une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés de 53 kDa, contenant cinq domaines hautement conservés chez les vertébrés précisément sur les exons 2,5, 6,7 et 8. Leur forte conservation à travers l'évolution est probablement liée à leur importance fonctionnelle dans la protéine (Soussi et al., 1990). Des sites d'épissages alternatifs et un deuxième promoteur ont été décrits dans le gène TP53 à l'origine de l'existence d'au moins 12 isoformes de p53 dans les cellules humaines, dont les plus connus sont les Δ40p53, Δ133p53 et Δ160p53, qui pourraient agir comme des régulateurs négatifs de l'activité de p53 (Khoury et al., 2010; Marcel et al., 2011).

Chez l'homme il existe un polymorphisme récurrent impliquant la substitution d'une arginine par une proline dans le codon 72 .Depuis, plusieurs études ont été menées afin de déterminer un lien génétique entre cette mutation et l'apparition de cancers, mais les résultats ont été controversés.

Une étude sur les femmes arabes a montré que la proline homozygote(pro/pro) dans le codon 72 est associée à un risque décroissant de cancer du sein (*Alawadi S.*et al 2011).

L'expression du gène p53 est contrôlée par deux promoteurs différents :

- P1 : situé entre 100 et 250 paires de bases en amont du premier exon

- P2 : situé à l'extrémité 5' de l'intron 1 (Reisman et al. 1988).

Ces promoteurs contiennent d'une part un site de fixation pour le Facteur Nucléaire 1 (NF1) et d'autre part un second site de fixation pour un facteur d'induction du sérum (Ginsberg et al., 1990). En outre ils possèdent une séquence consensus de reconnaissance pour des activateurs transcriptionnels de la famille myc/myo D (Ronen et al., 1991). La présence de ces deux promoteurs et des introns dans leur position correcte sont absolument nécessaires à l'expression normale du gène p53 (Montenarh, 1992).

Structure :

La structure de la protéine peut être subdivisée en 7 domaines (Figure 6) :

1- Région N-terminale (acide) : « transcription activateddomain » (TAD) également connue comme le domaine d'activation 1 (AD1) qui active les facteurs de transcriptions. Elle contient également deux domaines d'activation transcriptionnel impliqués spécifiquement dans la régulation de plusieurs gènes pro-apoptotiques (*Venot C.*et al 1998). Il est le site de fixation des régulateurs principaux de p53 que sont MDM2 et MDM4 (mouse double minute 2 et 4), et de ses co-activateurs transcriptionnels comme p300/CBP (CREB-bindingprotein). Il contient également une séquence qui cible l'export nucléaire de p53 (acides aminés 11 à 27).

2- Domaine d'activation 2 (AD2) : nécessaire pour l'activité apoptotique

3- Domaine riche en proline : impliqué dans l'activité apoptotique de la p53 par l'exportation nucléaire via MAPK. Il est composé de cinq motifs PXXP (P pour Proline et X pour un autre acide aminé) sur lesquels peuvent venir se fixer des protéines avec des domaines SH3 et qui semble jouer un rôle dans la stabilisation de p53.

4- Domaine central de liaison à l'ADN : contient un atome de zinc et plusieurs amino acides d'arginine (résidues 102-292) cette région est responsable de la liaison du co-récepteur de la p53 LMO3 (*Larsen S.*et al 2010). Dans les tumeurs, la plupart des mutations sont retrouvées dans la séquence codant pour ce domaine central de liaison à l'ADN, induisant un défaut (absence et/ou erreur) de liaison à l'ADN de p53.

5- Domaine NLS « Nuclear Localization Signaling »

6- Domaine d'homo-oligomerisation (OD): impliqué dans la tétramérisation qui est nécessaire pour l'activation de la p53 in vivo. Ce domaine contient également des séquences qui ciblent l'import (acides aminés 305 à 323) et l'export (acides aminés 340 à 351) nucléaire de p53.

7- Domaine C-terminal : impliqué dans l'hypo-régulation du domaine central de liaison à l'ADN (*Harms KL.*2005). Contient un domaine de liaison non spécifique à l'ADN en cas de stress génotoxique. Cette région contrôle la fixation spécifique du domaine central à l'ADN et contient deux séquences qui ciblent l'import nucléaire de p53.

Les mutations désactivant la p53 dans le cancer se localisent principalement dans le domaine DBD, la plus part d'entre elles détruisent la capacité de la protéine à se lier avec ses séquences d'ADN cibles (mutations récessives avec perte de fonction)

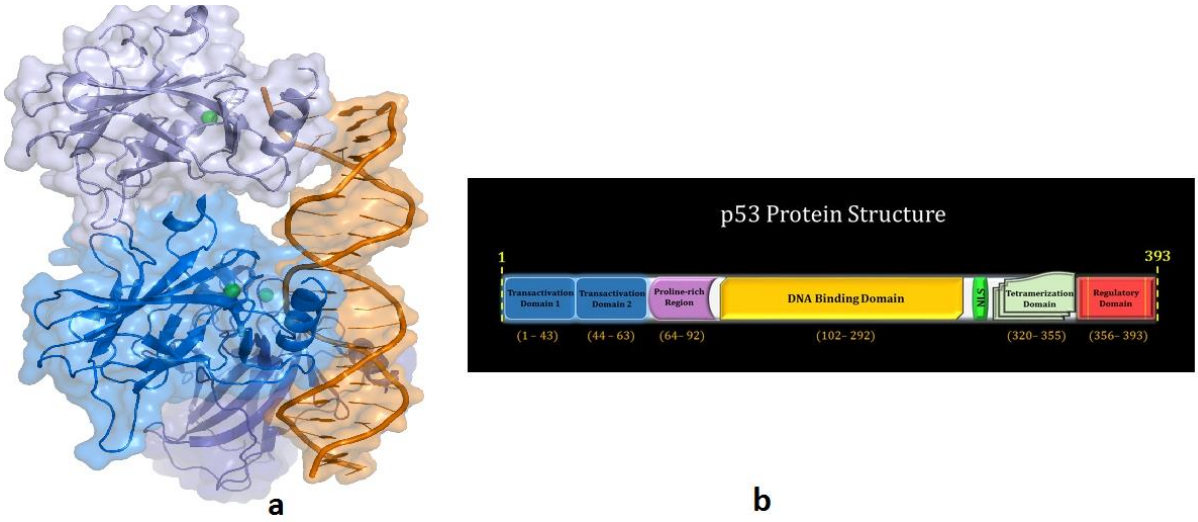


Figure 6 : structure biochimique de la p53 (a), schéma des domaines protéiques de la p53 (b).

Voies de signalisation de p53 :

Lors de la synthèse, la protéine p53 a un temps de demi-vie relativement court (de 6 à 20minutes).

Un grand nombre de signaux de stress cellulaire sont impliqués dans l'activation de la p53 (mesuré par l'augmentation de demi-vie et l'activité transcriptionnelle) impliqués mais non limité qu'aux dommages d'ADN (induits par radiation UV, Y-irradiations, agents chimiques comme le peroxyde d'hydrogène…), stress oxydatif, choc osmotique, déplétion de ribonucléotide ainsi que l'expression dérégulée d'oncogènes (Figure 8).

L'expression de la p53 induite par les rayons UV, causant des cassures ADN qui en ce cas p53 peut initier des processus menant à la tannation de la peau (bronzage) ("Genome'sguardiangets a tan started". New Scientist. March 17, 2007) (Cui R. et al 2007).

Cette activation est marquée par deux évènements majeurs. En premier lieu le temps de demi-vie de la protéine p53 est considérablement augmenté, conduisant ainsi à une rapide accumulation de la protéine dans les cellules stressées. En second lieu, un changement de conformation va forcer l'activation de la p53 comme un régulateur transcriptionnel dans ces cellules.

L'élément critique conduisant à l'activation de la p53 est la phosphorylation de son domaine N-terminal. Ce domaine d'activation contient un grand nombre de sites de phosphorylation et peut être considéré comme la cible principale des protéines kinases transduisant les signaux de stress.

Les protéines kinases connues pour cibler le domaine d'activation transcriptionnel (N-terminal) de p53 peuvent être divisées en deux groupes :

Le premier groupe de protéines kinases appartient à la famille MAPK « mitogen-activatedprotein kinase » (JNK1-3, ERK1-2, p38 MAPK) qui sont connus pour répondre à de différents types de stress comme les dommages membraneux,stress oxydatif etc. un second groupe de protéines kinases (ATR, ATM, CHK1 et CHK2, DNA-PK, CAK, TP53RK) dit « checkpoints » sont essentiel pour maintenir l'intégrité du génome : cascade moléculaire qui détecte et réagit à plusieurs formes de dommages à l'ADN.

Les oncogènes stimulent également l'activation de p53, médié par la protéine p14ARF.

Dans les cellules non stressées, les nivaux de p53 sont maintenus bas grâce à une dégradation constitutive de celle-ci. Une protéine appelée MDM2 « murine double minute2 » (HDM2 chez l'homme), retrouvé dans les chromosomes double minute, homologue d'une protéine oncogénique murine, fréquemment amplifié dans les sarcomes, se lie à p53 inhibant son action et la transporte du noyau vers le cytosol.

MDM2 est un gène inductible de p53 dont la protéine produite a une fonction enzymatique et agit comme une ubiquitine ligase qui va ajouter et attacher de manière covalente les molécules d'ubiquitine à p53 conduisant à la dégradation de celle-ci par le protéasome.

Cependant l'ubiquitylation de p53 reste réversible. Ceci produit un cycle d'autorégulation ou la p53 conduit à la synthèse de MDM2 qui en retour la dégradera. Ceci est alors dit un « feedback loop » afin de contrôler les taux de p53. (Figure 7)

Les niveaux de p53 peuvent présenter des oscillations en réponse à certains stresses, ces variations peuvent être importantes pour déterminer si les cellules survivent ou meurent au stress (Purvis, Jeremy E.et al 2012).

Le MI-63 se lie au MDM2 réactivant ainsi p53 lorsque celle-ci se trouve inhibée (facteur répresseur de MDM2) (Canner JA, Sobo M. et al 2009).

Une protéase spécifique à l'ubiquitine USP7 (ou HAUSP), peut cliver l'ubiquitine liée à p53 la protégeant ainsi de la dégradation dépendante du protéasome via la voie de l'ubiquitine ligase. Ceci constitue un moyen par lequel p53 est stabilisé en réponse à des stimulations oncogéniques.

USP7 pourrai donc être nécessaire pour la capacité de p53 à répondre au stress (Hock AK, Vigneron AM. Et al 2011).

De récentes recherches ont montré que la HAUSP est principalement localisée dans le noyau (bien qu'une fraction de celle-ci est retrouvée dans le cytoplasme et les mitochondries). La surexpression de HAUSP entraine une stabilisation de p53. Cependant la déplétion de HAUSP n'entraine pas une diminution des nivaux de p53 mais les augmentent en raison du fait que HAUSP se lie et deubiquitine MDM2. Il a été démontré que HAUSP est un meilleur partenaire de liaison à MDM2 que p53 dans les cellules non stressées.

USP10 a cependant été montrée pour être localisée dans le cytoplasme des cellules non stressées et deubiquitine la p53 cytoplasmique inversant l'ubiquitilation de MDM2. A la suite de dommages à l'ADN l'USP10 se déplace vers le noyau et contribue à la stabilité de p53. USP10 n'interagit pas avec MDM2 (Yuan J, Luo K.et al 2010).

MDM-X peut s'oligomérizer avec le MDM2, conduisant à la stabilisation de MDM2 et une dégradation accélérée de MDM-X, cependant des changements dans la proportion de ces deux protéines peuvent conduire à une régulation de l'activité et des taux de p53. MDM-X est donc un facteur important pour la régulation de MDM2 (les deux ont une composition très similaire) mais contrairement au MDM2 le MDM-X ne possède pas la E-3 Ubiquitin ligase.

Il existe un autre modulateur de ce processus : le p14 ou le gène p19 ARF (alternatereading frame).

La protéine p19 ARF se lie au MDM2 et inhibe sa capacité à ubiquitiler la p53 (la transcription de ce gène est régulée par un nombre de facteurs de transcription oncogènes incluant le facteur de transcription E2F-1). ARF est une protéine très basique, la transcription de ce gène fait sujet à des régulations positives et négatives par des complexes contenant le facteur de transcription E2F-1. E2F-1 reconnais un site spécifique dans la séquence d'ADN qui régule un nombre de gènes nécessaires dans la synthèse de substrats précurseurs pour la synthèse et la réplication d'ADN.(Bates S.et al 1998).

La phosphorylation de la région N-terminal par les protéines kinases mentionnées plus haut perturbe la liaison de MDM2. D'autres protéines tels que Pin1sont ensuite recrutées et induisent unchangement de conformation de p53 empêchant d'avantage la liaison de MDM2. La phosphorylation permet également la liaison de co-activateurs transcriptionnels comme le p300 et PCAF qui acétylent l'extrémité C-terminale de p53 exposant son domaine de liaison à l'ADN lui permettant d'activer ou réprimer des gènes spécifiques. Les enzymes désacétylases telles que Sirt1 er Sirt7 peuvent désacétyler p53 entrainant une inhibition de l'apoptose (Vakhrusheva O, Smolka C.et al 2008). Certains oncogènes peuvent également stimulés la transcription de protéines qui se lient au MDM2 inhibant son activité.

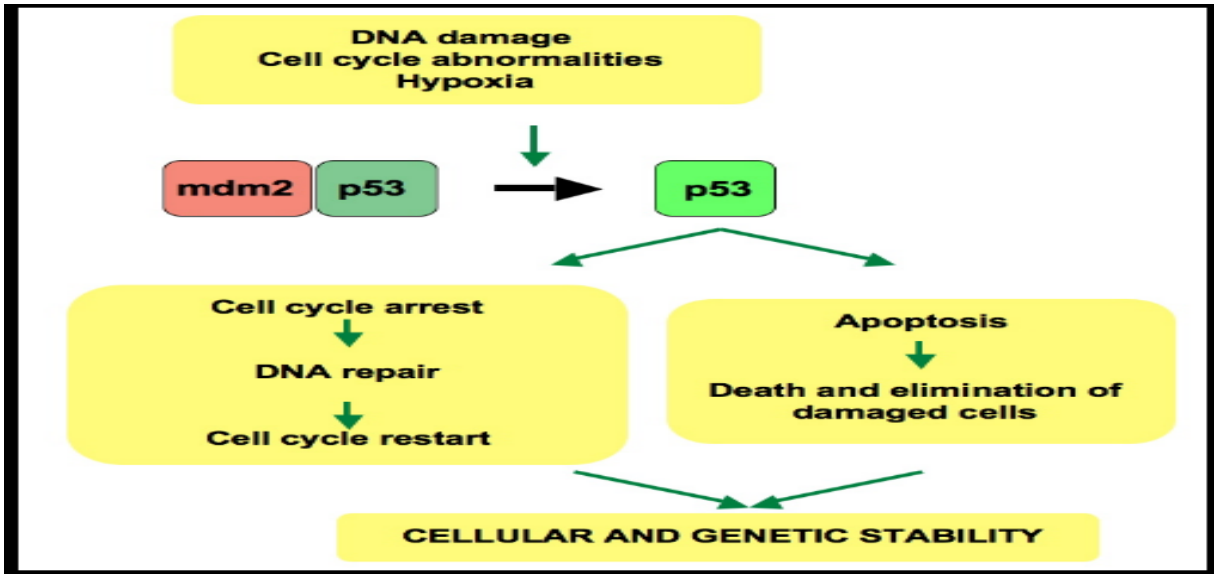


Figure7 : signalisation p53-MDM2 :Dans la cellule normal p53 est inhibée par son régulateur négatif MDM2.Lors de divers signaux de stress, diverses voies conduisent à la dissociation du complexe p53-MDM2. Une fois activé p53 induira un arrêt du cycle cellulaire afin de permettre la réparation (survie) ou apoptose (mort) de la cellule.

- **Signalisation en aval « Downstreamregulation » :**

Environ 31 gènes ont été recensés comme étant régulés par la p53 et ayant des éléments de réponse qui se lient à cette protéine. Ces gènes entrent dans plusieurs catégories en fonction de leurs fonctions responsables de l'arrêt de croissance, apoptose, inhibition de l'angiogenèse ainsi que la réparation d'ADN :

1- L'Arrêt de croissance :

La protéine p53 a un rôle direct dans l'arrêt de croissance en maintenant le cycle cellulaire aux points de régulation G1/S dans la reconnaissance des dommages à l'ADN, si la cellule reste assez longtemps en ces phases les protéines de réparation auront un temps suffisant pour

réparer les dommages liés à l'ADN et la cellule sera alors autorisée à poursuivre le cycle cellulaire.

Plusieurs de ces protéines participent à la médiation de l'arrêt du cycle cellulaire par p53 :

- La Protéine p21 : les WAF1/CIP1 codant pour la p21 et pour des centaines d'autres gènes en aval. La p21(WAF1) se lie aux complexes G1-S/CDK (CDK4,CDK6, CDK2 et CDK1) (molécules importantes pour la transition G1/S du cycle cellulaire) inhibant leur activité.

Quand p21 se lie à la cycline E-cdk2 (elle se lie directement aux complexes cyclines CDK qui permettent l'avancement du cycle cellulaire) et inhibe son activité kinase afin de permettre la réparation. L'inhibition se fait de par la phosphorylation de la protéine Rb (Rétinoblastomaprotein) qui est nécessaire pour l'entrée dans la phase S du cycle cellulaire. La cellule ne peut passer aux secondes étapes de divisions cellulaires, un mutant p53 ne se liera plus efficacement à l'ADN et par conséquent la protéine p21 ne pourra plus agir comme « signal d'arrêt » pour la division cellulaire (National Center for Biotechnology Information 1998) (92).

P21 peut également médier un arrêt de croissance associé à la différenciation et un arrêt de croissance plus permanant associé à la sénescence cellulaire. Le gène p21 contient plusieurs éléments de réponse à p53 qui assurent la médiation de la liaison directe de p53 entrainant une activation transcriptionnelle du gène codant pour la protéine de p21.

2- Apoptose :

Une grande majorité de gènes inductibles par p53 participent dans les voies pro-apoptotiques. Bien que le rôle de p53 dans l'apoptose est incontesté(le plus souvent lorsque les dommages d'ADN ne peuvent pas être réparés), le mécanisme par lequel p53 induit l'apoptose reste encore mal compris. Plusieurs études suggèrent que la p53 induit l'apoptose via des mécanismes de transcription dépendants et indépendants : L'activation transcriptionel de ces cibles ainsi qu'un nombre de gène : Bax, Bcl2, BID, NOXA, PIGS et PUMA.

La voie pro-apoptotique médiée par p53 agit sur plusieurs cascades de signalisation qui aboutissent au final à l'induction d'une mort cellulaire programmée.

3- Inhibition de l'angiogenèse :

Mis à part les effets cellulaires cités plus en haut, la protéine p53 a un effet anticancéreux au niveau tissulaire et ce de par l'inhibition de l'angiogenèse.

A mesure que les tumeurs se développent, elles recrutent de nouveaux vaisseaux sanguins pour s'alimenter. p53 inhibe cette propriété en interférant avec les régulateurs de l'hypoxie qui affectent également l'angiogenèse tels que HIF1 et HIF2, inhibant ainsi la production de facteurs inhibant l'angiogénicité et augmenter directement la production d'inhibiteurs de l'angiogenèse tel que les arresten (Teodoro JG.et al 2007) (Assadian S.et al 2012).

Les gènes régulés par la p53 incluent une thrombospondine inhibitrice de l'angiogenèse « TSP-1 », GDAIF, BAI1, un inhibiteur d'invasion tumorale et métastases KAI1, et Maspin

un inhibiteur de la protéine activatrice du plasminogène PAI ainsi que plusieurs facteurs de sécrétion protéiques qui inhibent la prolifération cellulaire.

4- Réparation d'ADN :

Les gènes codant les composants de réparation globale du génome : le p48XPE et XPC sont parmis les cibles majeurs de p53. Il existe d'autres gènes régulés par la protéine (GADD45, p53R2 « une sous unité de ribonucléotide réductase ») qui résultent en une réparation renforcée de l'ADN dans la cellule. Ces gènes sont alors nécessaires et importants pour le maintien du pool des nucléotides pendant la réparation.

La p53 peut activer des protéines de réparation d'ADN lorsque celui-ci est soumis à des dommages, ceci pourrait constituer un facteur important du vieillissement

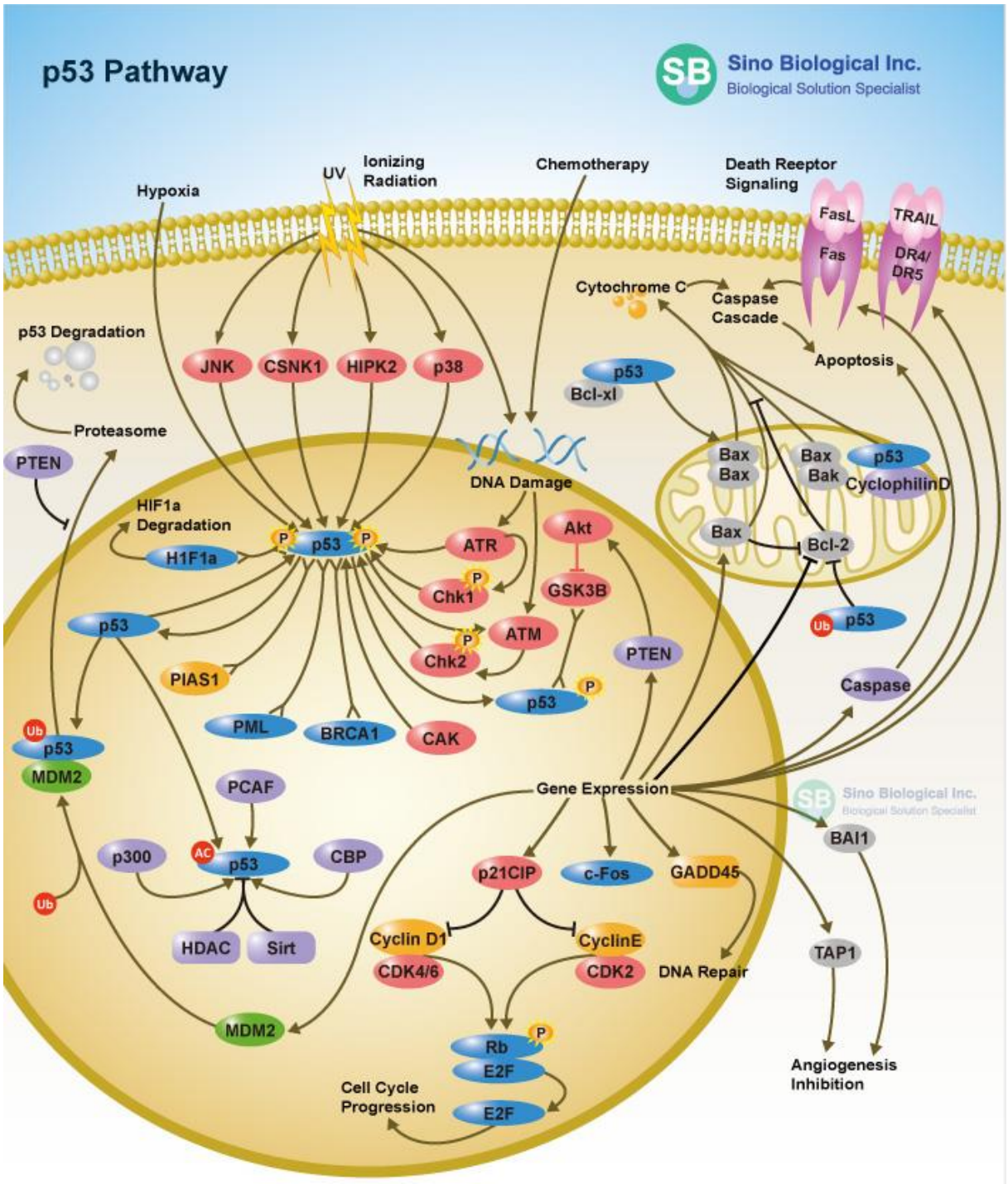


Figure 8 : voies de signalisation de p53 (www.sinobiological.com 2017).

P53 et cancer du sein :

L'analyse des mutations du gène p53 dans les cancers du sein montre une très grande hétérogénéité au niveau de la fréquence des mutations, de la proportion de délétions et d'insertions ainsi qu'au niveau de la fréquence de transversions (Figure 9).

Le gène p53 est muté moins fréquemment dans le cancer du sein que dans d'autres tumeurs, mais il est la deuxième altération génétique la plus fréquente dans ce type de cancer. La fréquence de mutation p53 et sa valeur pronostique diffèrent entre les sous types du cancer du sein (Dawid W.et al 2011).

Les examens des cancers du sein révèlent que les mutations de p53 sont rares dans les tumeurs au stade T1, qui sont moins de 2cm de diamètre et significativement plus fréquentes dans les tumeurs au stade T3, qui sont plus de 5 cm. Contrairement à la majorité des gènes suppresseurs de tumeur, comme RB ou BRCA1, qui sont généralement inactivés pendant la progression de cancer par des délétions ou des mutations silencieuses, le gène p53 dans les tumeurs humaines subit, souvent, des mutations faux-sens, dans lesquelles un seul nucléotide est remplacé par un autre. Par conséquent, la protéine contient seulement une seule substitution d'acide aminé. Les mutations de p53 associées au cancer sont très diverses dans leur emplacement dans la séquence de codage de p53 et leur effets sur la stabilité thermodynamique de la protéine p53. Cependant, la grande majorité des mutations résultent d'une perte de capacité de p53 à se lier à l'ADN et activer la transcription des gènes cibles de p53 (Noa R.et al 2011) (Hainaut P.et al 2000).

Les mutations de gène p53 sont caractérisées par une prévalence élevée de mutations faux-sens, principalement dans les exons 5-8, au niveau du domaine de liaison à l'ADN Le spectre de mutations dans le cancer du sein est similaire à celui des autres cancers, avec moins de transversions G:C à T:A et plus de transitions A:T au G:C (Pavel Rossner Jr.et al 2009).

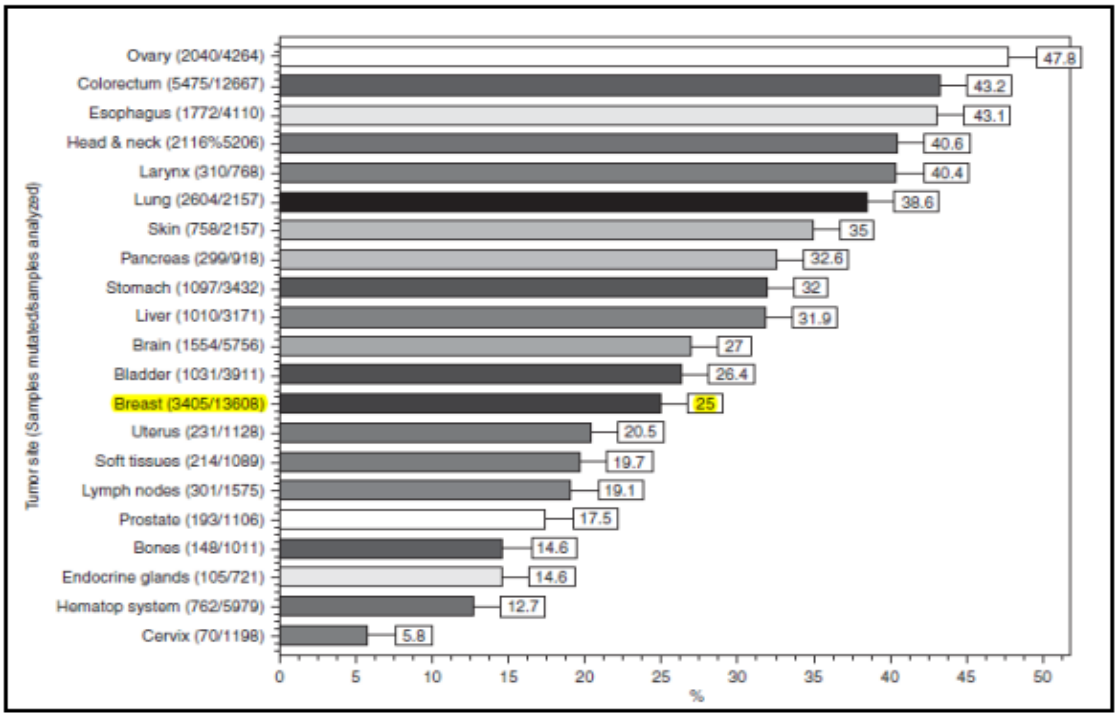


Figure 9 : prévalence des mutations de p53 dans les cancers sporadiques (Magali O.et al 2010).

L'Anti-oncogène p53 :

La protéine p53 mutée ne pouvant plus se lier à l'ADN peut entrainer l'inactivation de p53 normal en formant des complexes avec celle-ci empêchant ainsi son interaction avec l'ADN. Les temps de demi- vie de p53 mutée et des complexes p53 mutée-p53 normale sont augmentés provoquant leur accumulation dans les noyaux de cellules tumorales permettant leur détection par immuno-histo chimie (IHC).

Plusieurs études ont été publiées sur la détection de p53 par IHC utilisant une dizaine d'anticorps différents sur des séries rétrospectives la plus part de ces anticorps reconnaissent aussi bien la protéine mutée que normale. La méthode IHC ne détecte pas dans tout les cas les mutations, en particulier les mutations non sens comme les délétions (faux négatifs) par contre cette technique peut mettre en évidence une accumulation de p53 en l'absence de mutations (faux positifs) en réponse à des altérations d'ADN, fluctuations du cycle cellulaire etc.

Il a été démontré qu'en utilisant soit p53 tronqué ou des peptides synthétiques, le p53-Ab (anticorps anti-p53) se lie fortement à l'extrémité amino et carboxy-terminale de la protéine p53, une région dépourvu de mutations (Schlichtholz et al., 1992; Lubin et al., 1993). (Figure 10)

L'isotypage de ces anticorps a montré qu'ils correspondent principalement au sous classes IgG1 et IgG2, tandis que certains patients présentent une réponse IgA prédominante ((Lubin et al, 1995).

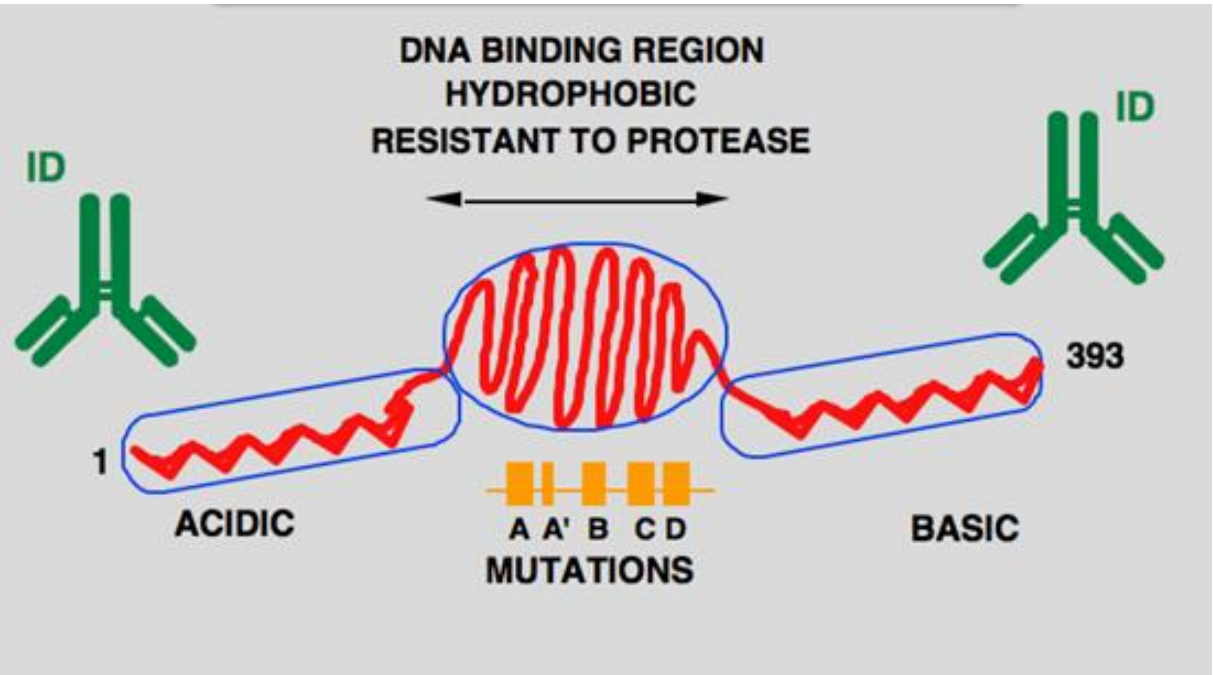


Figure 10 : model structural de p53 et de p53-Ab : les domaines immuno-dominants (ID) sont localisés en dehors des régions exposées aux mutations.(Soussi T (2000) p53 Antibodies in the sera of patients with various types of cancer: a review. Cancer Res 60: 1777-88).

Matériel et Méthodes

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du centre Pierre et Marie Curie CPMC d'Alger.

1- L**e Matériel :**

A- Les Patientes :

C'est une étude rétrospective menée sur 10 cas de patientes sélectionnées sur la base d'un essaie clinique qui a regroupé 180 patientes. Les patientes sont atteintes d'un cancer du sein triple négatif confirmé histologiquement sur microbiopsie diagnostiquée entre 2015 et 2017ayant reçu une chimiothérapie néo-adjuvante. Ces patientes subissent une chirurgie, l'étude histologique sur pièce chirurgicale (mastectomie/tumorectomie) va apprécier la réponse histologique au traitement.

La réponse histologique a été appréciée à l'aide de la classification de Sataloff.

Nos patientes ont été sélectionnées dans le groupe ayant un reliquat tumoral.

B- Méthode d'analyse :

Nous avons sélectionné 10 blocs avec reliquat tumoral.

Etude morphologique :

Pour chaque bloc de reliquat le type histologique a été précisé, le grade SBR évalué.

Etude immunohistochimique (IHC) :

Une étude IHC a été réalisée lors de l'essai clinique a l'aide des anticorps CK5/6 CK14 ET EGFR afin de subdiviser nos patientes en groupes triples négatifs basal-like TNBL et triples négatifs non basal-like TNNBL.

A partir de ces blocs une tentative de confection d'un bloc TMA a été lancée mais non aboutis.

Un anticorps anti p53 de clone : DO-7 devait être utilise

La technique immunohistochimique devait être automatise a l'aide de l'automate VENTANA. Le démasquage des sites antigéniques a été réalisé selon le protocole CC1.

- L'immunohistochimie (IHC) :

Le principe de l'immunohistochimie repose sur la reconnaissance d'un antigène par un anticorps spécifique et la révélation de ce complexe antigène-anticorps par une réaction chimique grâce à une enzyme et son substrat.
Il est possible de localiser une seule protéine (simple marquage) ou plusieurs protéines sur une même coupe de tissu (marquage multiple) (Figure 11).

Protocole de la technique :

1- Déparaffinage des lames dans des bains (06 bacs) de xylène et alcool (5 minutes dans chaque bac)

2- Préparation de la solution de démasquage: diluer 5ml de TRS dans 24.5ml d'eau distillée

3- Préchauffer la solution de démasquage (TRS) au bain marie à 95°

4- Immerger les lames dans la solution de démasquage préchauffée

5- Refroidissement sur paillasse (20 minutes) toujours dans la même solution de démasquage

6- Rincer les lames dans de l'eau distillée

7- Préparer et déposer les lames dans la chambre humide

8- Entourer l'échantillon sur lame avec un marqueur DAKO

8- A l'aide d'une micro pipette déposer 100 ul d'eau oxygénée sur les échantillons des lames et laisser agir 5 minutes

9- Mettre les lames dans l'eau distillée et rincer avec solution PBS 5 minutes

10- Déposer 100ul d'anticorps primaire

11- Couvrir la chambre humide pour 30 minutes

12- Mettre les lames dans l'eau distillée et rincer avec solution PBS 5 minutes

13- Déposer 100ul d'anticorps secondaire

14- Couvrir la chambre humide pour 30 minutes

15- Mettre les lames dans l'eau distillée et rincer avec solution PBS 5 minutes

16- Immunomarquage : déposer une goutte de DAB (di-aminobénzidique): La révélation du complexe antigène/anticorps (AG/AC) se fait par une réaction immuno enzymatique consistant en une réaction enzyme substrat : la peroxydase de raifort se lie au peroxyde d'hydrogène cette réaction (liaison) est révélée par un chromogène donneur de protons (DAB) incolore et soluble à l'état réduit, il se colore en brun et devient insoluble lorsqu'il est oxydé

($H_2O_2 + 2DH \rightarrow 2H_2O + 2D$). Le précipité marron obtenu marque ainsi le site d'interaction antigène/anticorps.

17- Rincer à l'eau distillée

18- Contre coloration à l'hématoxyline

19- Rincer à l'eau distillée

21- Post contre coloration (bluissement) : préparer 250ml d'eau + 5gouttes d'ammoniac

22- Rincer à l'eau distillée et égoutter

23- Déshydratation : passer dans deux bains d'alcool (ordre croissant)
Montage lame et lamelle

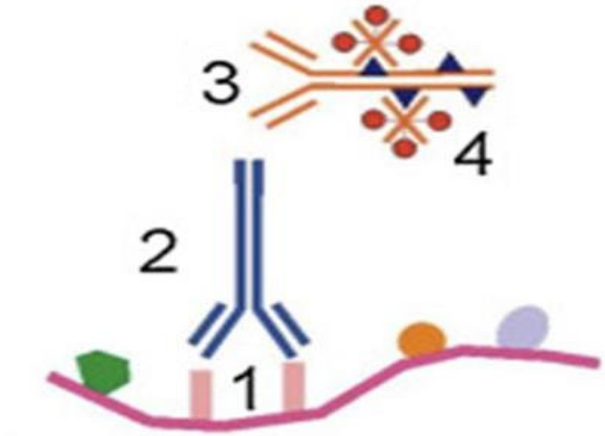


Figure 11 : schéma de la technique d'immuno-histochimie avec (1) :Antigène ; (2) :Anticorps primaire ; (3) :Anticorps secondaire couplé au complexe avidine-biotine péroxydase ; (4) : Révélation par substrat de la peroxydase.

Technologie TMA :

C'est une technologie de haut-débit dite « Tissue Micro Array ». L'étude par IHC sur un grand nombre de tumeurs (10 tumeurs représentant nos 10 cas de patientes sélectionnées) nécessite le recours à cette technique (Elle consiste à collecter en un seul bloc d'inclusion en paraffine un grand nombre d'échantillons tissulaires, sous forme de carottes cylindriques prélevées à partir de plusieurs blocs de paraffine classiques).

Confection du bloc TMA :

A- Technique automatisée :

La fabrication traditionnelle des TMA consiste à utiliser des instruments à commande manuelle, ce qui est difficile et prend un certain temps.
La technologie par réseau entièrement automatisé est relativement rapide et rend la conception, et la préparation des TMA plus faciles et fiables.

Il existe différents modèles d'appareils à préparation TMA allant de semi-automatisé à basic jusqu'aux plus avancés.

Exemple d'un appareil àTMA :

Cet automate de recherche avancé fournit la possibilité de travailler avec jusqu'à trois macro-blocs standard (pouvant être utilisés a la fois comme bloc donneur et receveur) ainsi que la possibilité de travailler avec des blocs de paraffines donneurs de différentes tailles (jusqu'à 120x85mm). (Figure 12)

- L'appareil permet également l'identification des zones de perforation sur les blocs donneurs en effectuant un seul alignement pour chaque bloc au lieu d'un alignement pour chaque spot comme pour ce qui est de la procédure classique (manuelle).

- Un plateau automatisé à haute vitesse et assisté par ordinateur assurant un positionnement rapide et précis des blocs de paraffine ainsi qu'un porte échantillon modulaire permettant le positionnement de divers éléments d'échantillons (cassettes histologiques , macro-blocs, microplaques etc..).

- Une caméra numérique a haute résolution qui permet à l'opérateur de regarder les images du bloc donneur et de la lame pré-marquée sur le moniteur du **pc** ainsi l'appareil offre la possibilité de sauvegarder les images des diapositives et des blocs de paraffines sur ordinateur HD pour des utilisations ultérieures.

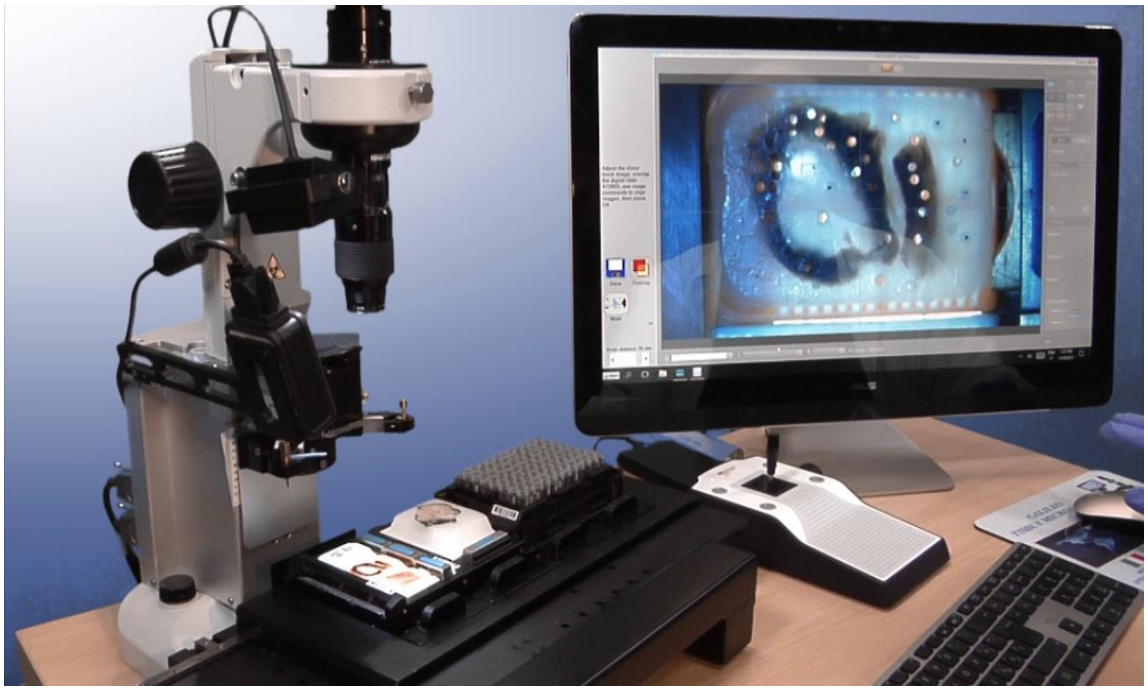


Figure 12 : appareil à TMA

Protocole d'utilisation :(Figure 13)

1- Création du modèle : création de la géométrie du réseau (taille de la paraffine, diamètre de l'aiguille, nombre de points avec espacement ou pas entre eux etc.)

2- Vérification logiciel automatique des incohérences ou erreurs de données

3- Introduction de lignes/colonnes ou des groupes d'espacement pour séparer les différents échantillons

4- Centrer automatiquement la matrice dans le bloc destinataire (receveur)

5- Vérification directe du modèle sur le bloc receveur et définition d'une bibliothèque de modèles TMA pour des utilisations ultérieurs.

6- Le design : définir les blocs donneurs à utiliser (pouvant être insérés en une fois ou ajoutés au cours de l'avancée de la technique) et marquer leurs codes a chacun à l'aide du lecteur de codes-barres.

7- Lier chaque bloc donneur à un ou plusieurs spots de la TMA (spot manuel, linéaire ou aléatoire)

8- Définir les répliques du TMA crée (jusqu'à 8 répétitions peuvent être créé)

9- Associer un code couleur à chaque spot pour améliorer la lecture TMA.

10- La construction : suivre l'organigramme pour procéder à la construction TMA et vérifier le model directement sur le bloc receveur

11- Enregistrer toutes les positions de perforation pour chaque bloc donneur en même temps (l'appareil placer automatiquement les blocs pendant l'échantillonnage) et vérifier les blocs donneurs lors de cette phase d'échantillonnage pour éviter toute discordance possible.

12- Sélection de la zone de perforation : superposer la lame en verre numérisée pré-marquée à l'image de bloc en direct (modifier la transparence de la diapositive numérisée pour mieux voir la morphologie du bloc donneur)

13- Aligner les images en faisant tourner la caméra (avec commandes spécifiques). Une fois alignées enregistrer les positions de perforation (le logiciel IseTMA vérifiera automatiquement qu'aucun chevauchement ne s'est produit).

14- Examination des données : rédiger le rapport final de l'appareil sur une feuille de calcul Excel et créer le rapport TMA final en tant que fichier de description TMA standard.

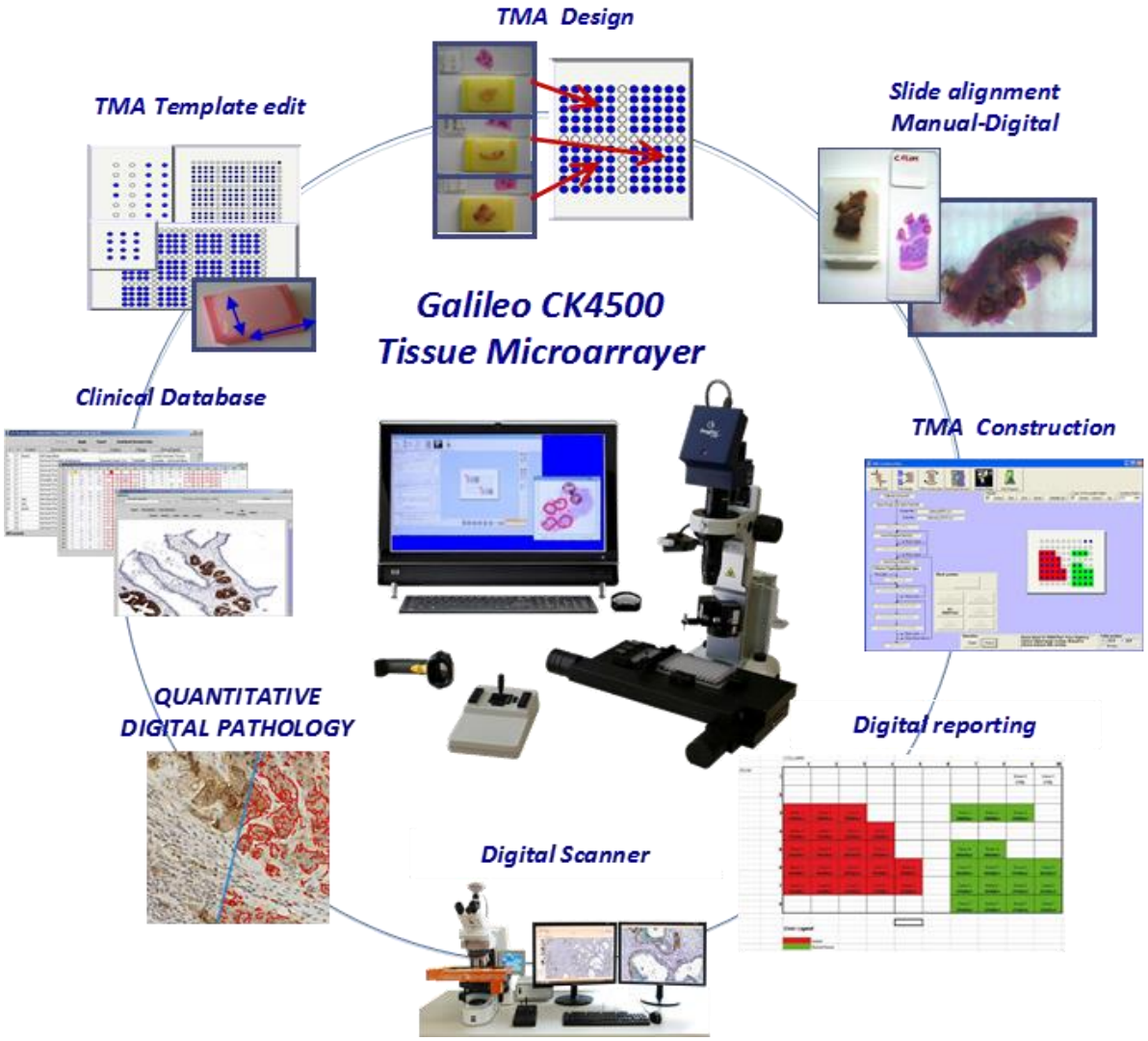


Figure 13 : schéma récapitulatif des différentes étapes de la technique TMA par un automate

B-Technique manuelle :

La confection du bloc TMA est réalisée suivant 3 étapes (Figure 14) :

1- Des trous sont pratiqués dans le bloc receveur à l'aide d'un punch

2- Prélèvement des carottes des blocs de biopsies donneurs : le punch est enfoncé dans les blocs donneurs, au niveau des zones de carottages définies auparavant. Il est ensuite retiré prélevant ainsi une carotte ayant le même diamètre que celui-ci.

3- Transfert des carottes dans le bloc TMA receveur : le punch comportant la carotte prélevée est amené à proximité de la surface du bloc TMA receveur, directement au-dessus du trou préalablement percé. Puis, la carotte est poussée hors du punch et transférée dans le trou du bloc receveur. L'opération est répétée jusqu'au transfert total des carottes (10 carottes pour notre étude).

Une fois fabriqué, le bloc TMA est incubé à 37°C pendant 10 à 15 minutes. Cela permet de réchauffer la paraffine afin d'établir une bonne cohésion entre les carottes et la paraffine du bloc receveur.

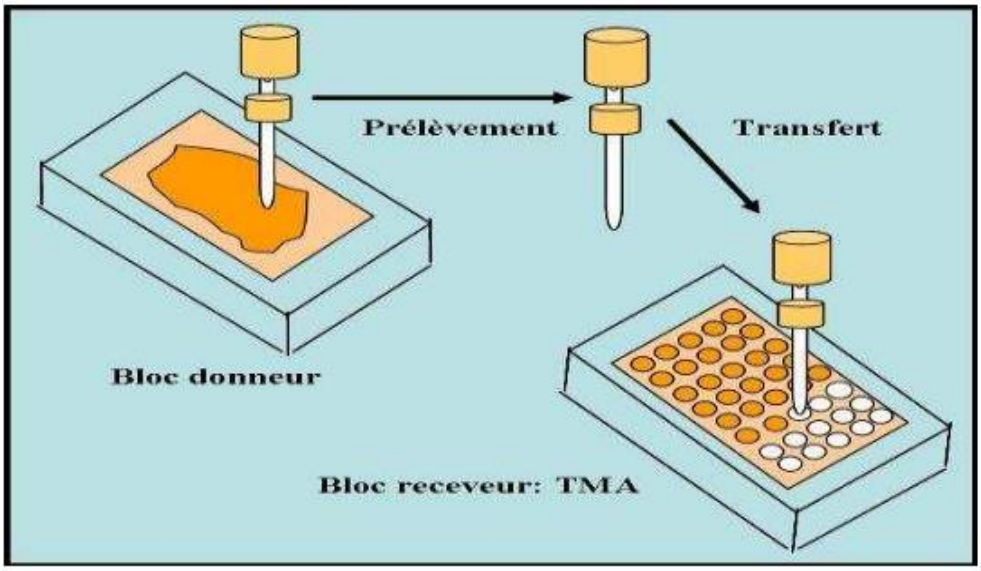


Figure 14 : principe de la technologie TMA manuelle

Réalisation des coupes TMA :

A l'aide d'un microtome des coupes microscopique (de 1 à 3um) d'épaisseur seront réalisées sur le bloc TMA.

Etalement sur lames :

Les prélèvements seront étalés sur des lames silanisées(imprégnées dans une solution de Silane SiH4 diluée à 7% pendant 2 à 3 minutes) dans un bain marie à une température de 40 degrés.

Etiquetage des lames :

Le numéro du bloc ainsi que l'anticorps utilisé sera marqué sur les lames avec un crayon

Incubation :

Les lames seront incubées dans une étuve à 37 degrés pendant une nuit.

Technique d'immuno-histochimie automatisée :

A- Protocole d'utilisation avec l'automate VENTANA (voir annexe 5)

B- Protocole d'utilisation avec l'anticorps anti p53 :

1- Etuvage

2- Chauffer la lame à 75°C et incuber 4minutes

3- Déparaffinage

4- Chauffage des lames jusqu'à 72°C à partir de températures moyennes (déparaffinage)

5- Démasquage (cell conditioning1)

6- Chauffer la lame à 95°C et incuber 8minutes (avec tampon CC1)

7- 52minutes d'ULTRA CC1 (sélectionné) (c'est la solution de démasquage)

8- Déposer l'huile paraffine (ULTRA LCS)

12- Titration de l'anticorps

13- [Hand Apply] anticorps primaire anti p53 et incuber pour 16minutes

14- Contre-coloration : déposer une goutte de HEMATOXYLIN, appliquer coverslip et incuber 8 minutes.

Lecture des résultats :

1- Lecture des résultats de la coloration hématoxyline-éosine :

La double coloration hématoxyline-éosine aboutis à la coloration de différents éléments cellulaire

- Les noyaux en bleu

- Le cytoplasme en rose

- Le collagène en rose pale

La visualisation des résultats se fait par microscope photonique à des grossissements croissants.

2- Lecture des résultats de l'immuno-histochimie :

La visualisation du résultat se fait par microscope optique au faible grossissement (Gx40) puis confirmé au fort grossissement (Gx1000).

Résultats et Discussion

I- Paramètres pré chimiothérapie :

Caractéristiques générales de la population :

1- Répartition des patientes triples négatives selon l'âge :

L'âge de nos patientes varie entre 28 et 53 ans avec une moyenne d'âge de 43 ans.

La répartition des malades par tranches d'âges a montré que la plus touchée était celle entre 40-50 ans soit 50% des cas (Figure 15). Les autres tranches d'âges étaient réparties comme suit :

- Supérieur ou égal à 50 ans : 2 patientes (20%)
- 40-50 : 5 patientes (50%)
- 30-40 : 2 patientes (20%)
- Inférieur à 30 : 1 patiente (1%)

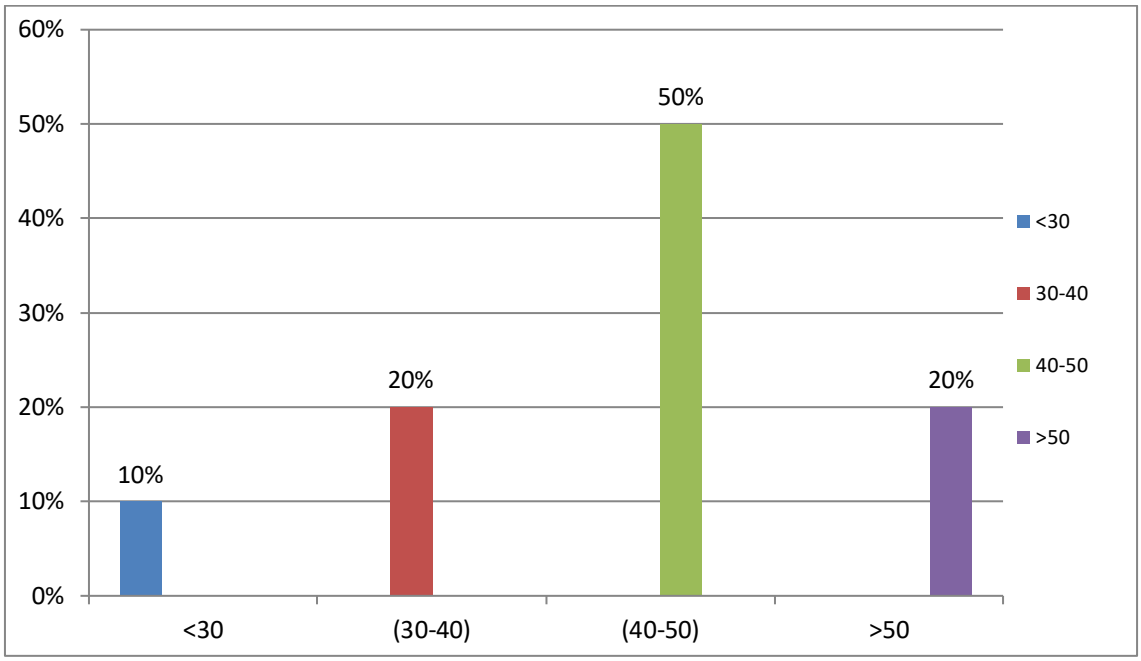


Figure 15 : répartition des patientes selon l'âge

2- Répartition des patientes selon la taille tumorale :

La taille tumorale a été mesurée chez l'ensemble de nos patientes et varie entre 5cm et 12cm avec une moyenne égale à 6.75cm.

La tumeur est classée en majorité en T3, soit 6 cas (60%), et 4cas classés en T2 (40%), (Figure 16).

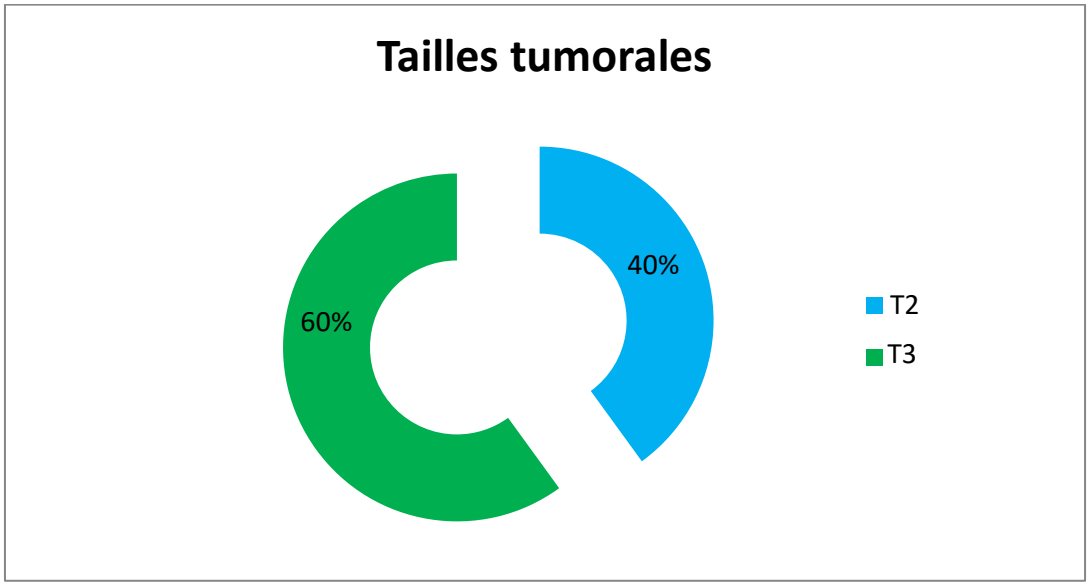


Figure 16 : Répartition des patientes selon la taille tumorale

3- Répartition des patientes selon le type histologique :

Le type histologique de tous nos patientes soit les 10 cas ont été classés en Carcinome Canalaire infiltrant soit un total de 100%.

4- Répartition selon le grade SBR :

Les reliquats tumoraux pré chimiothérapie de grade III représentent la majorité des cas de nos patientes : 08 patientes ont été classées en grade III soit 80% des cas et 02 patiente a été classée en grade II soit 20% des cas. (Figure 17)

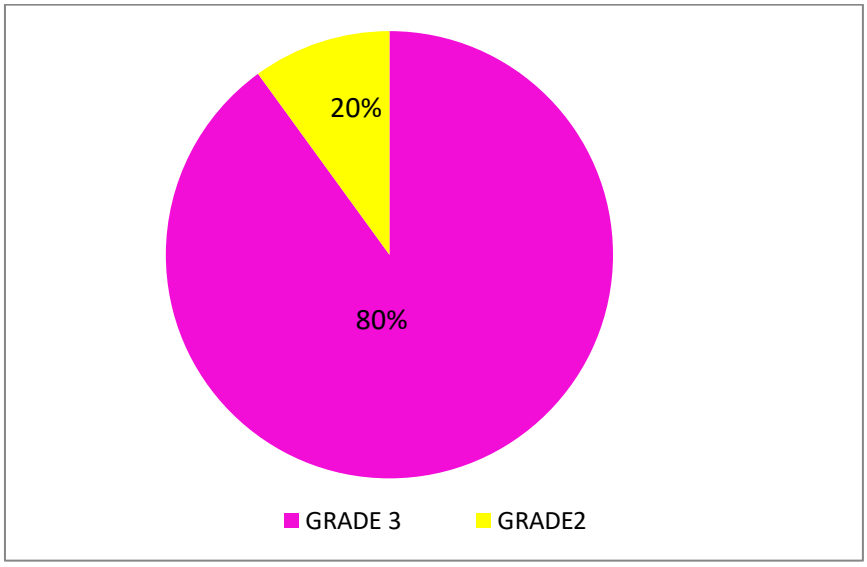


Figure 17 : Répartition des patientes selon le grade SBR

5- Répartition immuno-histochimique :

On rappelle que toutes nos patientes sélectionnées pour cette étude ont été préalablement diagnostiqué avec un cancer du sein triple négatif, par conséquent le sous-type TN représente 100% des cas.

06 patientes (soit 60%) ont été classées en triples négatifs basal-like TNBL et 04 patientes (40%) sont triples négatifs non basal-like TNNBL. (Figure 18).

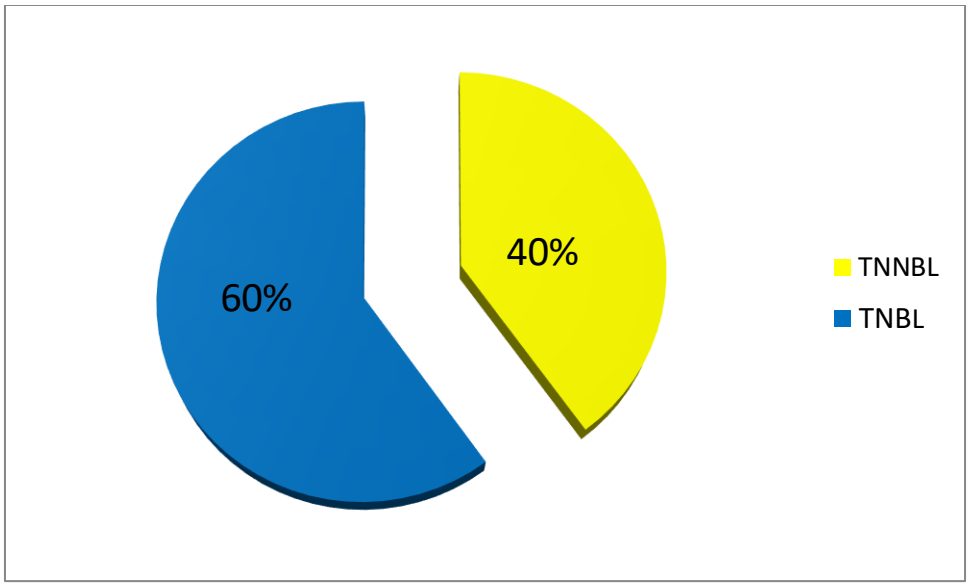


Figure 18 : Répartition des patientes selon l'étude immunohistochimique

II- Paramètres post chimiothérapie :

1- **Répartition selon la réponse histologique au niveau du sein** :

L'étude histologique a montré que la majorité des cas qu'on a choisi correspondent à des TC : 9 patientes ont été classées en TC soit 90% du nombre total de patientes alors que seulement 1 patiente a été classée en TD soit 10% des cas. (Figure 19)

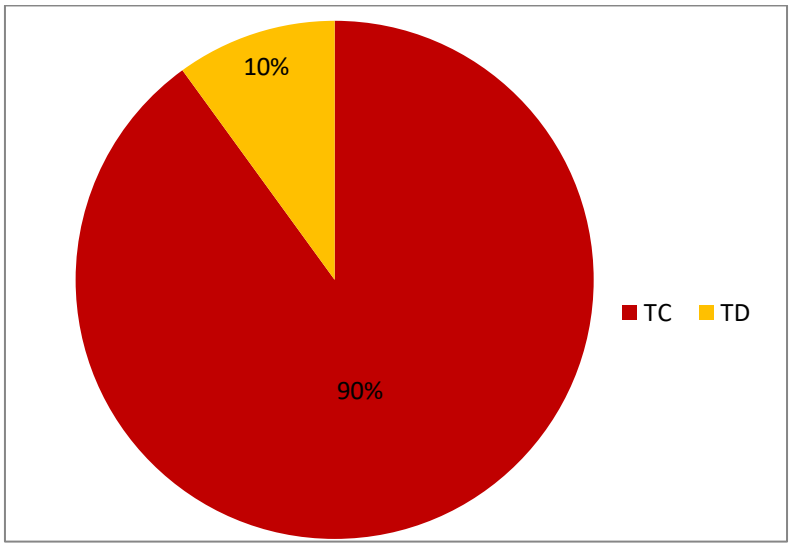


Figure 19 : Répartition des patientes selon la réponse histologique au niveau du sein

2- Réponse au niveau des ganglions :

Dans cette étude la réponse ganglionnaire montre que la majorité des cas correspondent à des NB soit 5 cas (50%), 3 patientes avec une réponse NC (30%), 1 patiente avec une réponse NA (10%) ainsi que 1 patiente avec une réponse ND (10%). (Figure 20)

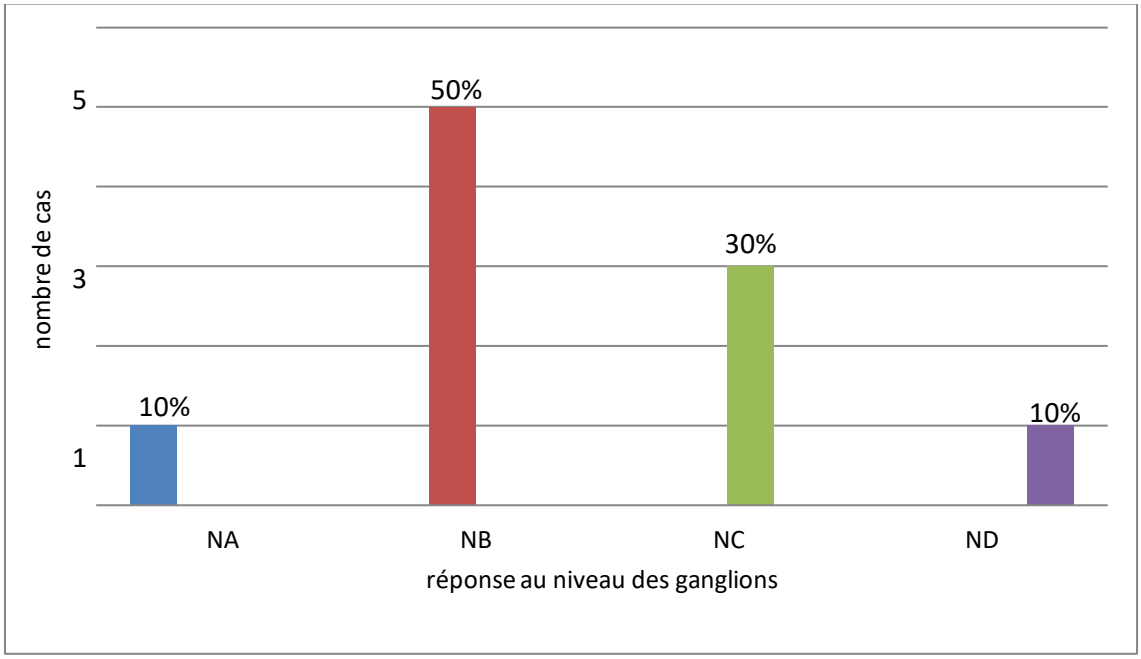


Figure 20 : Répartition des patientes selon la réponse au niveau ganglionnaire

Discussion

L'identification et la validation d'une thérapie ciblée chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif constitue aujourd'hui l'un des besoins les plus urgents dans le traitement et la prise en charge de ce sous-groupe de cancer du sein.

L'une des principales raisons de l'échec de mise au point d'un traitement ciblé pour ce sous-groupe reste la difficulté à identifier une altération moléculaire ciblée et spécifique répandue au sein de ces tumeurs.

Notre étude devait mettre en évidence le taux de p53 dans les résidus tumoraux suite à une chimiothérapie néo adjuvante.

Nous espérions également retrouver chez nos patientes Basal-like de fortes mutations p53 car le sous type Basal-like provient le plus souvent et dans la majorité des cas suite à des mutations du gène BRACA1 qui engendre à son tour la mutation d'autres gènes notamment celles du gène p53. Il est tout au moins convenu que la recherche de mutations p53 est beaucoup plus valable en biologie moléculaire qu'en immunohistochimie.

L'étude publiée en 2012 lors du congrès de San Antonio sur le cancer du sein ayant pour objectif l'analyse des profils de cancer du sein triples négatifs après chimiothérapie néo adjuvante afin de cibler les altérations moléculaires sur les résidus tumoraux reflétant des micro-métastases résistantes à la chimiothérapie qui finissent par se reproduire dans ces patientes. (Justin M Balko.et al 2012).

Le séquençage nouvelle génération (NGS) pour 182 oncogènes et le profilage d'expression génique ont montré que sur 102 patients triples négatifs 72 à 81 (89%) sur 81 tumeurs ont montré des mutations p53. Des altérations (20%) dans la voie de réparation de l'ADN (BRACA1/2, ATM) ainsi que des Altérations (31%) des gènes impliqués dans le cycle cellulaire.

Ces résultats permettent d'entrevoir de nouvelles approches thérapeutiques basés sur la réponse post chimiothérapie. Cependant les recherches actuelles se basent plutôt sur l'identification de traitements potentiels ciblés au sein des tumeurs avant chimiothérapie.

On sait aujourd'hui que le gène p53 est retrouvé muté dans près de 80% des patients triples négatifs, représentant ainsi une cible thérapeutique et bio- marqueur potentiel pour ces patients.

Bien que plusieurs études rétrospectives aient examiné et étudié cette hypothèse notamment celle de (Micheal J.Duffy.et al.2018) (100) les résultats obtenus à ce jour sont mitigés. Ainsi il nous ait aujourd'hui pas possible d'affirmer que la p53 mutée puisse être considéré comme bio-marqueur thérapeutique prédictif ou pronostique du cancer du sein.

Au cours de la dernière décennie cependant, plusieurs composés capables de réactivé le p53 mutant ont été découverts et étudiés. Ces molécules ont la capacité de reconvertir la protéine p53 mutante en une conformation avec des propriétés de type sauvage. L'étude faite par

(Naoise C Synnott.et al.2017) (101) a démontré que le composé PK11007 (2-sulfonylpyrimidine) était capable d'inhiber la prolifération cellulaire et d'induire l'apoptose des lignées cellulaires mutantes p53 indiquant ainsi que la p53 mutée était une cible majeur du PK11007 pouvant la réactivée.

L'utilisation d'autres composés comme le PRIMA-1 (APR 246) a également montré une capacité à cibler les P53 mutantes pour les réactivées, l'étude menée par (N C.Synnott.et al.2016) (102) a pu démontrer que le PRIMA-1 avait la propriété d'induire l'apoptose des lignées cellulaires p53 mutantes ainsi qu'une inhibition de leur prolifération attestant ainsi que le ciblage de p53 mutée par le PRIMA-1 constitue une nouvelle approche pour sa réparation et sa réactivation.

Grace aux études menées sur le gène p53 muté les composés tels que APR-246, PK11007 ou encore COTI-2 sont maintenant des traitements potentiels pour les patients triples négatifs. Des recherches supplémentaires sont cependant nécessaires pour identifier un rôle potentiel de bio-marqueur pour le P53 mutant dans le cancer du sein.

Aujourd'hui les études et recherches sur d'éventuels traitements pour les cancers du sein triples négatifs se poursuivent, l'avancée technologique biomoléculaire et génétique a permit de réaliser des progrès significatifs pour mieux comprendre la maladie et prendre en charge ces patients.

Conclusion

Notre étude si elle avait été menée a son terme aurait été originale car, à notre connaissance aucune autre étude traitant le même sujet à été faite en Algérie

C’est un travail qu’on aurait voulu mener à bon terme mais nous sommes restés sur notre faim étant donné qu’on a évoqué une problématique à laquelle on n’a pas pu répondre.

Références

A.

Abbass F, Akasbi Y. et al Molecular classification of breast cancer in Morocco 2012

Abd El-Rehim DM, Ball G, PinderSE,Rakha E, Paish C, Robertson JF, Macmillan D,Blamey RW, Ellis IO.High-throughput proteinexpression analysis using tissue microarray technology of a large well characterised seriesidentifies biologically distinct classes of breastcancer confirming recent cDNA expressionanalyses. International Journal of Cancer2005;116(3):340-350.

Alawadi S, Ghabreau L, Alsaleh M, Abdulaziz Z, Rafeek M, Akil N, Alkhalaf M (September 2011). "P53 gene polymorphisms and breast cancer risk in Arab women". Medical Oncology. **28** (3): 709–15.

Assadian S, El-Assaad W, Wang XQ, Gannon PO, Barrès V, Latour M, Mes-Masson AM, Saad F, Sado Y, Dostie J, Teodoro JG (March 2012). "p53 inhibits angiogenesis by inducing the production of Arresten". Cancer Research. **72** (5): 1270–9.

Athan, I.L. et al Percent positive axillary involvement predicts for the development of brain metastasis in high risk patients with nonmetastatic breast cancer receiving post mastectomy radiotherapy. Breast J. 2008.

B.

Balko JM, Giltnane JM, Wang K et al. Molecular profiling of the residual disease of triple-negative breast cancers after neoadjuvant chemotherapy identifies actionable therapeutic targets. Cancer Discov 2014;4(2):232-45.

Bates S, Phillips AC, Clark PA, Stott F, Peters G, Ludwig RL, Vousden KH (September 1998). "p14ARF links the tumour suppressors RB and p53". Nature. **395** (6698): 124–5. Bibcode:1998Natur.395..124B

Bauer KR, Brown M, Cress RD, PariseCA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogenreceptor (ER)-negative, progesterone receptor(PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so called triple-negativephenotype: a population-based study from theCalifornia Cancer Registry. Cancer 2007;109(9):1721-1728.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Birnbaum D. Prognostic classification of breast cancer and gene expression profiling. Medecine sciences 2008 ; 24(6-7) :599-606.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basalare triple-negative breast cancers? InternationalJournal of Cancer 2008;123(1):236-240.

Bloom, H.J. et Richardson, W.W Histological grading and prognosis in breast cancer ; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15years. Br. J. Cancer 1957.

Bonadonna, G. et al primary chemotherapy in operable breast cancer: eight year experience in the Milan Cancer Institute. J ClinOncol 1998.

Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al.: Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. Clin Cancer Res 2015;21:1688-1698.

C.

Canner JA, Sobo M, Ball S, Hutzen B, DeAngelis S, Willis W, Studebaker AW, Ding K, Wang S, Yang D, Lin J (September 2009). "MI-63: a novel small-molecule inhibitor targets MDM2 and induces apoptosis in embryonal and alveolar rhabdomyosarcoma cells with wild-type p53". British Journal of Cancer. **101** (5): 774–81.

Charles Sawyers. Targeted Cancer Therapy.Nature.November 2004 **432**, pages294–297(2004)

Chen, S., Chen, C.M. , Yu, K.D. , Yang, W.T. et Shao, Z.M. a prognostic model to predict outcome of patients failing to achieve pathological complete response after anthracyc line containing neo adjuvant chemotherapy for breast cancer. J.Surg.Oncol 2012.

Clavel Chapelon F: evolution of age at menarch and at onset of regular cycline in a large cohort of French women. Hum reprod 2002

Collaborative groups on hormonal factors in breast cancer : breast cancer and hormone replace therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52.705 with breast cancer and 108.411 women without breast cancer.1997.

Cui R, Widlund HR, Feige E, Lin JY, Wilensky DL, Igras VE, D'Orazio J, Fung CY, Schanbacher CF, Granter SR, Fisher DE (March 2007). "Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation". Cell. **128** (5): 853–64.

D.

Daly, P.A: Genetic counseling in breast and colorectal cancer. Ann. Oncol. Suppl 2005.

Dawid W., Marco N., Licio C., etGiannino D. S. The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. Genes & Cancer.2011 : 466–474.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, Lickley LA, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. Clin Cancer Res 2007;13(15 Pt 1):4429-4434.

Dumitrescu, R.G, and Cotarla, I. understanding breast cancer risk; where do we stand in 2005 J. Cell Mol. Med 2005.

E.

Early Breast Cancer Trialists Collaborative Groupe (EBCTCG) effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15 years survival : an overview of the randomised trials. Lancet 14mai2005

Espié M. Epidémiologie du cancer du sein.In :Espié M, Gorin A. le sein. 3ed Paris. Edition Eska 2007.

F.

Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarrays analysis.Oncogene 2005 ; 24 :4660-71.

Fitzgibons, p.L. et al Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus statement 1999. Arch.Pathol.lab.Med 2000.

Ford D, Easton DF, Stratton M, et al. Genetic heterogeneity and penetrance analysis of the BRCA1 and BRCA2 genes in breast cancer families.The breast cancer linkage Consortium.Am J Hum Genet 19981

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. The New England Journal of Medicine 2010;363(20):1938-1948.

Fredholm, H. et al breast cancer in young women : poor survival despite intensive treatment PloS. One4 (2009).

G.

"Genome's guardian gets a tan started". *New Scientist. March 17, 2007*. Retrieved 2007-03-29.

Goldhirsh, a et al personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. Ann. Oncol. 24 (2013)

Goncalves AK, Dantas Florencio GL, Maisonnette de Atayde Silva MJ, Cobucci RN, Giraldo PC, and Cote NM 2014 effects of physical activity on breast cancer prevention: a systemic review. Journal of physical activity and health.

H.

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, Harris L, Hait W, Toppmeyer D. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. J ClinOncol 2006;24(36):5652-5657.

Hainaut P., Hollstein M. p53 and human cancer: the first ten thousand mutations. Adv Cancer Res. 2000 : 77, 81-137.

Hamdi Cherif M et al.,J Cancer ResTher 2015

Harms KL, Chen X (March 2005). "The C terminus of p53 family proteins is a cell fate determinant". Molecular and Cellular Biology. **25** (5): 2014–30.

Hock AK, VigneronAM, Carter S, Ludwig RL, Vousden KH (November 2011). "Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42". The EMBO Journal. **30** (24): 4921–30.

J.

Jézéquel P, Loussouarn D, Guérin-Charbonnel C et al. Geneexpression molecular subtyping of triple-negative breast cancer tumours: importance of immune response. Breast Cancer Res 2015;17:43

Johnson KC, Hu J, Mao Y. passive and active smoking and breast cancer risk in Canada 1994-97. The Canadian Cancer Registries Epidemiology Research Group. Cancer Causes Control 2000.

K.

KaabiBatoul Thèse d'étude du polymorphisme du gène adrénergique (ADRA2A) dans le cancer du sein 2015-2016 DirGhania DELAAOUI.

Keegan, T.H.M. , DeRouen, M.C. , Press, D.J. , Kurian, A.W. et Clarke , C. a. occurrence of breast cancer subtypes in adolescent and young adult women. Breast Cancer Res. 14 (2012).

Kelsey JL , Gammon MD , John EM : reproductive factors and breast cancer. EpidemiolRev 1993.

L.

L. Mauriac, N. Madranges, M. Debled, H. Bonnefoi.Extrait des Mises à jour en Gynécologie Médicale.Volume 2008 publié le 3.12.2008

Lahmann PH, Freidenreich C, Schuit AJ, Salvini S, Allen NE, Key TJ, Khaw KT, Bingham S, Peeters PH, Monninkhof E et al. 2007 physical activity and breast cancer risk: the European prospective investigation into cancer and nutrition, cancer epidemiology, biomarkers and prevention : publication for the American Association for Cancer Research cosponsored by the American Society of Preventive Oncology .

Larsen S, Yokochi T, Isogai E, Nakamura Y, Ozaki T, Nakagawara A (February 2010). "LMO3 interacts with p53 and inhibits its transcriptional activity". Biochemical and Biophysical Research Communications. **392** (3): 252–7.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. J Clin Invest 2011;121(7):2750-67.

Levine AJ, Lane DP, eds. (2010). The p53 family.Cold Spring Harbor Perspectives in Biology. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. ISBN 978-0-87969-830-0.

Li, J. P., Zhang, X. M., Zhang, Z., Zheng, L. H., Jindal, S., & Liu, Y. J. (2019). Association of p53 expression with poor prognosis in patients with triple-negative breast invasive ductal carcinoma.Medicine, 98(18), e15449.

Lubin, R., Schlichtholz, B., Bengoufa, D., Zalcman, G., Tredaniel, J., Hirsch, A., Caron de Fromentel, C., Preudhomme, C., Fenaux, P., Fournier, G., Mangin, P., Laurent-Puig, P., Pelletier, G., Schlumberger, M., Desgrandchamps, F., Leduc, A., Peyrat, J. P., Janin, N., Bressac, B., and Soussi, T. (1993). Analysis of p53 antibodies in patients with various cancers define B-Cell epitopes of human p53 - distribution on primary structure and exposure on protein surface. Cancer Res 53, 5872-5876.

M.

Marty B, Maire V, Gravier E et al. Frequent PTEN genomic alterations and activated phosphatidylinositol 3-kinase pathway in basal-like breast cancer cells. Breast Cancer Research 2008 ; 10 : R101.

Matlashewski G, Lamb P, Pim D, Peacock J, Crawford L, Benchimol S (December 1984). "Isolation and characterization of a human p53 cDNA clone: expression of the human p53 gene". The EMBO

MATRAY et al. - THÈSE POUR LE DOCTORAT EN MÉDECINE

Mavaddat N, Barrowdale D, Andrulis IL, Domchek SM, Eccles D, Nevanlinna H, Ramus SJ, Spurdle A, Robson M, Sherman M et al. Pathology of breast and ovarian cancers among BRCA1 and BRCA2 mutation carriers: results from the Consortium of Investigators of Modifiersof BRCA1/2 (CIMBA). Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2012;21(1):134-147.

Michael J Duffy , Naoise C Synnott , John Crown.et al. Mutant p53 in breast cancer: potential as a therapeutic target and biomarker. Breast Cancer Res Treat. 2018 Jul;170(2):213-219. doi: 10.1007/s10549-018-4753-7. Epub 2018 Mar 21.

Mombelli S. Cancer du sein et immunologie anti tumorale. Thèse soutenue 2014 Dir. Pr .Hervé Curé.

Monninkhof EM, Elias SG, Vlems FA, Van der Tweel, Schuit AJ, Voskuil DW, Van Leeuwen FE and Tfpac 2007 physical activity and breast cancer : a systemic review. Epidemiology

Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR, Tumor Biomarkers expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. Br J Cancer. 10Juill2012.

N.

N C Synnott, A Murray.et al. Mutant p53: a novel target for the treatment of patients with triple-negative breast cancer?. 2017 Jan 1;140(1):234-246.doi: 10.1002/ijc.30425. Epub 2016 Sep 24

N Ravanel et al. - Cerb B2 ou Her2 marqueurs d'intérêt dans la prise en charge du cancer du sein

Nandi S , Guzman RC , Yang J , : Hormones and mammary carcinogenesis in mice , rats and human: a unifying hypothesis. PorcNatlAcadSci U S A 1995

Naoise C Synnott, Matthias R Bauer , Stephen Madden et al. Mutant p53 as a therapeutic target for the treatment of triple-negative breast cancer: Preclinical investigation with the anti-p53 drug, PK11007**.**2018 Feb 1;414:99-106.doi: 10.1016/j.canlet.2017.09.053. Epub 2017 Oct 22.

National Center for Biotechnology Information (1998). The p53 tumor suppressor protein. Genes and Disease. United States National Institutes of Health.Retrieved 2008-05-28.

Neville AM, Bettelheim R, Gelber RD, Save-Soderbergh J, Davis BW, Reed R. et al Factors predicting treatment responsiveness and prognosis in node negative breast cancer. The International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. J ClinOncol. Mai1992.

Ni, Y.B., Tsang, J.Y.S., Chan, S.K. &Tse G.M.A. novel morphologic molecular recurrence predictive model refines traditional prognosis tools for invasive breast carcinoma. Ann.Surg.Oncol 2014.

Noa R., Ran B., Moshe O., et VardaR .Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Important Milestones at the Various Steps of Tumorigenesis. Genes & Cancer.2011 : 466–474.

O.

Oudard S, Elaidi R, Tartour E, Cuenod CA, Mejean A, Ayllon J, et al. Inhibiteurs de l'angiogenèse : revues de l'apport thérapeutique du sorafenib, du sunitinib et du bevacizumab dans le cancer du rein métastatique. Bull Cancer. 2010 Avril;97

P.

PavelRossner Jr., Marilie D. G., Yu-Jing Z., Mary Beth T., Hanina H. et al. Mutations in p53, p53 protein overexpression and breast cancer survival. J Cell Mol Med. 2009 : 13(9B): 3847–3857.

Pérou, C.M. et al Molecular portraits of human breast tumors . Nature,406 (2000).

Pharoah PD, Day NE, Duffy S, et al. family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta analysis. Int J Cancer 1997.

.Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. Breast Cancer Research 2010;12(5):R68.

Purvis, Jeremy E.; Karhohs, Kyle W.; Mock, Caroline; Batchelor, Eric; Loewer, Alexander; Lahav, Galit (2012-06-15). "p53 dynamics control cell fate". Science. **336** (6087): 1440–1444.

R.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. Histopathology 2007;50(4):434-438.

Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, Reis-Filho JS. Are triplenegative tumours and basal-like breast cancer synonymous? Breast Cancer Research 2007;9(6):404; author reply 405.

Registre des tumeurs d'Alger.2015

Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple-negativetumours: a critical review. Histopathology2008;52(1):108-118.

Robert J. Les inhibiteurs de tyrosine kinase. Bull Cancer. 2011 Nov;98(11).

Romero, Q., Bendhal, P.O., Ferno, M., Grabau, D. &borgquist, S. a novel model for Ki67 assessment in breast cancer. Diagn.Pathol 2014.

Rouëssé J. Cancer du sein : étape pré-thérapeutique. John LibbeyEurotext; 2002. 156 p.

Roux M. thèse d'étude du Fibroadénome géant chez l'adolescente et influence hormonale : analyse d'une série de 90 cas.Université paris7.2mai 2013.

S.

Saglier J. Cancer du sein : questions et réponses au quotidien. Paris: Elsevier Masson; 2009.

Sakorafas, GH.,Krespis, E., and Pavlakis, G., risk estimation for breast cancer development; a clinical perspective. Surg. Oncol. 2002.

Sataloff DM, Mason BA, Prestipino AJ, Seinige UL, Lieber CP, Baloch Z. Pathologic response to induction chemotherapy in locally advanced carcinoma of the breast: a determinant of outcome. J Am CollSurg 1995; 180:297-306.

Schlichtholz, B., Legros, Y., Gillet, D., Gaillard, C., Marty, M., Lane, D., Calvo, F., and Soussi, T. (1992). The immune response to p53 in breast cancer patients is directed against immunodominant epitopes unrelated to the mutational hot spot. Cancer Res. 52, 6380-6384.

Semba, K., Toyoshima, K. & Yamamoto, T. cerbB-1/ epidermal growth factor receptor 1985.

SerinD ,Sobol H , Whorton JC , : Heriditary breast cancer , circa 1750 . Lancet 1998.

Slamon, D.J. et al human breast cancer : correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2lneu Oncogene. Science 1987.

Société Canadienne du Cancer: Analyse du statut des récepteurs hormonaux. www.cancer.ca [cited 2015 Dec 13] Available from: http://www.cancer.ca/fr-ca/cancer-information/diagnosis-and-treatment/testsand-procedures/hormone-receptor-testing/?region=on

Sorolie, T. et al Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. Proc.Natl.Acad .Sci. U.S.A, 98 (2001).

Speck RM, Schmitz KH, Lee IM, and MacTiernan A 2011 physical activity, Dietary calorie restriction, and cancer. Springer energy balance and cancer (vol3)

Surget S, Khoury MP, Bourdon JC (December 2013). "Uncovering the role of p53 splice variants in human malignancy: a clinical perspective". OncoTargets and Therapy. **7**: 57–68.

T.

Tavassoli, F.A lobular and ductal intraepithelial neoplasia. Pathologe 29 suppl 2, 107R11 2008.

Teodoro JG, Evans SK, Green MR (November 2007). "Inhibition of tumor angiogenesis by p53: a new role for the guardian of the genome". Journal of Molecular Medicine (Review). **85** (11): 1175–86.

V.

Vakhrusheva O, Smolka C, Gajawada P, Kostin S, Boettger T, Kubin T, Braun T, Bober E (March 2008). "Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice". Circulation Research. **102**(6): 703–10.

Venkitaraman AR. Cancer susceptibilityand the functions of BRCA1 and BRCA2. Cell2002;108(2):171-182.

Venot C, Maratrat M, Dureuil C, Conseiller E, Bracco L, Debussche L (August 1998). "The requirement for the p53 proline-rich functional domain for mediation of apoptosis is correlated with specific PIG3 gene transactivation and with transcriptional repression". The EMBO Journal. **17**(16): 4668–79.

VonMinckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H.et al Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes.2012 May 20;30(15):1796-804. doi: 10.1200/JCO.2011.38.8595.

W.

Wang K, Zhang Q, Li D et al. PEST domain mutations in Notch receptors comprise an oncogenic driver segment in triple-negative breast cancer sensitive to a γ-secretase inhibitor. Clin Cancer Res 2015;21(6):1487-96.

Wang Y, Waters J, Leung ML et al. Clonal evolution in breast cancer revealed by single nucleus genome sequencing. Nature 2014;512(7513):155-60.

Weigelt B, Reis-Filho JS. Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry. Breast Cancer Research 2010;12(4):S5

Y.

Yu H. Alcohol consumption and breast cancer risk JAMA 1998.

Yuan J, Luo K, Zhang L, Cheville JC, Lou Z (February 2010). "USP10 regulates p53 localization and stability by deubiquitinating p53". Cell. **140** (3): 384–96.

Annexe 1

Classification du cancer du sein :

A- Carcinome invasif (canalaire) sans type particulier :

Représentant 70% à 80% des cancers du sein ce premier type est caractérisé par une reproduction en architecture plus ou moins canalaire avec un large éventail de model morphologiques ainsi que plusieurs variant :

- Carcinome avec caractéristiques médullaires
- Carcinome avec différenciation neuroendocrine

On compte également de rares variantes (sébacés, oncocytaire, à cellules claires ou encore riche en lipides). (WHO Classification- 5th Edition, 2019)

Ce type de carcinome est associé à un taux de tumeurs de :

- 70-80% RE positif
- 10-15% HER2 positif
- 10-15% triples négatifs

B- Carcinome invasif lobulaire :

Il représente 10% à 15% des cancers du sein de morphologie multicentrique ou bilatérale, ce type de carcinome comprend plusieurs variantes pouvant être séparées en deux catégories :

- CIL classique : un cancer du sein invasif est composé de cellules dyscohésives pouvant êtres linéaire ou dispersées avec un grade nucléaire morphologique bas-intermédiaire et une activité mitotique basse avec des pertes d'E-Cadhérine, l'immunoréactivité RE est élevée et l'HER2 est négatif/non amplifié.

- CIL pléomorphe : grade nucléaire pléomorphe intermédiaire-élevé ou élevé. (WHO Classification- 5th Edition, 2019)

Ce type de carcinome est associé à un taux de tumeurs approximatif de 90% RE/ 5% HER2+/5% TN

C- D'autres sous-types :

- Carcinome tubulaire et Cribiforme : très bon pronostique RE positif/HER2 négatif
- Carcinome mucineux : RE positif/5% HER2 positif
- Cyctadénocarcinome mucineux : Triples négatifs/ quelques HER2 positif

- Carcinome micropapillaire : RE positif/ 20% HER2 positif

- Carcinome avec différenciation Apocrine : RE négatif /RO positif/HER2 négatif ou positif

- Carcinome Métaplasique (plusieurs sous-types) : Triples négatifs

- Tumeurs papillaires et neuroendocrines (pure) : RE positif /HER2 négatif (avec quelques HER2 positif).

Annexe 2

Classification de Sataloff :

- Tumeur primaire mammaire :
  - TA : effet thérapeutique total ou presque total
  - TB : effet thérapeutique de plus de 50 % mais pas total
  - TC : moins de 50 % d'effet thérapeutique
  - TD : pas d'effet thérapeutique.

  (Tableau I)

- Ganglions axillaires :
  - NA : évidence d'un effet thérapeutique, pas de maladie résiduelle
  - NB : pas de métastase ou d'effet thérapeutique
  - NC : évidence d'un effet thérapeutique mais métastase axillaire toujours présente
  - ND : métastase axillaire toujours présente et viable et pas d'effet thérapeutique.

  (Tableau II)

Tableau I : Réponse sur la glande mammaire

- TA : effet thérapeutique total ou pratiquement total
- TB : effet thérapeutique supérieur subjectivement à 50 %
- TC : moins de 50 % d'effet thérapeutique mais effet évident
- TD : pas d'effet thérapeutique

Tableau II : Réponse ganglionnaire

NA : effet thérapeutique évident, pas de métastases
NB : pas d'effet thérapeutique, pas de métastases
NC : aspects d'effet thérapeutique, mais présence de métastases
ND : pas d'effet thérapeutique, métastases viables

Annexe 3

Grade histologique :

Actuellement le grade le plus utilisé est celui de Scarff-Bloom et Richardson (SBR). (Bloom, H.J. et Richardson 1957).

Le grade prend en compte trois critères histologiques :

- Différenciation glandulaire (formation de tubule) :

- >75% = Score 1
- 10-75% = Score 2
- <10% = Score 3

Pléomorphisme (atypie nucléaire) :

- Cellules uniformes, régulières et petites = Score 1

- Augmentation modérée de la taille et variabilité nucléaire = Score 2

- Variation considérable = Score 3

Activité mitotique :

En fonction du nombre /mm2 = Score de 1 à 3

Le tableau ci-dessous représente le Grading SBR (Scarff-Bloom-Richardson) modifié par Elston et Ellis :

1. Différenciation tubulo-glandulaire : proportion de tubes ou glandes dans la tumeur (en % de surface tumorale)	**Score**
>75 % : tumeur bien différenciée	1
10 à 75 % : tumeur moyennement différenciée	2
<10 % : tumeur peu différenciée	3
2. Pléomorphisme nucléaire : degré d'atypie apprécié sur la population tumorale prédominante	
Noyaux petits, réguliers, uniformes	1
Pléomorphisme modéré	2
Variations marquées de taille, de forme, avec nucléoles proéminents	3
Nombre de mitoses (à compter sur 10 champs au grossissement x400 ; valeurs définies pour un champ de 0,48 mm de diamètre ; calibrage du microscope nécessaire pour des champs différents)	
0 à 6 mitoses	1
7 à 12 mitoses	2
>12 mitoses	3
AU TOTAL	
Grade I	3 ou 4 ou 5
Grade II	6 ou 7
Grade III	8 ou 9

Diamètre du champ (mm, objectif x40)	Surface pour 10 champs (mm2)
0,4	1,26
0,425	1,42
0,45	1,59
0,475	1,77
0,5	1,96
0,525	2,16
0,55	2,37
0,575	2,60
0,6	2,83
0,625	3,07
0,65	3,32
0,675	3,58
0,7	3,85

Annexe 4 :

Classification TNM 8ème édition 2017 :

La classification **TNM** permet de classer la tumeur en tenant compte de sa taille (T), l'existence d'un envahissement ganglionnaire (N), et l'existence de métastases (M).

1. **Taille tumorale (T) :**

Tx	Détermination de la tumeur primitive impossible.
T0	Pas de signe de tumeur primitive.
Tis	Carcinome *in situ.*
Tis (CCIS)	Carcinome canalaire *in situ.* Dans la classification 2017, le carcinome lobulaire *in situ* est considéré comme une lésion "bénigne" et est donc exclue de la classification pTNM.
Tis (Paget)	Maladie de Paget du mamelon sans tumeur décelable. *Note : une maladie de Paget avec tumeur décelable est à classer en fonction de la taille de la tumeur.*
T1	Tumeur ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension.
T1mic	Micro-invasion ≤ 0,1 cm dans sa plus grande dimension. *Note : La micro-invasion est une extension des cellules cancéreuses, au-delà de la membrane basale sans dépasser 0,1 cm. Quand plusieurs sites de micro-invasion existent, le plus important est pris en compte pour classer la micro-invasion (ne pas prendre en compte la somme des sites). La présence de multiples sites de micro-invasion doit être notée.*
T1a	0,1 cm < T ≤ 0,5 cm dans sa plus grande dimension. • *Pour les lésions entre 1 et 2 mm, il est recommandé, du fait de l'imprécision de la mesure, de la taille, de formuler le compte-rendu en disant que la tumeur avoisine les 2 mm.* • *Il est bien précisé que le plus grand diamètre du nodule principal doit servir à cette classification. En cas de petit(s) nodule(s) satellite(s), ces derniers ne doivent pas être ajoutés à la taille du nodule principal.* • *En cas de tumeurs multiples, le plus grand diamètre de la tumeur la plus volumineuse doit servir pour le pT. Les dimensions des autres tumeurs plus petites ne doivent pas être ajoutées à la taille du nodule principal.*
T1b	0,5 cm < T ≤ 1 cm dans sa plus grande dimension.
T1c	1 cm < T ≤ 2 cm dans sa plus grande dimension.
T2	Tumeur 2 cm < T ≤ 5 cm dans sa plus grande dimension.
T3	Tumeur >5 cm dans sa plus grande dimension.
T4	Tumeur de toute taille avec extension directe à la paroi thoracique (a) et/ou à la peau (b).
T4a	Extension à la paroi thoracique. *Note : la paroi thoracique comprend les côtes, les muscles intercostaux et le grand dentelé mais ne comprend pas le muscle pectoral.*
T4b	Œdème (y compris la « peau d'orange ») ou ulcération cutanée du sein ou nodules de perméation cutanés limités au même sein. *Il est précisé que l'atteinte cutanée uniquement visible microscopiquement, en l'absence d'ulcération ou de "peau d'orange" clinique, ne doit pas être classé comme T4b mais la tumeur doit être classée seulement en fonction de sa taille.*

T4c	A la fois 4a et 4b.
T4d	Carcinome inflammatoire. *Note : le carcinome inflammatoire du sein est caractérisé par une induration cutanée diffuse, d'aspect charnu, à bords érysipéloïdes, habituellement sans tumeur palpable sous-jacente. Si la biopsie de la peau est négative et s'il n'y a pas de cancer primitif localisé, mesurable, un carcinome inflammatoire clinique (T4d) est classé pTX sur le plan histopathologique.*

2- Envahissement ganglionnaire (N) :

Nx	Appréciation impossible de l'atteinte ganglionnaire (du fait, par exemple, d'une exérèse antérieure).
N0	Absence de signe d'envahissement ganglionnaire régional.
N1	Ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux mobiles.
N2	Métastases dans un ou plusieurs ganglions axillaires de niveau I et II homolatéraux fixé(s) ou confluent(s) ou dans un ou plusieurs ganglions mammaires internes homolatéraux cliniquement détectables en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement évidente.
N2a	Métastases dans un ou plusieurs ganglion(s) axillaire(s) fixé(s) entre eux (confluents) ou à d'autres structures.
N2b	Métastases cliniquement détectables uniquement dans les ganglions mammaires internes, et en l'absence de métastase ganglionnaire axillaire cliniquement décelable.
N3	Métastases dans les ganglions sous-claviculaires homolatéraux (niveau III) avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire (niveau I, II) ou métastase ganglionnaire mammaire interne homolatérale cliniquement détectable en présence de métastase axillaire (niveau I, II) cliniquement évidente ; ou métastases ganglionnaires sous-claviculaires homolatérales avec ou sans envahissement ganglionnaire axillaire ou mammaire interne.
N3a	Métastase(s) ganglionnaire(s) sous-claviculaire(s).
N3b	Métastases ganglionnaires mammaires internes et axillaires.
N3c	Métastase(s) ganglionnaire(s) sus-claviculaire(s).

3- L'existence de Métastases (M) :

MX	Renseignements insuffisants pour classer les métastases à distance
M0	Absence de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance

Annexe 5 :

Technique d'immuno-histochimie automatisée :

Les tests seront réalisés par l'automate (VENTANA)

A- Protocole d'utilisation :

1- Activer les stations de mixage

2- Chauffer la lame à 75 degrés et incuber 4minutes (Etuvage)

3- Désactiver les stations de mixage

4- Régler la température à 72° C par défaut

5- Chauffage des lames à 72°C à partir de températures moyennes (déparaffinage)

6- Incuber 4minutes

7- Déposer/ ajuster volume EZ prep

8- Rincer la lame avec EZ Prep

9- Déposer/ajuster volume EZ Prep

10- Déposer l'huile de paraffine

11- Rincer la lame avec EZ Prep

12- Déposer/ ajuster volume EZ Prep

13- Déposer l'huile de paraffine

14- Rincer la lame avec EZ Prep

15- Déposer Depar volume adjust

16- Déposer l'huile de paraffine

17- Activer les stations mixage

18- Chauffage des lames désactivé

19- Point de pause (8minutes)

20- Rincer la lame avec EZ Prep

21- Déposer Cell Conditioner #1 long

22- Appliquer CC coverslip long

23- Régler la température à 95°C par défaut

24- Chauffer la lame (95°C) et incuber 8minutes avec le tampon CC1 (Cell Conditionner #1)

25- Déposer le CC1

26- Appliquer CC coverslip moyen Pas BB

27- Appliquer CC1 court

28- Appliquer CC coverslip moyen Pas BB

29- Chauffage des lames désactivées

30- Incubation pendant 8minutes

31- Rincer la lame avec reaction buffer

32- Déposer l'huile de paraffine

33- Rincer avec la réaction buffer

34- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

35- Déposer l'huile de paraffine

36- Point de pause

37- Chauffage des lames jusqu'à 36°C

38- Rincer la lame avec réaction buffer

39- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

40- Déposer une goutte de UV INHIBITOR, déposer l'huile de paraffine et incuber 4minutes

41- Rincer la lame avec réaction buffer

42- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

43- Déposer l'huile de paraffine

44- [Hand apply] anticorps primaire et incuber 16minutes

45- Rincer la lame avec réaction buffer

46- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

47- Déposer l'huile de paraffine et chauffer à 36°C

48- Rincer la lame avec réaction buffer

49- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

50- Déposer une goute de UV HRP (AC II) UNV MULT, déposer l'huile de paraffine et incuber 8minutes

51- Rincer la lame avec réaction buffer

52- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

53- Déposer l'huile de paraffine

54- Rincer la lame avec réaction buffer

55- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

56- Déposer une goutte de UV DAB et une goutte de UV DAB H2O2, déposer l'huile de parffine et incuber 8minutes

57- Rincer la lame avec réaction buffer

58- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

59- Déposer une goutte de UV COPPER, déposer l'huile de paraffine et incuber 4minutes

60- Rincer la lame avec réaction buffer

61- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

62- Déposer une goutte de HEMATOXYLIN [contre-coloration], appliquer coverslip et incuber 8minutes

63- Rincer la lame avec réaction buffer

64- Ajuster le volume sur la lame avec réaction buffer

65- Déposer l'huile de paraffine

66- Rincer la lame avec réaction buffer

67- Déposer l'huile de paraffine

68- Chauffage des lames désactivé

69- Rrincer la lame avec réaction buffer.