

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

**Étude moléculaire du cancer broncho-pulmonaire
dans la région de Constantine
(Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)**

Présenté et soutenu par : FRIGAH KHAOULA

Le : 29/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Gharzouli Razika* (Docteur - UFM Constantine).

Rapporteur : *Rezgoune Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine).

Examineurs : *Benlatreche Moufida* (MA.A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale**

Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : Génétique Moléculaire

Intitulé :

**Étude moléculaire du cancer broncho-pulmonaire
dans la région de Constantine
(Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)**

Présenté et soutenu par : *FRIGAH KHAOULA*

Le : 29/06/2015

Jury d'évaluation :

Président du jury : *GHAZOU LI RAZIKA* (Docteur - UFM Constantine).

Rapporteur : *REZGOUNE MOHAMED LARBI* (MA.A - UFM Constantine).

Examineurs : *BENLATRECHE MOUFIDA* (MA.A - UFM Constantine).

*Année universitaire
2014 - 2015*

Remerciements

Mes remerciements vont en premiers lieu au bon dieu tout puissant de me donner la force pour survivre ; ainsi que la volonté pour dépasser toutes les difficultés et de m'avoir aidés à réaliser ce travail.

Remerciements

Je tiens à remercier très sincèrement le professeur **Mme SATTI DALILA**, responsable de la filière de la génétique d'avoir me donner la chance pour continuer mes études au sein de son spécialité que j'ai eu un grand plaisir de travailler sous sa direction.

Au professeur **ABADI N** directeur du laboratoire de Biochimie et du laboratoire de Biologie et Génétique (CHU Constantine) qui nous ont ouvert les portes des structures dont ils avaient la responsabilité et qui ont tous mis à notre disposition pour nous permettre de travailler dans les meilleures conditions.

Au terme de ce travail, je tiens à exprimer toutes mes profondes gratitude et remerciements à mon encadreur **Mr REZGOUNE MOHAMED LARBI**, pour avoir accepté la responsabilité de diriger ce travail malgré ces nombreuses obligations. Merci pour ses conseils avisés, son aide, sa gentillesse, ses encouragements et sans qui ce mémoire n'aurait j'aimais vu le jour.

Mes vifs remerciements à **Mme REZGOUNE DJALILA** pour son aide précieux lors de la réalisation de la partie pratique

Je tiens à remercier les membres du jury qui m'ont fait l'honneur d'examiner ce travail :

Mes remerciements et gratitude à **Mme GHARZOULI RAZIKA** d'être le président du jury et d'avoir accepté d'évaluer mon travail.

Je remercie également **Mlle BENLATRECHE MOUFIDA**, d'avoir accepté de faire partie du jury et d'examiner mon travail. Merci pour sa gentillesse et encouragement.

Merci également à **Mme BOUDOKHANE IBTISSEM** pour son aide, ses conseils.

Mes sincères remerciements à notre chef de département **Mr MADACI.B** pour sa gentillesse et son dévouement et à **Mme ZIADA HADIA** et **Mme TEBIBEL SORAYA** pour leurs soutiens.

Mes remerciements vont également vers toute l'équipe du CAC de CHU Constantine et l'équipe de laboratoire de biochimie et hormonaux et à tous les doctorantes.

Mes sentiments de reconnaissance et mes remerciements vont également à l'ensemble de tous mes enseignants qui ont contribué dans notre formation le long de mon parcours pédagogique.

Enfin Merci à toute personne qui a participé de près ou de loin directement ou indirectement à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail à :

À la mémoire de mon très cher papa **ABDELAZIZ**

Je ne saurais exprimer mon grand chagrin en ton absence .j'aurais aimé que tu sois a mes cotés ce jour.

À celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur et ma réussite, à ma mère **FAHIMA**.

À mes sœurs : **IMENE, ESMA, OUASSILA** et mes frères **ANOUAR** et le petit **OUSSAMA** que dieu les préserve.

A mon neveu, le petit prince **ISLEM**.

À mes intimes : **AYA SALAH-AIECH** et **BOUTHAINA MEBARKI**. Merci pour leur amitié, leur amour et surtout pour leur fidélité.

A ma tante **HOURIA AMIRECHE**.

À mon oncle **HACENE** et à mon cousin **CHAMS EL DINE**.

A toute ma **FAMILLE**.

À Melle **BOUZID NESRINE** qui m'a beaucoup encouragé et aidé de toutes les manières possibles dans la réalisation de ce travail.

Abréviations

ADC : ADénoCarcinome
ADN : Acide DésoxyriboNucléique
AKT ou (**PKB**) « Protéine Kinase B »
ATP : Adénosine triphosphate
BCL2 : B-Cell Lymphoma protein 2
BER : Base Excision Repair
BET : Bromure d'ETHidium
CBNPC : Cancer bronchique non-à petites cellules
CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire
CBPC : Cancer bronchique à petites cellules
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CHU : Centre Hospitalier Universitaire
CpG : Dinucléotide CG
dNTP : désoxyriboNucléotides TriPhosphates
EDTA : Ethylene Diamino Tetra-acetic Acid
EGF : Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
ErbB : Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2
ERK : Extracellular signal-regulated kinase
ERK1/2 : Extracellular signal-regulated kinase
EMLK4 : echinoderm microtubule-associated protein-like 4
FAD : Flavine Adénine Dinucléotide
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
FHIT : Fragile Histidine Triad gene
IC : Intervalle de confiance
GTP : guanosine-5'-triphosphate
GDP : guanosine-5'-diphosphate
HAP : Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
HDAC : Histone DÉAcétylase
HDM2 : Human Double Minute
HGF : Hepatocyte growth factor
HER : Human Epidermal growth factor Receptor
Hinf I : *Haemophilus Influenzae*
K-RAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH : Loss Of Hetrozygoty
MAPK : Mitogen-activated protein kinase
MDM2 : Murin Double Minute 2
MTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
MET : Met proto-oncogene tyrosine kinase (hepatocyte growth factor receptor)
MEN1 : Multiple Endocrine Neoplasia type 1
MEK : Map kinase ERK activating Kinase
MTHFR : Méthylène Tetra Hydro Folates Réductase
MYC : MYeloCytomatosis oncogene
NADPH : Nicotinamide Adénosine Dinucléotide Phosphate
NER : Nucleotide Excision Repair
Oligo F : Forward primer

Oligo R : Reverse primer
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
P14 ARF : Alternate Reading Frame protein product
P16 : Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
P53 : Protein 53
PCR : Polymerase Chain Reaction
PI3K : Phosphoinositide 3-kinase
PK : Protéinase K
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog
RAS : RA_t Sarcoma viral oncogene homolog
RASSF1 : Ras association domain family member 1
RB : RetinoBlastoma
RFLP : Restriction Fragment Length Polymorphism
ROS : Reactive Oxygen Species
SAHA : SuberoylAnilide Hydroxamic Acid
SCC : Squamous Cell Carcinoma
SCLC : Small Cell Carcinoma
SDS : Sodium Dodécyl Sulfate
SEMA3B : SEMAphorin-3B
TBE : Tris, Borate, EDTA
TE : Tris EDTA
TGF : Transforming Growth Factor
TGF α : Transforming Growth Factor-alpha
TKI : Tyrosine Kinase Inhibitor
TNM : Tumor Node Metastasis
UTR : UnTRanslated Region
VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

Table des matières

Introduction

1

Partie bibliographique

Chapitre I : Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire

I-	Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire	2
I-1-	Les voies aériennes supérieures	2
I-1-1-	Les fosses nasales	2
I-1-2-	Le pharynx	2
I-2-	L'appareil broncho-pulmonaire	2
I-1-3-	Le larynx	2
I-1-4-	La trachée	3
I-1-5-	Les bronches	3
I-1-6-	Les poumons	3
I-1-7-	Le diaphragme	3
II.	La physiologie respiratoire	4
2-1-	Les phénomènes mécaniques de la respiration	5
2-2-	phénomènes chimiques de la respiration.....	6
2-2-1-	Les échanges gazeux	6
2-2-2-	Le transport des gaz.....	6

Chapitre II : Classification des cancers du poumon

I.	Définition	7
II.	Classification histologique.....	7
2-1-	Les caractéristiques histologiques des cancers bronchiques.....	7
2-1-1-	La muqueuse bronchique normale et ses différents types cellulaires.....	7
2-1-2-	Les cellules impliquées dans la carcinogénèse bronchique.....	7
2-1-3-	Principales caractéristiques de la cellule transformée.....	8
2-2-	Histo-pathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires.....	9
2-2-1-	Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)	10
2-2-2-	Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC).....	11
III.	Épidémiologie.....	18
3-1-	Épidémiologie descriptive	18
3-2-	Épidémiologie analytique	19

Chapitre III : Diagnostic et traitement

I.	Les signes cliniques.....	21
II.	Diagnostic.....	21
2-1-	Le bilan diagnostique.....	21
2-2-	Le bilan d'extension.....	21
III.	Traitements.....	22

3-1- Chimiothérapie.....	22
3-2- Radiothérapie.....	23
3-3- Autres traitements	23

Chapitre 4 : oncogenèse des cancers broncho pulmonaires

I. Les différentes étapes de l'oncogenèse.....	24
II. Les altérations géniques.....	24
2-1- Les oncogènes.....	25
2-2- Les gènes suppresseurs de tumeur	30
2-3- Les gènes de réparation	33
2-4- Pertes d'allèles en 3p.....	34
2-5- L'instabilité génique.....	34
2-6- Activation de la télomérase.....	34
2-7- Modifications épigénétiques	34
III. <i>MTHFR</i> et polymorphisme génétique C677T.....	35
3-1- Structure et localisation du gène <i>MTHFR</i>	35
3-2- Structure et fonction de la protéine <i>MTHFR</i>	35
3-3- Polymorphismes du gène <i>MTHFR</i>	36

Partie pratique

Patients et méthodes

1- Le prélèvement sanguin	38
2- Étiquetage.....	38
3- Extraction d'ADN	38
4- Génotypage de la <i>MTHFR</i>	41

Résultats

1- Étude du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i>	46
Discussion.....	49
Conclusion et perspectives.....	57
Références bibliographiques.....	58

Annexes

Liste des figures

Figure 01 : Anatomie de l'appareil respiratoire	2
Figure 02 : La structure des poumons	4
Figure 03 : La physiologie de l'inspiration	5
Figure 04 : La physiologie de l'expiration	5
Figure 05 : Les échanges gazeux alvéolaires	6
Figure 06 : Hypothèses actuelles concernant l'origine cellulaire des différents types histologiques de cancers bronchiques	8
Figure 07 : Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse : exemple des CBNPC	9
Figure 08 : Histo pathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires	9
Figure 09 : Carcinome à petites cellules	10
Figure 10 : Adénocarcinome acinaire	12
Figure 11 : Adénocarcinome papillaire	12
Figure 12 : Adénocarcinome solide à sécrétion intracellulaire de mucus	13
Figure 13 : Carcinome bronchiolo alvéolaire	13
Figure 14 : Carcinome malpighien bien différencié	14
Figure 15 : Carcinome neuroendocrine à grandes cellules	15
Figure 16 : Carcinome basaloïde	16
Figure 17 : Les tumeurs carcinoïdes typiques	17
Figure 18 : Les tumeurs carcinoïdes atypiques	17
Figure 19 : Description moléculaire des étapes de la carcinogénèse bronchique	24
Figure 20 : Chronologie d'apparition des anomalies génétiques et moléculaires au cours du développement des différents carcinomes pulmonaires, à petites cellules (BCPC) et non à petites cellules (BCNPC)	24
Figure 21 : Les voies de transduction du signal sous-jacentes à l' <i>EGFR</i> sont la voie <i>RAS/MAPK</i> et la voie <i>PI3K/AKT</i> .	25
Figure 22 : Mutations de l' <i>EGFR</i> dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules	26
Figure 23 : Réactions catalysées par la <i>MTHFR</i>	36
Figure 24 : Répartition des différents génotypes de la <i>MTHFR</i> pour les patients et les témoins	47
Figure 25 : Répartition des deux allèles de la <i>MTHFR</i> pour les patients et les témoins	47
Figure 26 : Représentation graphique des fréquences génotypiques (CC, CT et TT) d'études menées sur l'association du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats	55
Figure 27 : Représentation graphique des fréquences alléliques (C et T) d'études menées sur l'association du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats	56

Liste des photos

Photo 1 : Tube Falcon de 50 ml (sang +TE)	38
Photo 2 : Le culot leucocytaire (1)	38
Photo 3 : 25 ml de TE + culot	39
Photo 4 : Le culot leucocytaire (2)	39
Photo 5 : Tube conique (culot leucocytaire+tampon de lyse +SDS+PK)	40
Photo 6 : La pelote d'ADN.	40
Photo 7 : La mise de la pelote dans le tube Eppendorfs.	41
Photo 8 : Profil type de restriction (les 3 géotypes possibles) de la <i>MTHFR</i> par l'enzyme de restriction <i>HinfI</i>	44
Photo 9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène de la <i>MTHFR</i> par <i>HinfI</i> de nos patients.	46

Liste des tableaux

Tableau I : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i> .	42
Tableau II : Amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 4 de la <i>MTHFR</i> .	42
Tableau III : Programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification de l'amplification.	43
Tableau IV : Tableau de contingence croisé pour une étude cas-témoins	45
Tableau V : Résultats du géotypage de la <i>MTHFR</i> pour notre cohorte (patients et témoins)	46
Tableau VI : Étude statistique de l'effet du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> dans la survenue du cancer broncho-pulmonaire.	48
Tableau VII : Liste des publications (PubMed) sur l'association du polymorphisme C677T de la <i>MTHFR</i> est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats.	54

Maladie encore rare au début du XX^{ème} siècle, le cancer du poumon primitif est, de longue date, la première cause de mortalité par cancer aussi bien dans les pays développés que dans les pays en voie de développement. Son incidence mondiale était estimée en 2008 à 1,61 millions de cas et le nombre de décès à 1,38 millions soit 18,2% des décès par cancer [1].

Le cancer bronchique est un véritable problème de santé publique. Il représente 12,3% des nouveaux cas de cancer diagnostiqués chaque année. C'est le 2^{ème} cancer chez l'homme et le 4^{ème} chez la femme [2].

Sur le plan histologique, on distingue 2 types principaux : les Cancers Bronchiques à Petites Cellules (CBPC), 15% des cas et les Cancers Bronchiques Non à Petites Cellules (CBNPC), plus de 80% des cas. [3]

La cause la plus fréquente de cancer du poumon est l'exposition chronique à la fumée de tabac, y compris au tabagisme passif. Le tabagisme actif est responsable de 90 % des cancers bronchiques chez les hommes et de 60 % chez les femmes [4]. L'incidence du cancer du poumon chez les non-fumeurs, qui représentent environ 15 % des cas, est souvent attribuée à une combinaison de facteurs génétiques (gènes qui participent aux mécanismes de carcinogenèse, de contrôle de la croissance cellulaire, et de la réparation d'Acide Désoxyribo-Nucléique (ADN), au radon dans l'air, à l'amiante, et à la pollution de l'air.

Diverses études sont intéressées au métabolisme des folates et plus particulièrement à la MéthylèneTétra-Hydro-Folates Réductase (*MTHFR*); enzyme clé de ce métabolisme, et indiquent que le polymorphisme C677T de la *MTHFR* pourrait être un facteur de risque de cancer du poumon.

Notre travail de recherche vise à :

- Faire un travail de recherche bibliographique exhaustive sur l'aspect biologique et génétique (altérations géniques rencontrées et gènes impliqués) du cancer broncho-pulmonaire.
- Explorer, par une étude cas-témoins, l'association possible entre le variant C677T du gène de la *MTHFR* et le risque de cancer du poumon chez les patients recrutés au service d'oncologie médicale du Centre Anticancéreux de Constantine (CAC). Cela se fait par le génotypage par biologie moléculaire (Polymérase Chain Reaction (PCR)/Digestion).

Partie Bibliographique

Chapitre 1

Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire

I. Anatomie et physiologie de l'appareil respiratoire

Anatomiquement l'appareil respiratoire se divise en deux parties séparées par le pharynx : les voies aériennes supérieures et l'appareil broncho-pulmonaire (voies aériennes inférieures). « Figure 1 ». [5]

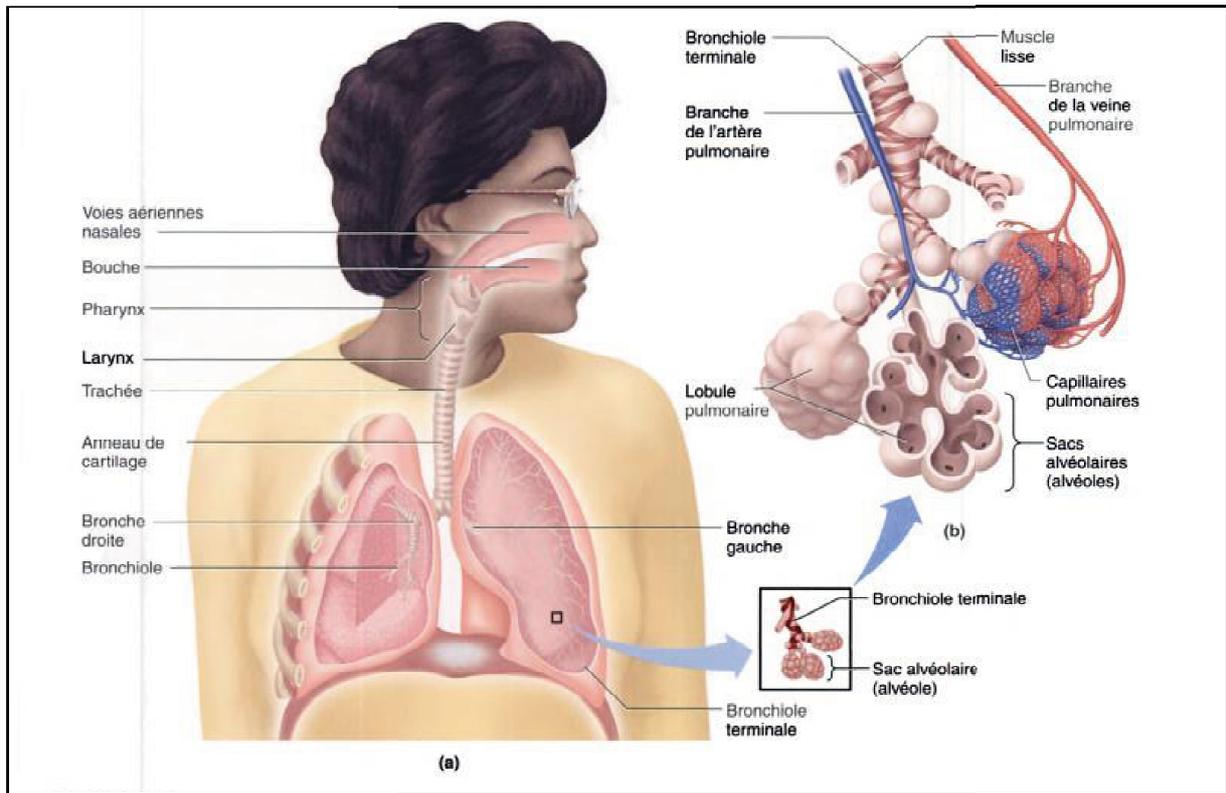


Fig.1 : Anatomie de l'appareil respiratoire. [6]

1.1. Les voies aériennes supérieures

1.1.1. Les fosses nasales : sont deux couloirs parallèles, horizontaux, à direction antéropostérieure, creusés dans le massif facial et protégés par l'auvent de la pyramide nasale.

1.1.2. Le pharynx : est un conduit faisant communiquer la bouche et l'œsophage d'une part, les fosses nasales et le larynx d'autre part. [3]

1.2. L'appareil broncho-pulmonaire : L'appareil broncho-pulmonaire commence au larynx qui se poursuit à l'intérieur du thorax par la trachée avant de se diviser de nombreuses fois en voies aériennes de plus en plus petites jusqu'aux alvéoles.

1.2.1. Le larynx : est un tube creux, intercalé entre le pharynx et la trachée et différencié en vue de la phonation.

- 1.2.2. La trachée :** est un conduit fibro-cartilagineux qui fait suite au larynx et donne naissance aux bronches.
- 1.2.3. Les bronches :** sont deux conduits nés par bifurcation de la trachée. Elles se dirigent en dehors et en bas et atteignent les poumons au niveau du hile. Elles pénètrent dans les poumons, accompagnées des artères et veines pulmonaires, l'ensemble constituant les pédicules pulmonaires. La bronche droite est plus verticale, plus courte et plus grosse que la gauche. Au niveau du hile, chacune des bronches se divise en autant de bronche secondaire que le poumon comporte de lobes : trois à droite, deux à gauche. Les bronches secondaires se divisent à leur tour en rameaux bronchiques de plus en plus ténus, les bronchioles. [7] Celles-ci se prolongent par les conduits alvéolaires auxquels font suite les sacs alvéolaires et les alvéoles. L'ensemble de toutes ces arborescences forme l'arbre bronchique. [8]
- 1.2.4. Les poumons :** Ce sont deux organes mous, spongieux et élastique qui occupent la presque totalité de la cage thoracique. Ils sont situés de part et d'autre du médiastin. La face interne de chaque poumon porte une dépression, le hile pulmonaire, dans lequel pénètrent les bronches souches, les vaisseaux sanguins et lymphatiques et les nerfs. Les poumons sont vascularisés par les artères pulmonaires qui vont se ramifier pour donner naissance aux réseaux capillaires pulmonaires qui entourent les conduits alvéolaires et les alvéoles. Les poumons sont divisés en lobes par des scissures. Le poumon droit possède trois lobes, le poumon gauche n'en possède que deux. Chaque lobe est ensuite divisé en segments. « Figure 2 » [8]
- 1.2.5. Le diaphragme :** il s'agit d'une lame musculaire séparant les organes thoraciques et les organes abdominaux. C'est le muscle inspiratoire majeur. [8]

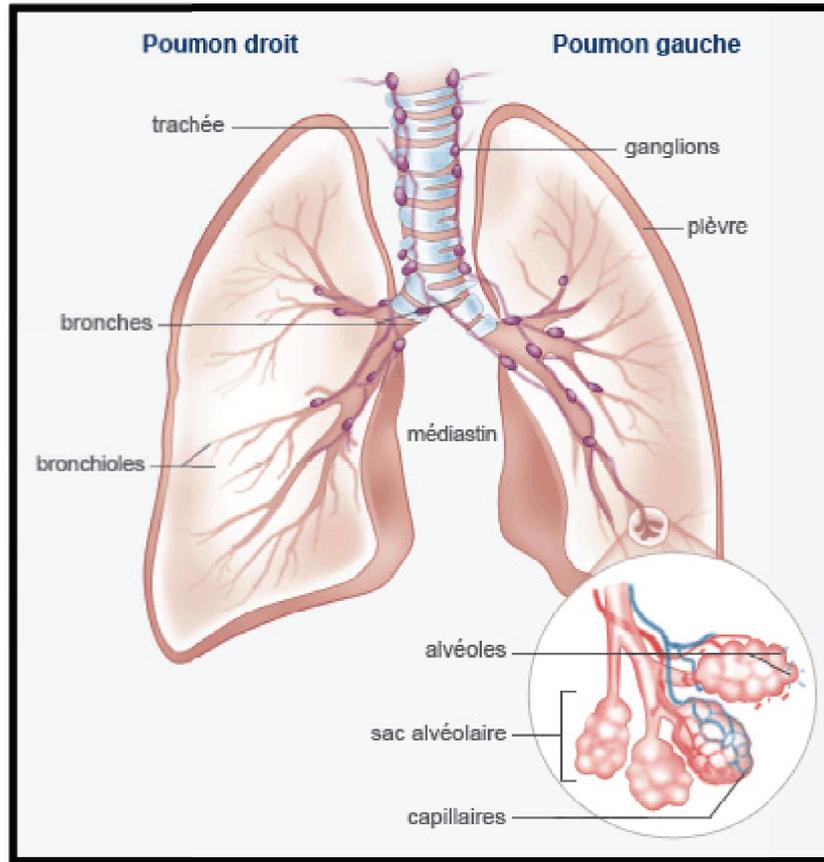


Fig.2 : La structure des poumons. [9]

II. La physiologie respiratoire : La respiration comprend deux ordres de phénomènes : des phénomènes mécanique, les mouvements respiratoires, et des phénomènes chimiques, les échanges gazeux au niveau des poumons et des tissus. [7]

2.1.Les phénomènes mécaniques de la respiration : la ventilation pulmonaire : La ventilation est un processus mécanique par lequel l'air entre et sort du poumon. Il existe deux temps respiratoires :

L'inspiration : C'est un processus actif dans lequel le volume thoracique est augmenté par la contraction des muscles inspireurs et notamment du diaphragme. En se contractant, le diaphragme s'abaisse et s'aplatit donnant de l'espace aux poumons pour se remplir.

Parallèlement, les muscles intercostaux externes se contractent pour élever la cage thoracique et pousse le sternum vers l'avant : le volume thoracique augmente. « Figure 3 » [8]

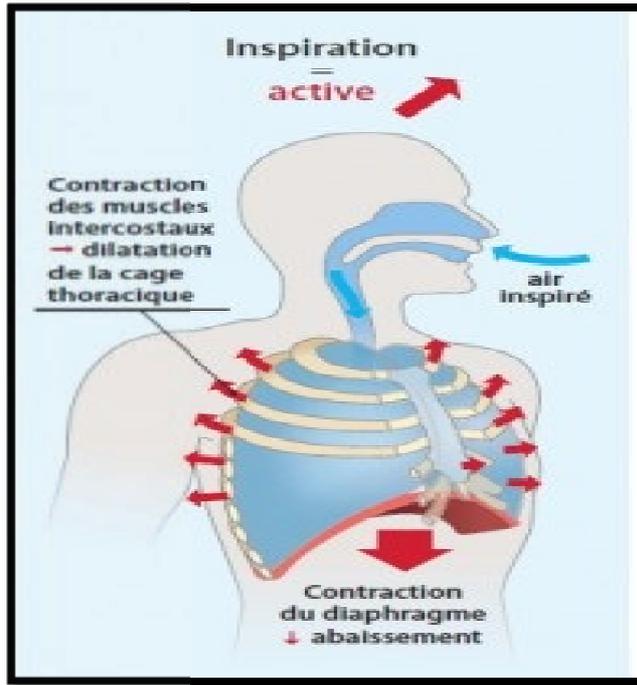


Fig. 3 : La physiologie de l'inspiration. [10]

L'expiration : C'est un phénomène passif qui repose plus sur l'élasticité naturelle des poumons que sur la contraction musculaire. À mesure que les muscles inspiratoires se relâchent, la cage s'abaisse et les poumons retrouvent leur forme initiale. « Figure 4 » [8]

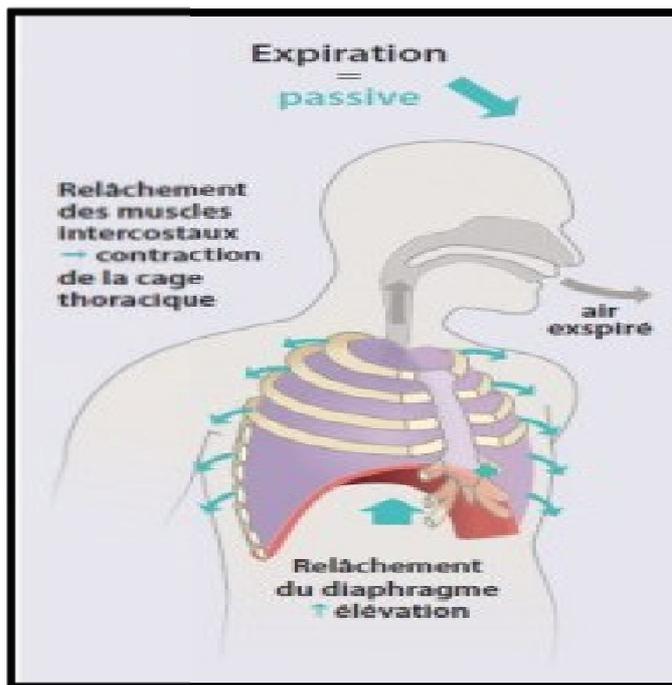


Fig.4 : La physiologie de l'expiration. [11]

2.2. Les phénomènes chimiques de la respiration

2.2.1. Les échanges gazeux

Pour fonctionner correctement, les cellules de l'organisme ont notamment besoin d'oxygène (O_2). Lorsque la cellule "travaille", elle produit des déchets dont le dioxyde de carbone (CO_2). Le sang se charge de transporter ces deux gaz, le premier (O_2) des poumons vers les cellules, le second (CO_2) en sens inverse. L'oxygène est transporté par la circulation artérielle, le dioxyde de carbone par la circulation veineuse. « Figure 5 » [8]

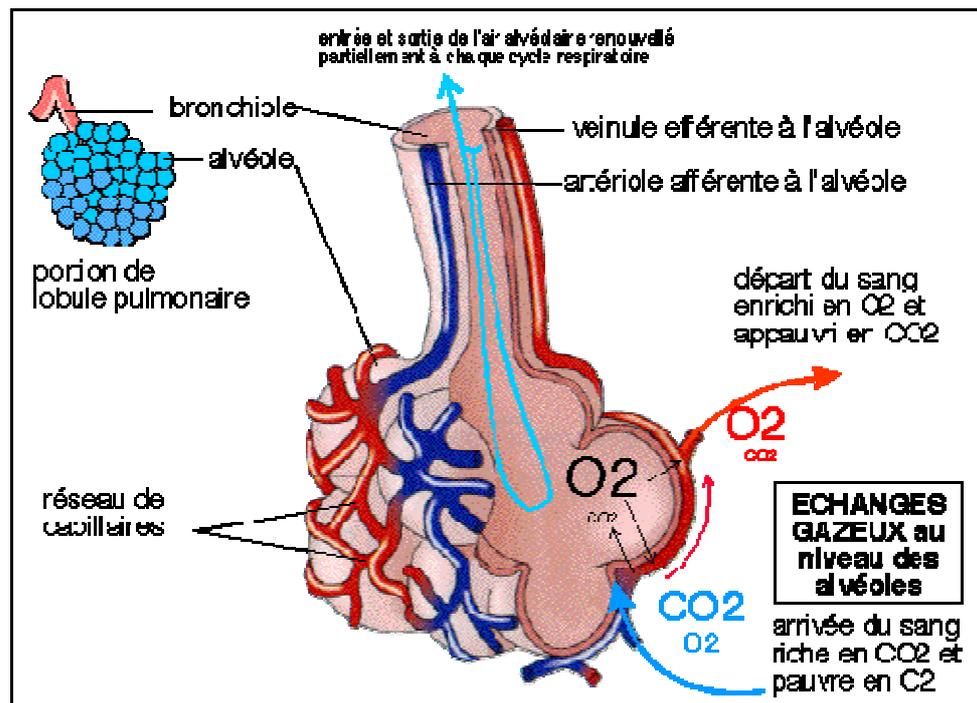


Fig.5 : Les échanges gazeux alvéolaires. [12]

2.2.2. Le transport des gaz

La plus grande partie de l'oxygène est transporté vers les tissus et les cellules, combinée à l'hémoglobine des globules rouges tandis qu'une petite quantité (1,5%) est dissoute dans le plasma. Le transport de dioxyde de carbone dans le sang se fait sous trois formes : dissous dans le plasma, combiné à l'hémoglobine et sous forme d'ions bicarbonates.

L'oxygène présent dans les alvéoles pulmonaire est capté par les capillaires alvéolaires lors des échanges gazeux puis dirigé vers le cœur gauche pour être distribué à l'ensemble des cellules et tissus de l'organisme.

Le dioxyde de carbone résultant du métabolisme repart dans la circulation veineuse (cœur droit) jusqu'aux capillaires alvéolaires pour être éliminé lors des échanges gazeux, puis sera expiré. [8]

Partie Bibliographique

Chapitre 2

Classification des cancers du poumon

I. Définition

Le cancer du poumon ou cancer bronchique est une maladie due à une croissance cellulaire chaotique dans les tissus du poumon. Cette croissance peut donner des métastases, qui sont l'invasion de tissus adjacents ou l'infiltration en dehors des poumons. La grande majorité des cancers du poumon primaires sont des carcinomes du poumon, qui proviennent des cellules épithéliales. [13]

II. Classification histologique**2.1. Les caractéristiques histologiques des cancers bronchiques****2.1.1. La muqueuse bronchique normale et ses différents types cellulaires**

Tout l'arbre respiratoire, du larynx sous-glottique jusqu'aux bronchioles terminales, est tapissé par un revêtement respiratoire pseudo stratifié cilié associant trois types cellulaires principaux : des cellules épithéliales ciliées, des cellules muco-sécrétantes et des cellules basales. [14]

L'histologie de l'arbre bronchique et pulmonaire se caractérise par le passage progressif d'un type d'épithélium à l'autre au fur et à mesure des ramifications. L'épithélium de type trachéal, pseudo-stratifié, cilié et contenant des cellules caliciformes, devient de moins en moins haut dans les bronches segmentaires pour céder la place, dans les bronchioles terminales, à un épithélium cylindrique simple, dépourvu de cellules caliciformes et caractérisé par un type cellulaire spécialisé, la cellule de Clara. Les bronchioles terminales s'ouvrent sur les alvéoles pulmonaires, tapissées de pneumocytes de type I et II. [15]

2.1.2. Les cellules impliquées dans la carcinogénèse bronchique

Toutes les cellules capables de se diviser sous l'effet d'un processus d'agression chronique ou du fait d'agents carcinogènes peuvent proliférer et devenir néoplasiques. Les cellules capables de se diviser sont les cellules basales, les cellules à petits grains de mucus, les cellules neuroendocrines, les cellules de Clara, et les pneumocytes de type 2. « Figure 6 » [16]

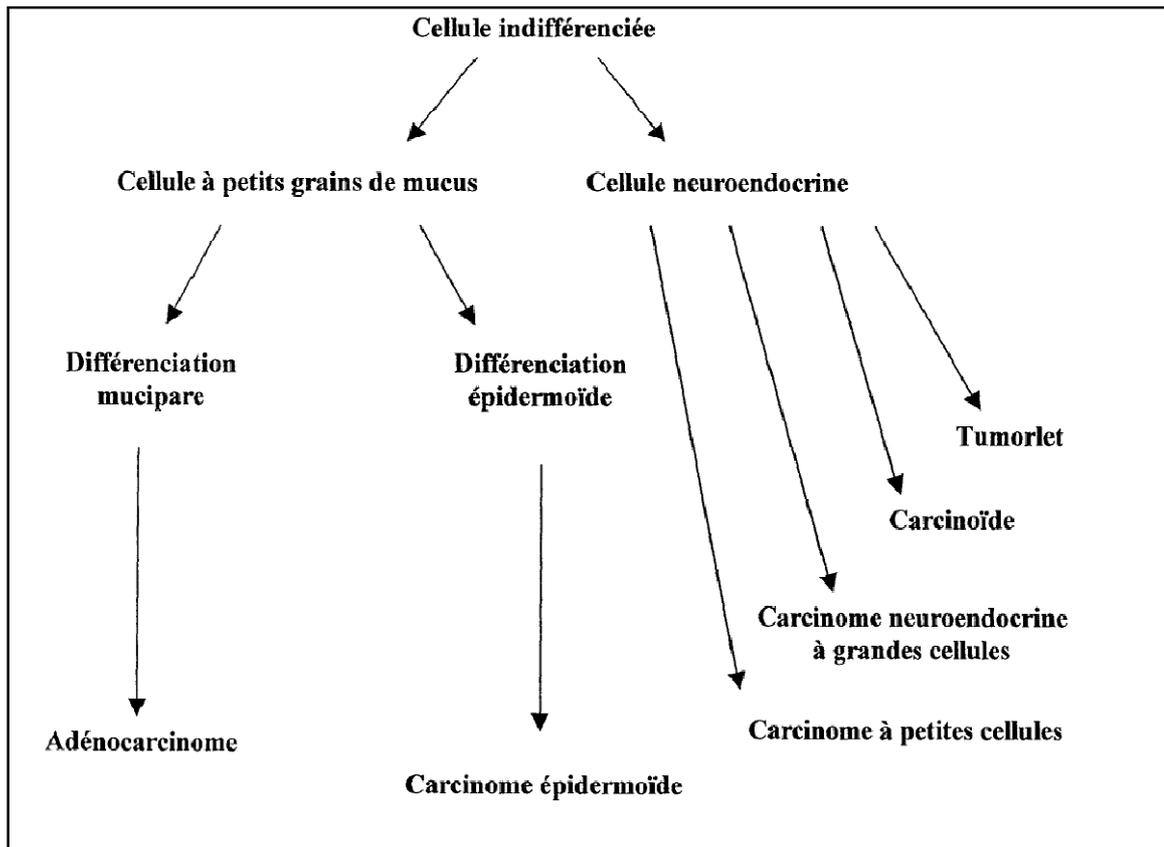


Fig.6: Hypothèses actuelles concernant l'origine cellulaire des différents types histologiques de cancers bronchiques. [16]

2.1.3. Principales caractéristiques de la cellule transformée

Pour se prévaloir d'un statut transformé une cellule doit posséder un certain nombre de caractéristiques. Six propriétés élémentaires vont en faire une cellule tumorale. « Fig7 »

1. l'indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance
2. L'insensibilité aux signaux antiprolifératifs
3. L'acquisition d'une résistance à l'apoptose
4. Le potentiel répliatif illimité
5. La stimulation de l'angiogenèse
6. Phénotype invasif et métastasant [15]

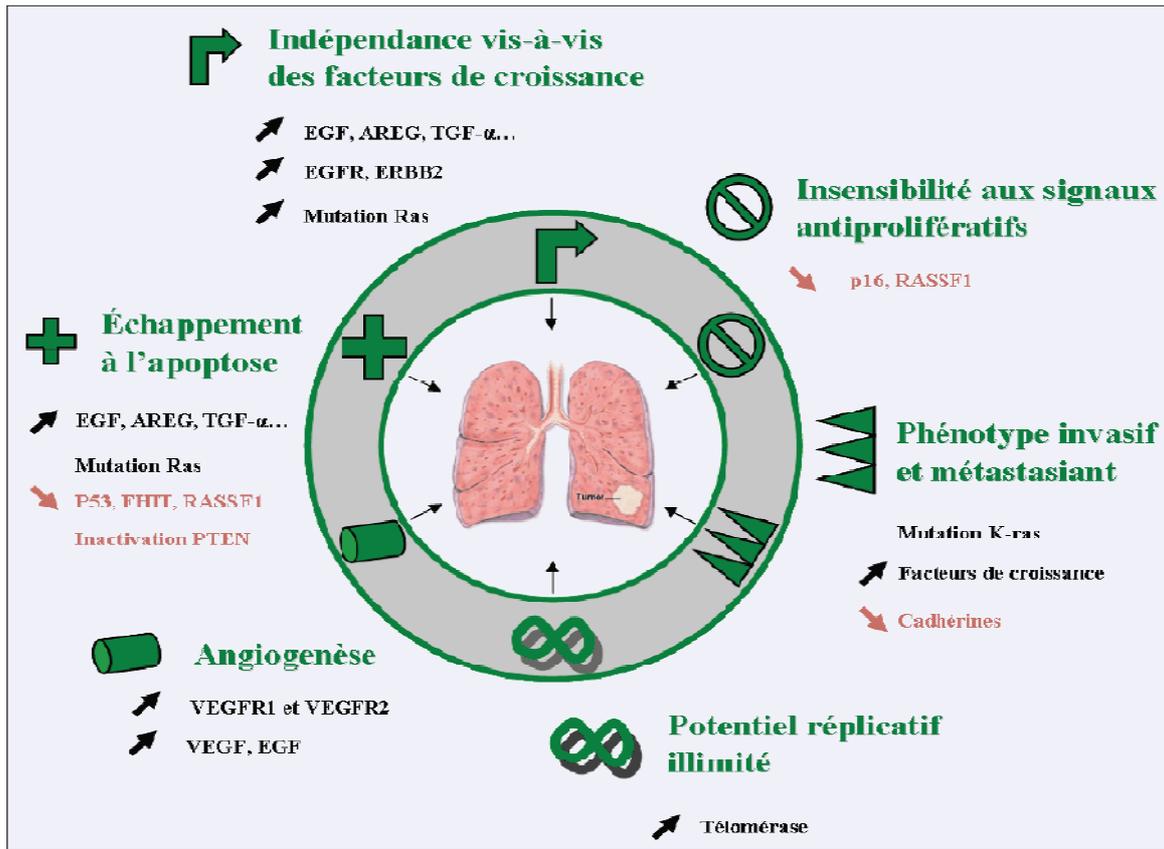


Fig.7 : Les six propriétés élémentaires de la cellule cancéreuse : exemple des CBNPC. [15]

2.2.Histo-pathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires

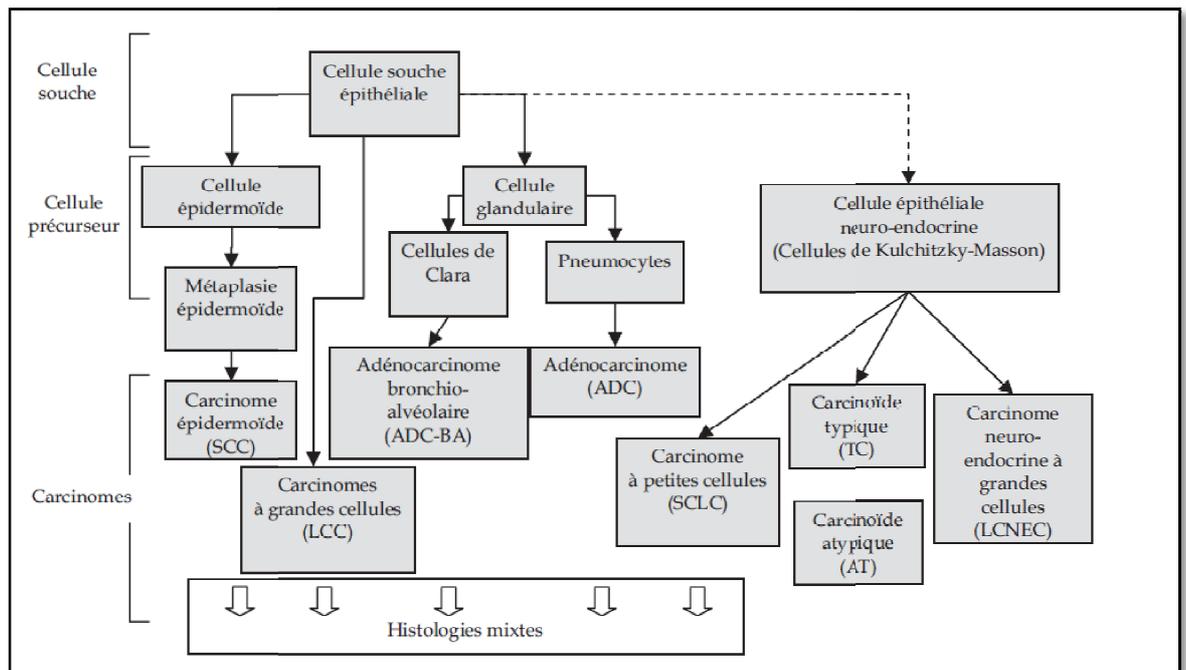


Fig.8 : Histo-pathogénèse des carcinomes broncho-pulmonaires [15]

Les cancers du poumon sont classés en deux grandes catégories : les carcinomes dits « non -à petites cellules » (CBNPC), qui dérivent des cellules souches épithéliales de la muqueuse broncho-pulmonaire, et les carcinomes dits « à petites cellules » (CBPC) qui regroupent plusieurs catégories de cancers présentant des caractéristiques morphologiques, histologiques et ultra-structurales communes, dont en particulier la présence de granules neuro-sécréteurs et une importante activité mitotique. « Figure 8 » [15]

2.2.1. Le cancer bronchique à petites cellules (CBPC)

Le CBPC est une tumeur maligne épithéliale neuroendocrine de haut grade de malignité. Il représente 20 à 25% de tous les cancers primitifs du poumon. « Figure 9 » [17]

Macroscopiquement

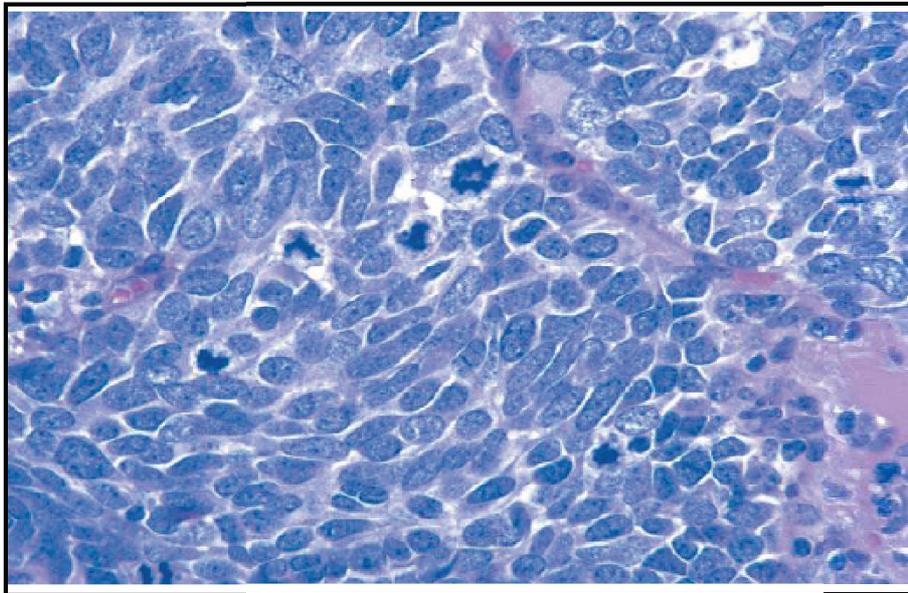


Fig.9: Carcinome à petites cellules [18]

Ce sont des tumeurs qui se développent au niveau des bronches souches et des bronches lobaires [19].elles sont mal limitée et s'étend dans la sous-muqueuse et les tissus de connections [20]. Les CBPC faites de cellules de petite taille (diamètre inférieur à celui de trois lymphocytes) à très haut rapport nucléo-cytoplasmique, et dont la chromatine est dense finement granulaire dissimulant le nucléole. Les cellules sont rondes ou fusiformes et les noyaux ont tendance à se déformer réciproquement. L'activité mitotique est très élevée (60 à 70 par mm² soit 10 champs à fort grossissement) et la nécrose souvent extensive [18].

Le cancer à petites cellules est le second type histologique voir le premier chez la fumeuse [21]. Il se différencie des autres cancers bronchiques par un ensemble de caractéristiques :

- Tumeur d'origine neuroendocrine.
- Un temps de doublement extrêmement rapide de l'ordre de 30 jours.
- Un pouvoir métastatique très important, par voie lymphatique et sanguine, rendant inutile une approche thérapeutique chirurgicale.
- Une très grande sensibilité à la chimiothérapie et à la radiothérapie.
- Une forte probabilité de rechute. [13]

2.2.2. Le cancer bronchique non à petites cellules (CBNPC)

On distingue trois grands groupes de CBNPC :

- Les carcinomes épidermoïdes : 40%
- Les adénocarcinomes : 40%
- Les carcinomes à grandes cellules : 20%. [22]

▪ Les adénocarcinomes

Le terme adénocarcinome vient du grec adéno- (qui se rapporte à une glande) et de carcinome, qui désigne un cancer qui s'est développé dans les cellules épithéliales. Ce groupe de tumeurs épithéliales malignes présente des signes de différenciation glandulaire ou de production de mucine. Les adénocarcinomes bronchiques représentent le type histologique le plus fréquemment diagnostiqués, soit 40% des cancers bronchiques [23].

Les adénocarcinomes se développent à tous les niveaux depuis les bronches périphériques jusqu'aux alvéoles et peuvent donc donner des processus tumoraux proximaux ou périphériques [21]. Ils peuvent provenir d'une part des cellules caliciformes de l'épithélium bronchique et bronchiolaire et d'autre part des glandes bronchiques. Ils peuvent aussi provenir des cellules de Clara bronchiolaires et des pneumocytes de type II des alvéoles pulmonaires.

Macroscopie

Les adénocarcinomes sont définis par leur architecture. De plus, ils sont plus ou moins différenciés en fonction de leur caractère sécrétant. Les phénomènes de nécrose et d'hémorragie sont moins fréquents que pour les carcinomes épidermoïdes précédemment décrits [21].

Il existe quatre sous-types architecturaux selon la classification de l'OMS :

- **Acineux** : Les cellules tumorales forment de petits amas au sein desquels on retrouve de petites cavités. Il existe une stroma-réaction fibreuse. « Figure 10 » [13]

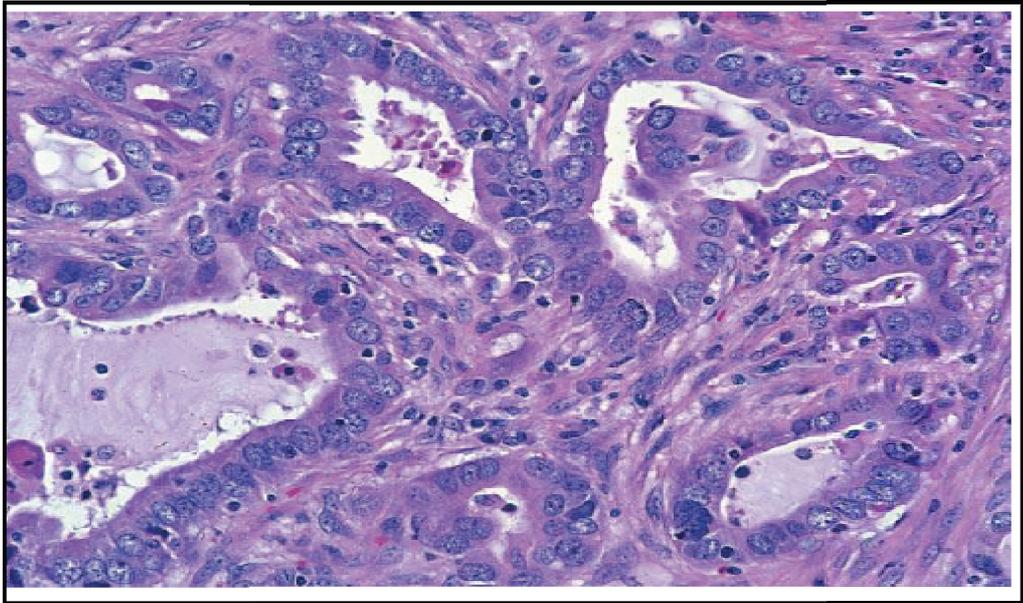


Fig.10 : Adénocarcinome acinaire. [18]

- **Papillaire** : Les cellules tumorales recouvrent des expansions conjonctives en doigt de gant appelées papilles qui sont situées dans des cavités creusées dans des massifs tumoraux. « Figure 11 » [13]

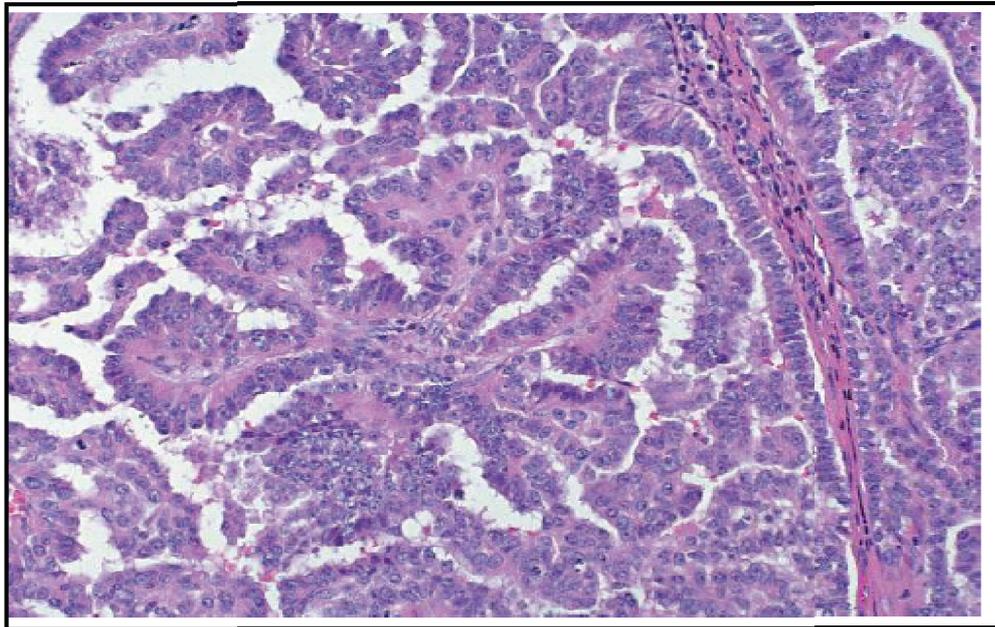


Fig.11 : Adénocarcinome papillaire. [18]

- **Solide à sécrétion mucineuse** : Les cellules tumorales sont disposées en nappes ou en massifs sans agencement particulier dans un stroma fibreux. « Figure 12 » [13]

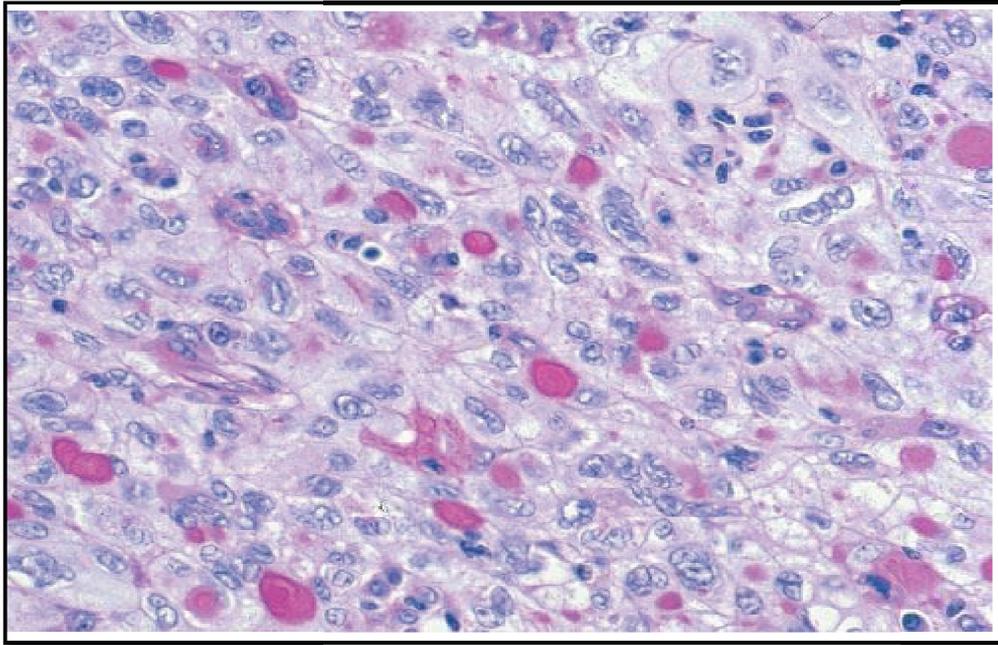


Fig.12 : Adénocarcinome solide à sécrétion intracellulaire de mucus [18]

- **Bronchiolo-alvéolaire (pur, non-invasif)** : Dans cette forme, les cellules tumorales tapissent les parois alvéolaires en respectant l'architecture globale du tissu pulmonaire. Il existe deux formes : localisée, périphérique, d'évolution lente chirurgicale et une forme diffuse bilatérale réalisant un syndrome alvéolaire avec une hypersécrétion de mucus par les cellules tumorales. Il faut préciser qu'une tumeur bronchiolo-alvéolaire comportant une composante invasive, c'est-à-dire caractérisée par la présence d'un foyer fibreux détruisant les parois alvéolaires et contenant des cellules carcinomateuses, doit être considérée comme un sous-type mixte. « Figure 13 » [13]

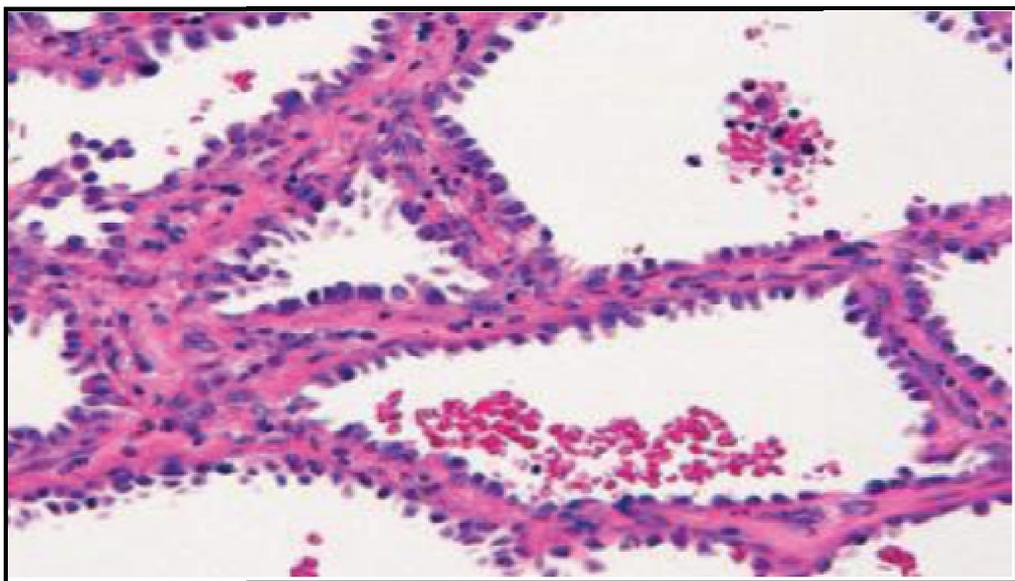


Fig.13 : Carcinome bronchiolo alvéolaire [18]

- Mixte : Combinaison de plusieurs sous-types histologiques. [13]

- **Carcinomes malpighiens**

Également appelés carcinomes épidermoïdes ou carcinomes squameux, ces tumeurs malignes d'origine épithéliale sont caractérisées par la présence de cellules présentant des ponts d'union intercellulaires et/ou des signes de kératinisation. Ce type histologique représente 40% des CBNPC, rassemblant les carcinomes malpighiens peu, moyennement et bien différenciés. Ce cancer est également très corrélé à la consommation de tabac [24].

Ces tumeurs sont proximales car elles se développent surtout au niveau des bronches souches ou de leurs principales branches [19]. (Se localisent préférentiellement dans une bronche lobaire ou segmentaire et se présentent sous la forme d'une tumeur végétante en « chou-fleur », obstruant plus ou moins la lumière bronchique.) [25].

Il existe plusieurs variant : le carcinome épidermoïde papillaire, à cellules claires, à petites cellules (cellules de petite taille, comportant un noyau à la chromatine granuleuse au sein d'un cytoplasme ample) et basaloïde (cellules de petite taille, formant des lobules délimités par une assise palissadique et s'accompagnant de plages de différenciation épidermoïde). « Figure 14 » [26].

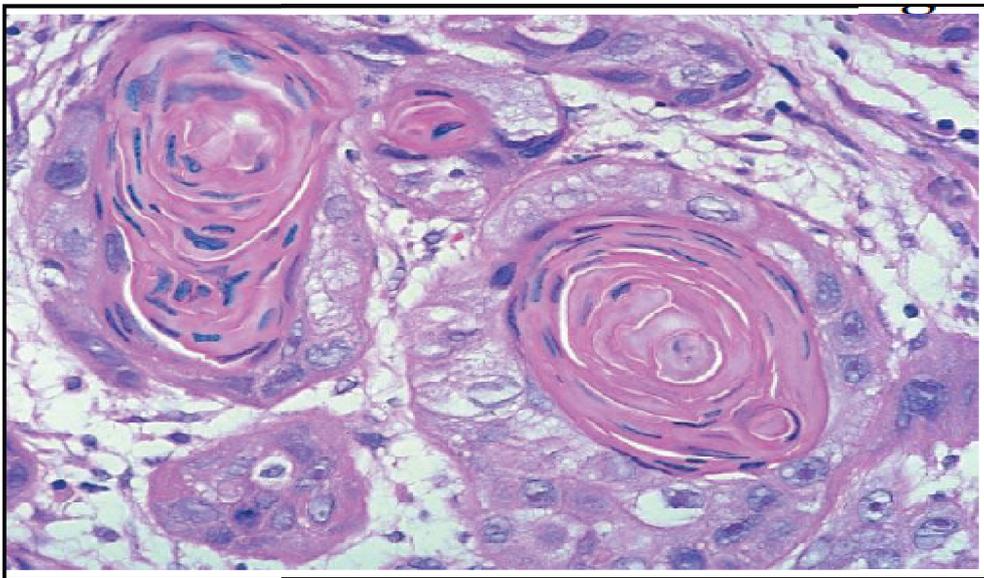


Fig.14 : Carcinome malpighien bien différencié [18]

▪ Les carcinomes à grandes cellules

Ils représentent 9% des carcinomes broncho-pulmonaire primitifs et se développent également très majoritairement chez des sujets fumeurs. [27]

Il s'agit d'une tumeur épithéliale indifférenciée dépourvue de composante épidermoïde ou glandulaire. [21]

Macroscopie

Le carcinome à grandes cellules est typiquement une masse volumineuse, nécrotique, centrale ou périphérique, pouvant envahir la plèvre ou les structures adjacentes. [17]

Les formes variantes des carcinomes à grandes cellules

➤ Carcinome neuroendocrine à grande cellules

C'est un carcinome de haut grade de malignité, de morphologie neuroendocrine, c'est une tumeur du fumeur de la soixantaine. [17]

Macroscopie : il s'agit de tumeurs le plus souvent centrales, de taille moyenne égale à 3cm. Elles sont habituellement circonscrites, de couleur jaune-rouge à la coupe et souvent remaniées par de la nécrose. « Figure 15 » [27]

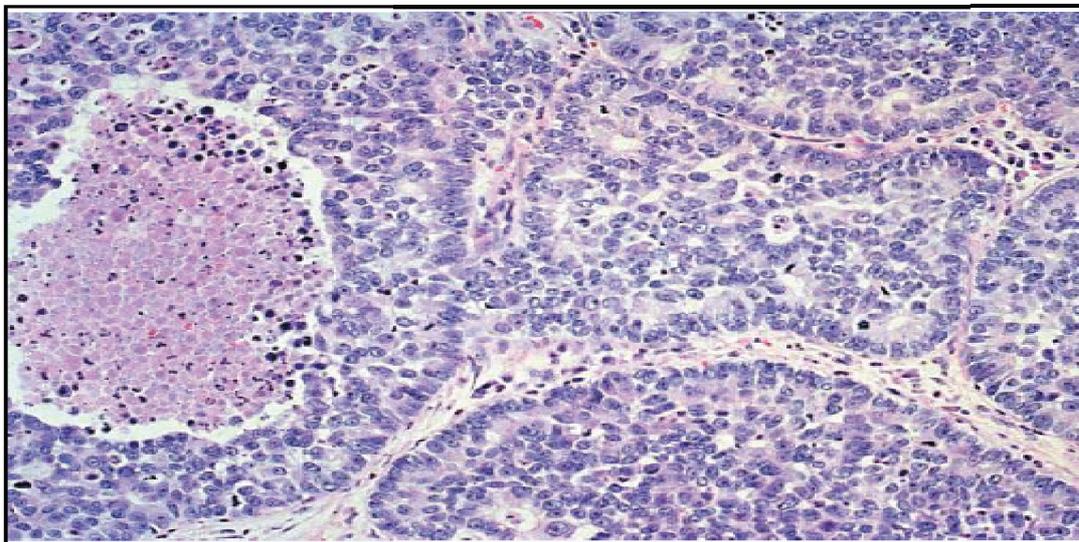


Fig.15 : Carcinome neuroendocrine à grandes cellules. [28]

- **Carcinome basaloïde** : ils s'agit de lésions de mauvais pronostic très souvent proximales faites de cellules d'allure basale et formant des palissades en périphérie des lobules tumoraux. La kératinisation est absente ou réduite à une kératinisation abrupte contrairement à la variante basaloïde des carcinomes épidermoïdes. La nécrose comédonienne est très fréquente et dans 30% des cas, on observe des rosettes. « Figure 16 » [27]

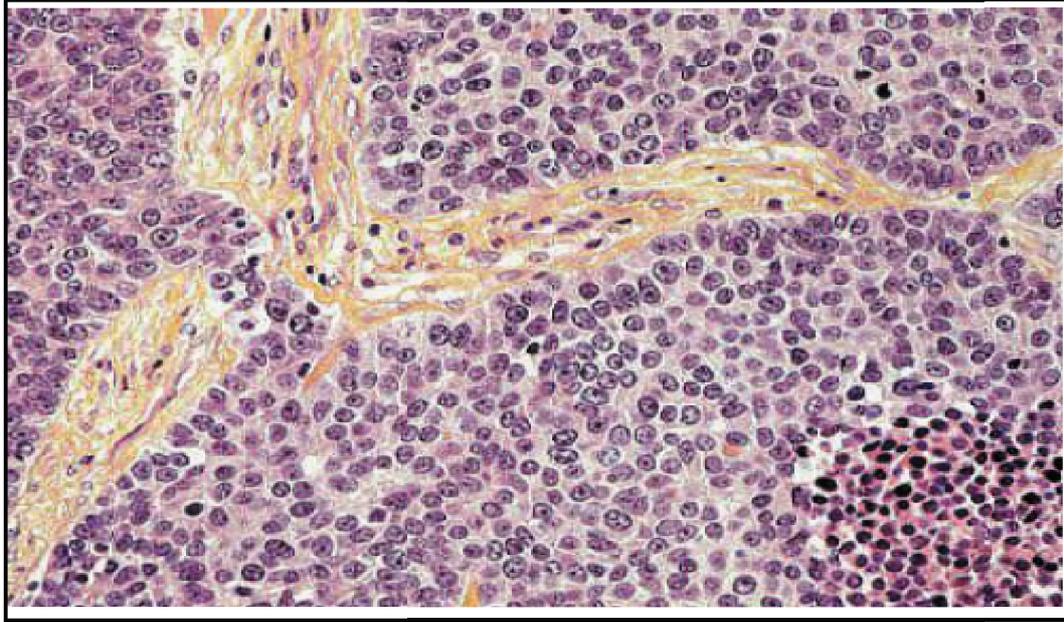


Fig.16 : Carcinome basaloïde. [28]

- Les autres types de tumeurs neuro-endocrines sont :

▪ **Les tumeurs carcinoïdes**

Les tumeurs carcinoïdes sont des tumeurs de bas grade de malignité ou de grade intermédiaire. Elles sont issues des cellules neuro-endocrines du poumon [19].et surviennent chez des sujets non-fumeurs (20-40%).ce sont les tumeurs pulmonaires les plus fréquente chez l'enfant. [27]

Macroscopiquement : elles peuvent avoir l'aspect d'un bourgeon endo-bronchique proximal infiltrant la paroi bronchique ou d'une masse bien limitée périphérique. [19]

- **Les tumeurs carcinoïdes typiques** : la survie à 5 ans et à10 ans est respectivement selon les études pour les carcinoïdes typiques de 90% et 82%. « Figure 17 » [27]

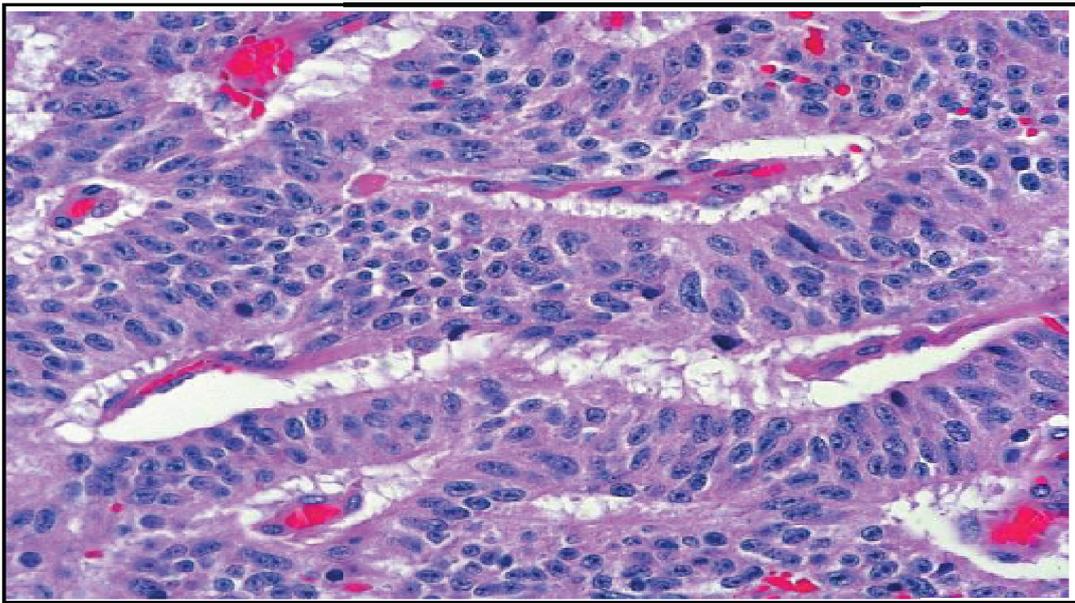


Fig.17 : Les tumeurs carcinoïdes typiques. [29]

- **Les tumeurs carcinoïdes atypiques** : la survie à 5ans et 10 ans est respectivement de 70% et 36%. « Figure 18 » [27]

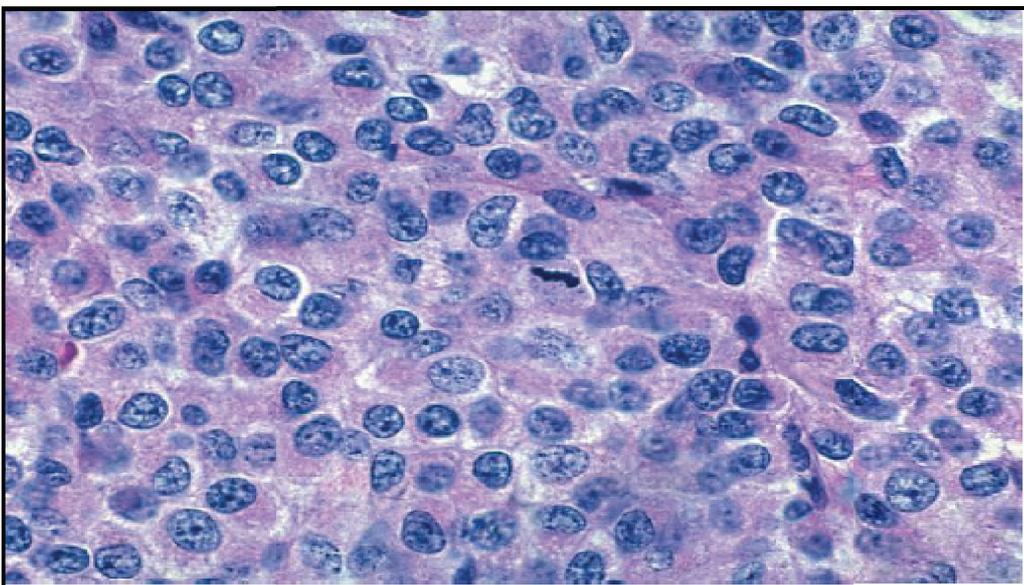


Fig.18 : Les tumeurs carcinoïdes atypiques. [29]

III. Épidémiologie

3.1.Épidémiologie descriptive

- **Épidémiologie mondiale**

Dans le monde, en 2002, l'incidence du cancer bronchique était de 1,4 million, avec 965 000 nouveaux cas chez les hommes et 387 000 nouveaux cas chez les femmes. Chez les hommes, les taux standardisés sur l'âge sont les plus élevés en Amérique du Nord, en Europe et en Russie. Chez les femmes, les taux standardisés sur l'âge sont plus élevés en Amérique du Nord, en Europe, en Asie et en Australie [30]. En 2008, 1,44 millions de nouveaux cas de cancer bronchique ont été diagnostiqués dans le monde [30].Le tabagisme est le facteur de risque le plus important, entraînant dans le monde 22% de la mortalité par cancer et 71% des décès par cancer du poumon. [31]

- **Répartition par sexe :** Depuis 1950, le cancer bronchique est la première cause de mortalité chez les hommes. Mais depuis quelques années l'incidence chez l'homme tend à diminuer, alors que nous sommes face à une véritable épidémie chez les femmes [32]. Cette augmentation de l'incidence chez les femmes a débuté dans les années 1960, ceci est dû à l'histoire du tabagisme qui a débuté plus tôt chez les hommes (environ 20 ans plus tôt) [32].
- **Répartition par âge :** Le cancer bronchique a une répartition différente selon l'âge, avec, 5% pour les moins de 44 ans, 14% pour les 45 - 54 ans, 25% pour les 55 - 64 ans et 55% pour les plus de 65ans [33].

- **Épidémiologie en Algérie**

Le cancer du poumon demeure le cancer le plus fréquemment diagnostiqué chez les hommes algériens : il se situe au premier rang du registre du cancer du Sétif(2007) .il représente 18% de l'ensemble de cancers incidents, il est plus fréquent chez les hommes que chez les femmes [34] Il représente 14% chez l'homme et 2,1% chez la femme de l'ensemble de cancers incidents en Oran en 2008 et 16% chez l'homme à Alger en 2007[31].

3.2.Épidémiologie analytique

➤ Les facteurs de risques

○ Le tabagisme actif

Le lien de causalité entre la consommation de tabac et les cancers broncho-pulmonaires a été établi il y a de nombreuses années. En effet, le tabagisme est responsable de 99% des cancers épidermoïdes, 95% des CBNPC, 90% des carcinomes à grandes cellules et 70% des adénocarcinomes. Sur 1000 décès par cancer broncho-pulmonaire, seulement 30 décès ne sont pas liés au tabac. [35]

Tous les types histologiques de cancer bronchique sont alors associés au tabac [36]. L'évolution du cancer bronchique est parallèle à l'évolution du tabac [37]. Les fumeurs ont 22 fois plus de risque d'avoir un cancer bronchique dans leur vie que les non-fumeurs [38]. Ce risque augmente avec le nombre de cigarettes fumées par jour et la durée du tabagisme [37].

Le tabac renferme 60 à 70 carcinogènes (HAP, nitrosamines, nitrates), qui induisent des adduits à l'ADN et des mutations de p53 et donc un risque de cancer bronchique [39]. De plus, il existe une relation entre nitrosamines et adénocarcinomes [40]. Certains ont montré qu'il existait des modifications génétiques liées au tabac et que celles-ci peuvent être réversibles ou non à l'arrêt du tabac [41].

○ Le tabagisme passif

L'argument essentiel sur son rôle dans la survenue du cancer bronchique tient dans le fait que des taux élevés de cotinine (métabolite de la nicotine) et de goudrons cancérigènes sont retrouvés dans les urines des sujets exposés au tabagisme environnemental. [42]

Une nouvelle méta-analyse publiée en 2000 retrouvait un excès de risque de 20% chez la femme exposée au tabagisme passif de son époux [43].

○ Expositions professionnelles

▪ L'exposition à l'amiante

L'amiante est un cancérigène bronchique bien connu, son pouvoir cancérigène a été établi dans les années 1960. La survenue de cancers bronchiques est caractérisée par une longue période de latence de l'ordre de 20 ans. Le risque de cancer bronchique est corrélé à l'intensité de l'exposition. L'exposition à l'amiante et le tabagisme sont deux carcinogènes bronchiques synergiques. [44]

Parmi les autres cancérigènes :

▪ l'exposition à la silice a été identifiée comme facteur de risque de cancer bronchique. [44].

- **Le nickel, le chrome hexavalent et le cadmium** ont été identifiés comme facteurs cancérigènes pulmonaires. Une méta-analyse récente a montré une augmentation du risque de cancer bronchique chez les peintres [45].
- **Expositions environnementales**
 - **Le radon** est un carcinogène reconnu dans différents pays. Il s'agit d'un gaz radioactif et reste la source principale d'exposition à la radioactivité dans le monde. Darby et al. ont rapporté un risque significatif de cancer bronchique après exposition au radon « domestique » [46].
- **Pollution atmosphérique**

Une grande étude européenne a établi un lien entre la pollution de l'air extérieur et le cancer du poumon et suggère une fraction attribuable à ce type d'exposition d'environ 10,7%. [47]

- Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ont été incriminés [48]. Ce sont des produits issus de la combustion de matières organiques. On est en général exposé à un mélange d'HAP et non pas à un HAP particulier, et ceci quelle que soit la voie d'exposition (orale, pulmonaire ou cutanée). Les principales sources d'exposition aux HAP sont les expositions professionnelles, la pollution de l'air en milieu urbain, la fumée de tabac et l'alimentation [31]. Les HAP résultant des combustions de fuels fossiles pour le chauffage ou les transports pourraient être en cause. La responsabilité de l'apparition de cancer bronchique pourrait aussi être due à la présence d'usine dégageant des fumées toxiques [49].
- Plusieurs études semblent montrer un risque accru de cancer bronchique en cas d'exposition aux vapeurs diesel [50].
- **Infection par le Virus de l'Immunodéficience Humaine**

De nombreuses études épidémiologiques ont montré qu'il existait une augmentation du risque de CBP dans la population infectée par le VIH [51].

Cet excès de risque est en partie expliqué par une consommation tabagique plus fréquente que dans la population générale [52]. Cependant, de nombreuses études ont montré que le risque de développer un CBP était plus élevé chez les patients VIH, à tabagisme équivalent [53]. Plusieurs études récentes sont montrées que l'immunodépression semblait avoir un rôle favorisant et que le risque de CBP augmentait avec la baisse des CD4 [54].
- Beaucoup d'études ont porté sur le lien entre cancer bronchique et alimentation.

Les faits les plus clairs portent sur le rôle préventif de la consommation de fruits et de végétaux, riches en antioxydants, qui auraient un effet protecteur [27].

Partie Bibliographique

Chapitre 3

Diagnostic et traitement

I. Les signes cliniques

Les symptômes les plus souvent reliés à une tumeur pulmonaire primaire incluent :

- Une toux (inquiétante, rebelle mais souvent négligée chez le fumeur bronchitique chronique),
- Une dyspnée (gêne respiratoire),
- une hémoptysie (crachats sanguinolents), voire une pneumonie obstructive.
- Des douleurs thoraciques peuvent suggérer une extension à la plèvre pariétale ou une extension extra-pulmonaire [134].

II. Diagnostic

Le diagnostic du cancer du poumon se réalise en deux étapes :

- Le bilan diagnostique
- Le bilan d'extension

2.1. Le bilan diagnostique

- s'articule autour d'un examen clinique et d'une imagerie pulmonaire (radiographie, scanner, IRM). Le premier permet de déterminer l'état général du patient et la seconde de repérer une éventuelle tumeur.

2.2. Le bilan d'extension permet d'évaluer l'extension du cancer aux organes proches et/ou lointains, afin de déterminer les possibilités chirurgicales éventuelles et les traitements médicaux complémentaires les plus adaptés. Les principaux examens réalisés sont :

- la médiastinoscopie, pour déterminer le stade du cancer et l'atteinte des ganglions médiastinaux ;
- le scanner thoracique, pour repérer la taille et la localisation des anomalies ou nodules, même de très petite taille (inférieure ou égale à 3 millimètres) ;
- l'échographie hépatique, à la recherche de métastases dans le foie ;
- la scintigraphie osseuse, à la recherche de métastases dans les os ;
- l'échographie endo-œsophagienne pour apprécier l'extension du cancer à l'œsophage et aux vaisseaux du cœur ;
- l'angiographie pour vérifier la connexion de la tumeur avec l'aorte et les vaisseaux pulmonaires. [135]

III. Traitements

La chirurgie est indiquée en première intention chaque fois que possible. Une combinaison de radiothérapie et de chimiothérapie est maintenant couramment utilisée, en particulier pour traiter les cancers bronchiques de stade avancé ainsi que dans le traitement de tumeurs présentant des métastases. Les cancers bronchiques à petites cellules sont agressifs et disséminent facilement. Pour cette raison les CBPC ne sont généralement pas traités par ablation chirurgicale [134]. La chirurgie n'est possible que dans environ 25% des CBNPC. Le traitement chirurgical est généralement suivi d'une radiothérapie pour éliminer les cellules cancéreuses résiduelles et, parfois, de chimiothérapie. Le taux de guérison est fonction de la taille de la tumeur et de l'extension éventuelle. [136]

3.1. Chimiothérapie

La chimiothérapie a pour objectif de détruire les cellules cancéreuses et d'éviter rechutes locales et métastases. Même si les résultats s'améliorent au cours du temps, ce but est loin d'être toujours atteint et elle doit presque toujours être associée à d'autres traitements : chirurgie, radiothérapie, hormonothérapie et immunothérapie. La chimiothérapie est un traitement systémique toxique pour la totalité des cellules capables de se diviser. Les chimiothérapies empêchent la synthèse d'ADN indispensable à la duplication des cellules et en détruisent le cytosquelette. Ces traitements s'appliquent particulièrement aux cancers à petites cellules, pour lesquels il est commun de supposer une extension du cancer à d'autres organes même si cette extension n'est pas localisée avec précision. De nombreux effets secondaires sont liés au caractère toxique systémique de ces traitements: anémie, fatigue, leucopénie (en particulier neutropénie), thrombopénie, nausées et vomissements, aphtes, perte des cheveux, perte de poids, irritation des muqueuses, troubles digestifs et gynécologiques... [136].

Les divers médicaments utilisés combinés en chimiothérapie proviennent de trois grandes classes pharmacologiques. Les anti-métabolites interfèrent avec la synthèse des acides nucléiques pendant la phase S du cycle cellulaire. Ils comportent les anti-folates, les analogues des bases puriques et les analogues des bases pyrimidiques. Les médicaments agissant au niveau de l'ADN peuvent être alkylants, intercalants, inhibiteurs des topoisomérases I et scindants. Ils agissent sur la duplication ou la transcription.

Les médicaments agissant sur les fonctions cellulaires contiennent les alcaloïdes antimitotiques de la pervenche (inhibiteurs de la polymérisation de la tubuline), les dérivés de l'if qui sont cytotoxiques pour les cellules en mitose (inhibiteurs de dépolymérisation de la tubuline), les épipodophyllotoxines (inhibiteurs de topo-isomérase) qui empêchent l'entrée en prophase, les éthers lipidiques (proches des phospholipides membranaires) qui induisent l'apoptose en créant des désordres

membranaires, les anticorps monoclonaux, les inhibiteurs de transduction des signaux des tyrosines kinases [136].

3.2. Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement local qui provoque beaucoup d'effets secondaires que la chimiothérapie. Du fait de son caractère local, la radiothérapie ne peut toutefois s'appliquer qu'à des tumeurs primaires localisées et peu profondes [136]. La radiothérapie est utilisée chez les patients présentant une tumeur primaire peu étendue, qui ne sont pas traitables par chirurgie. La radiothérapie peut être utilisée en combinaison avec la chimiothérapie pour le traitement des CBPC [134].

3.3. Autres traitements

Un certain nombre d'autres traitements sont utilisés dans la prise en charge des cancers. Ils sont généralement non curatifs à eux seuls mais apportent une augmentation d'efficacité des autres traitements et une amélioration de la qualité de vie du patient [136]

- L'immunothérapie utilisant divers anticorps monoclonaux peut être envisagée dans le cancer du poumon, deux médicaments disponibles sur le marché pouvant être utilisés dans certaines tumeurs bronchiques. En effet, le Trastuzumab (Herceptin™) est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre ErbB2 (=HER2/neu) et peut être utilisé pour le traitement des tumeurs sur-exprimant cette molécule. Le Cetuximab (Erbix™) est un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre ErbB1 (récepteur de l'EGF) et peut de même être utilisé pour le traitement des tumeurs sur exprimant cette molécule [136]
- La thérapie photo-dynamique constitue une autre modalité de traitement des cancers. C'est un traitement local utilisant des molécules photosensibles s'activant par éclaircissement à certaines longueurs d'onde. L'activation de ces photo-sensibilisateurs provoque la production de radicaux libres et de dérivés réactifs de l'oxygène capables de lyser directement les cellules tumorales. La production des espèces réactives de l'oxygène induit également une réponse immune inflammatoire et des dommages dans la micro-vascularisation tumorale. Une stratégie de photothérapie peut être utilisée dans le traitement de certains cancers du poumon, en particulier les tumeurs de stades précoces, centrales et de petite taille [137].

Partie Bibliographique

Chapitre 4

Oncogenèse des cancers broncho pulmonaires

I. Les différentes étapes de l'oncogénèse

Les cancers résultent de la transformation progressive de lésions. Les cellules pré-néoplasiques acquièrent des altérations génétiques somatiques qui évoluent par étapes vers une tumeur invasive par expansion clonale. Les stades de cancérisation passent de la cellule normale à l'hyperplasie, puis à la dysplasie, pour aboutir à la formation d'un carcinome *in situ* [55].

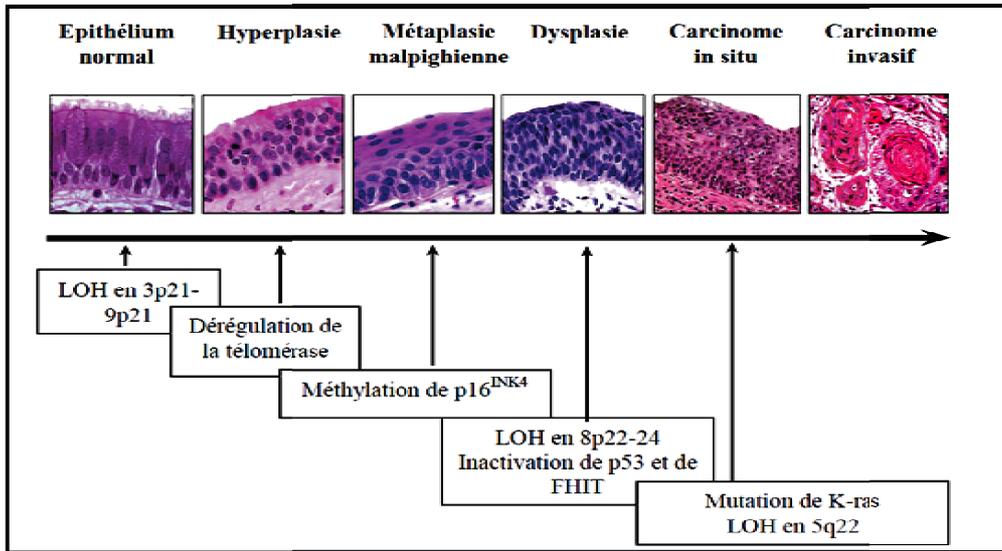


Fig. 19: Description moléculaire des étapes de la carcinogénèse bronchique [19]

II. Les altérations géniques

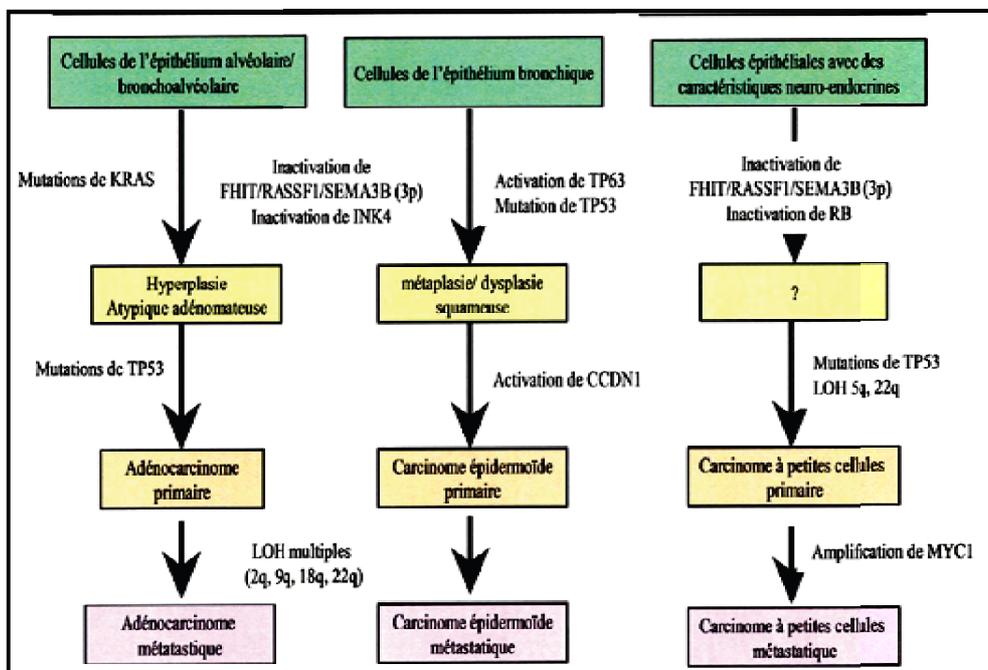


Fig.20:Chronologie d'apparition des anomalies génétiques et moléculaires au cours du développement des différents carcinomes pulmonaires, à petites cellules (BCPC) et non à petites cellules (BCNPC) [56]

2.1. Les oncogènes

➤ Altérations d'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor)

Le récepteur à l'EGF (EGFR) est une glycoprotéine membranaire de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase, permettant la transmission d'un signal extracellulaire vers le cytoplasme cellulaire. La fixation de son ligand principal, EGF, au niveau du domaine extracellulaire induit une homo- ou une hétérodimérisation avec un autre récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, permettant l'activation par autophosphorylation du domaine intra-cytoplasmique (Figure 3). En aval, cette phosphorylation induit le recrutement en position sous-membranaire de nombreuses protéines de transduction du signal comme, qui permettent l'activation de 2 voies principales de transduction du signal: la voie RAS/MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) et la voie PI3K (Phospho-Inositide-3 Kinase)/AKT. Ces voies permettent une régulation et une amplification du signal EGFR, et contrôlent les processus de différenciation, de prolifération, d'apoptose, et de survie cellulaire [57].

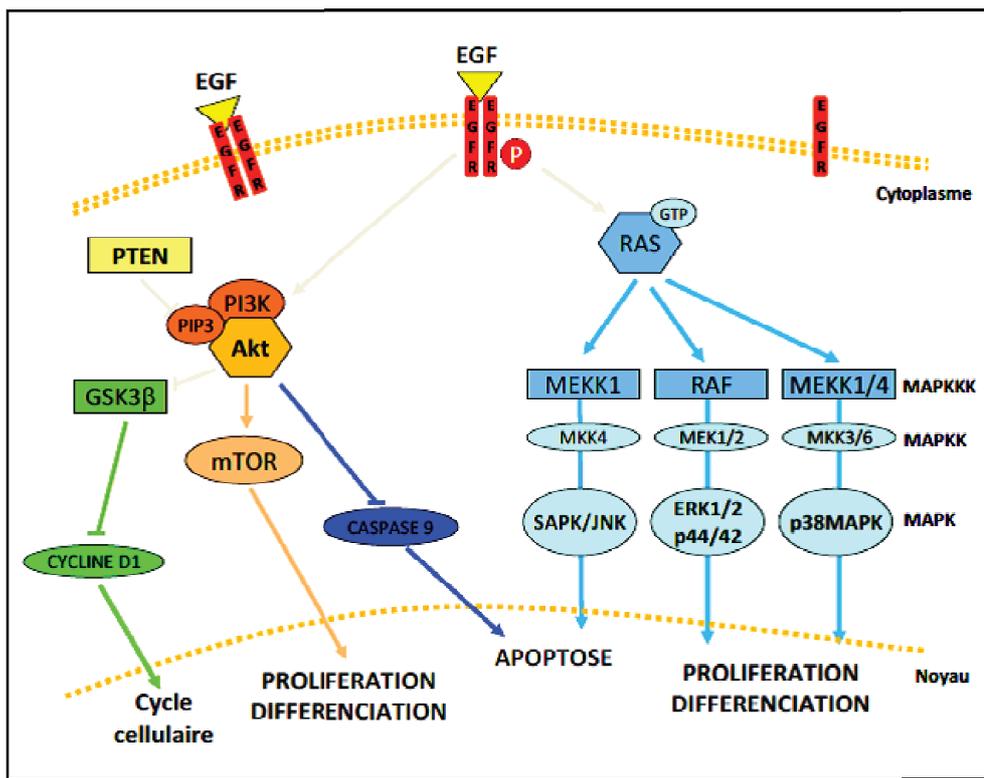


Fig.21 : Les voies de transduction du signal sous-jacentes à l'EGFR sont la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT [57].

Les mutations de l'EGFR sont d'origine somatique, dominantes, et apparaissent précocement au cours de la carcinogénèse pulmonaire, étant retrouvées dans les lésions pré invasives d'adénocarcinome broncho-pulmonaire comme les hyperplasies adénomateuses atypiques [58].

Ces mutations surviennent spécifiquement dans les 4 premiers exons (exons 18 à 21) du gène *EGFR*, codant pour le domaine tyrosine kinase [59]. Les deux plus fréquentes sont :

Au sein de l'exon 19, il s'agit de délétions, intéressant la leucine en 747 et la glutamine en 749 et représentant 44 % des mutations de l'*EGFR* [60].

Exon 21 : La mutation ponctuelle L858R de l'exon 21 représente 41 % des mutations activatrices de l'*EGFR*, la mutation ponctuelle L861Q 2 % [61]. La mutation L861R a aussi été recensée dans l'exon 21.

Exon 18 : Au sein de l'exon 18, il s'agit de mutations touchant le codon 719 et à l'origine une substitution d'une glycine par une cystéine, alanine ou sérine (G719X) re présentant 4 % des mutations [62].

Exon 20 : Au sein de l'exon 20, il s'agit d'insertions représentant 3% des mutations, dont la plus fréquente est la substitution T790M [61]. Moins de 1% des mutations concernent les mutations ponctuelles V765A et T783A [62].

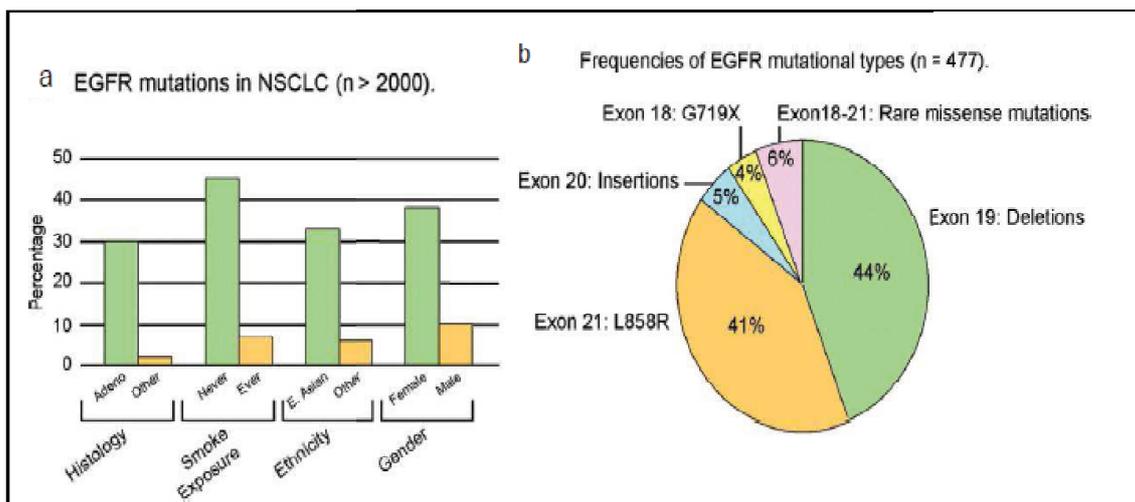


Fig.22: Mutations de l'*EGFR* dans les cancers broncho-pulmonaires non à petites cellules [59].

Toutes ces mutations entraînent une activation constitutive de la kinase de l'*EGFR* par modification de la conformation du domaine de fixation de l'Adénosine-Tri-Phosphate (ATP), substrat de la phosphorylation de la tyrosine, créant une ouverture permanente du site de fixation aux protéines sous-jacentes de transduction du signal (**Figure 4**) [59]. Le récepteur à l'*EGFR* est donc constitutivement activé. Les *TKIs*, initialement synthétisés pour inhiber l'*EGFR* sauvage, se fixent sur le même site que l'ATP ; ainsi, les mutations activatrices du domaine tyrosine kinase stabilisent la fixation des *TKIs*, qui entrent en compétition avec l'ATP et inhibent l'activation des protéines sous-jacentes. Les *TKIs* entraînent ainsi dans les cellules porteuses de mutation activatrice de l'*EGFR* une inhibition des médiateurs *AKT* et *ERK1/2*, sous-jacents à l'*EGFR*; cette inhibition n'est pas retrouvée en l'absence de mutation de l'*EGFR*, ce qui indique l'existence d'une dépendance

exclusive de *AKT* et *ERK1/2* à l'*EGFR* muté, au détriment d'autres récepteurs transmembranaires sus-jacents susceptibles de les activer [63]. Au plan cellulaire, cette dépendance se traduit par une « addiction oncogénique » à la voie de signalisation de l'*EGFR*, dont l'activation est alors suffisante mais aussi nécessaire au développement, au maintien et à la prolifération des cellules tumorales. Cette caractéristique définit le caractère oncogénique des mutations activatrices de l'*EGFR* [60].

➤ Altérations de *KRAS*

La protéine *KRAS* joue un rôle majeur en aval de l'*EGFR* dans la transduction du signal entre le récepteur et les kinases cytoplasmiques (*RAF* et *PIK3*). C'est une GTPase ancrée à la membrane plasmique qui agit comme un commutateur on/off en recrutant et activant des protéines nécessaires à la propagation du signal lorsque le récepteur est activé. [64]

Les protéines cytoplasmiques *p21-ras* sont toutes liées soit au *GDP* qui correspond à la forme inactive de la protéine, soit au *GTP* qui correspond à la forme active et interagit en aval pour transmettre le signal d'origine extracellulaire pour la transduction de signaux de croissance ou de différenciation cellulaire. À l'état normal il existe un équilibre entre les formes active et inactive des protéines *p2I-ras*, l'activation se faisant en échangeant du *GDP* avec du *GTP* présent dans le cytoplasme. L'inactivation se produit par hydrolyse du *GTP* en *GDP* grâce à une activité GTPasique intrinsèque de *p2I-ras* qui est ainsi capable d'autoréguler son activité [65]. Les mutations activatrices de *K-RAS* sont retrouvées dans 10 à 15 % des cancers bronchiques non à petites cellules, localisées le plus souvent au niveau du codon 12 de *K-RAS*, plus rarement au niveau des codons 13 et 61 et très rarement au niveau de N- et H-ras [66]. Elles sont plus fréquentes dans les adénocarcinomes et les carcinomes bronchiques à grandes cellules (environ 30%) et plus rarement dans les carcinomes épidermoïdes (moins de 5%) et jamais dans le cancer du poumon à petites cellules [67].

La majorité des mutations de *c-K- ras* (70%) affectent donc le codon 12 et sont des transversions G vers T, responsables d'une substitution de la glycine par la cystéine (GGT en TGT) ou de la glycine par la valine (GGT en GTT). Le benzopyrène et les nitrosamines de la fumée de tabac favorisent l'apparition *in vitro* de mutations identiques affectant le codon 12, ce type d'anomalie étant également observé dans les mutations du gène *p53* ; elles sont caractéristiques des lésions de l'ADN provoquées par ces carcinogènes [68]. Lorsqu'une mutation ponctuelle du gène *K-ras* est survenue sur un des codons critiques (12, 13 ou 61) correspondant aux sites de fixation des résidus *GDP/GTP* sur la protéine *p2I-ras*, la conformation de cette dernière est modifiée et induit une diminution de l'activité GTPasique intrinsèque. L'accumulation résultante de la protéine *p2Iras* active conduit au maintien d'un signal mitotique anormalement élevé en aval [65].

- Mutation *HER2 (erbB2)*

HER 2 (Human epidermal growth factor 2) est un proto-oncogène codant pour la protéine HER2 faisant parti des récepteurs tyrosine kinase de la famille HER. Le gène codant pour *HER 2* joue un rôle important dans la prolifération cellulaire par l'activation des voies de signalisation intracellulaire *PI3K* et *MEK-ERK* [69]. Ce récepteur est activé par homodimérisation ou hétérodimérisation avec un autre membre de la famille *HER*. Les mutations d'*HER 2* répondent aux définitions de « drivers » oncogéniques. Il est surexprimé dans environ 20 % des CBPNC mais la mutation du gène est beaucoup moins fréquente (<2%) il s'agit essentiellement d'une insertion sur l'exon 20) [69]. Une première étude rétrospective vient d'être publiée. Il s'agit d'une étude multicentrique (France, Espagne et Suisse) chez 46 patients porteurs d'adénocarcinomes pulmonaires stade IV avec mutation d'*HER 2* [70]. La majorité des patients était de sexe féminin (56%) et non-fumeurs (52%) [69] mais la population serait plus jeune [71].

➤ Altération de la *Bcl2*

Bcl2 est un proto-oncogène anti-apoptotique. [55]. La protéine *Bcl2* contrecarre l'induction de l'apoptose par *P53* [72]. elle est exprimé dans 75 à 95% des CBPC, il est plus exprimé dans les carcinomes épidermoïdes que dans les adénocarcinomes [55].

➤ Altération du *BRAF* :

Il s'agit d'une sérine-thréonine kinase qui relie les kinases Ras aux protéines MAP kinases de la cascade sous-jacente, contrôlant la prolifération cellulaire [73].

La mutation de *BRAF* la plus fréquemment trouvée se situe sur l'exon 15 (substitution d'une glutamine pour une valine au niveau du résidu 600 (V600E) du chromosome 7 [74]. Dans les CBNPC, les mutations de *BRAF* seraient présentes dans 1 à 3 % des CBNPC avec dans 50% des cas une mutation V600E [74].

Les mutations de *BRAF* sont mutuellement exclusives de celles de l'*EGFR* et de *KRAS*. Le mécanisme d'action repose sur une activité kinase augmentée et donc une activation constitutive des MAP kinases sous-jacentes [75].

➤ Altération du *c-Met*

c-MET est un gène localisé sur le bras long du chromosome 7 (7q21-31) qui code pour un récepteur tyrosine kinase dont le ligand est l'Hepatocyte Growth Factor (HGF). *c-MET* est l'initiateur d'une signalisation intracellulaire complexe qui intervient dans la prolifération et la résistance à l'apoptose, la mobilité, l'invasion et l'angiogenèse [76].

Il a récemment été identifié comme une nouvelle cible prometteuse dans plusieurs cancers humains, y compris le cancer du poumon non à petites cellules. Particulièrement impliqué dans la transition

épithéliome mésoenchymateuse, *c-MET* active notamment la prolifération cellulaire (activation de la voie des MAP kinases), la survie cellulaire (voie *PI3K/AKT/mTOR*) et la mobilité cellulaire (activité sur le cytosquelette d'actine). La voie de signalisation *HGF/MET* peut être altérée par différents mécanismes, comme la surexpression d'HGF et/ou de MET, ou par mutation ou amplification du gène *c-MET*. L'amplification du gène *c-MET* est associée à un mauvais pronostic dans différentes séries rétrospectives de CBNPC [77], elle reste un événement relativement rare dans le CBNPC, survenant chez 1-7% des cas non sélectionnés [78].

➤ **Les translocations impliquant *ALK*, *ROS* et *RET***

▪ ***EML4-ALK* :**

L'étude de *Soda et al* a permis d'identifier en 2007 un gène résultant de la fusion du gène codant pour « echinoderme microtubule-associated protein like 4 » dans sa portion N-terminale (*EML4*) et la portion intracellulaire du récepteur tyrosine kinase codée par le gène « anaplastic lymphoma kinase » (*ALK*) [79]. Cette fusion résulte d'une petite inversion à l'intérieur du chromosome 2p qui relie l'intron 13 d'*EML4* et l'intron 19 d'*ALK* [inv(2) (p21 ;p23)] et aboutissant à un gain de fonction d'une tyrosine kinase chimérique oncogénique [80]. Le transcrite de fusion serait détecté dans environ 5% des cancers non à petites cellules [81].

Les tumeurs porteuses de la translocation *EML4-ALK* touchent plus les hommes, les patients jeunes, les non-fumeurs. Il s'agit de tumeurs de petite taille et présentant un sous-type histologique acineux, à cellules en bague à chaton ou solide avec une présence de mucus intra ou extra-glandulaire [82].

▪ **Réarrangement *ROS 1***

Le réarrangement de *ROS 1* (c ros oncogène 1) est une nouvelle anomalie moléculaire détectée récemment dans les CBNPC. Il a été préalablement décrit dans les glioblastomes. *ROS 1* est un récepteur tyrosine kinase de la famille des récepteurs de l'insuline (gène sur le chromosome 6q22). La translocation du gène *ROS 1* a été décrite dans les CBNPC avec CD74 et SLC34A2 [83]. Elle aboutit à une activation constitutive du récepteur. Elle serait présente dans moins de 2 % des CBNPC et concerne les adénocarcinomes, chez des sujets plutôt jeunes non-fumeurs [84].

▪ **Réarrangement *RET***

Le gène *RET* est un membre de la superfamille des cadhérines et code pour un récepteur tyrosine kinase, son expression est très faible dans le poumon. Le gène est localisé sur le chromosome 10. Les réarrangements de *RET* pourraient concerner 1 à 2 % des patients porteurs d'un CBNPC, les variantes sont nombreux et impliquent plusieurs partenaires [85].

➤ **Mutation du *c-myc***

La fonction de *c-myc* est placée à un carrefour essentiel dans la régulation des processus: de prolifération cellulaire: l'induction de *c-myc* est suffisante pour l'entrée et le maintien dans le cycle cellulaire de cellules quiescentes, de différenciation cellulaire terminale: *c-myc* inhibe celle-ci en bloquant l'entrée des cellules dans une prédifférenciation GO/G1 ; le TGF- α est capable d'inhiber *c-myc* et de favoriser ainsi la différenciation terminale, d'activation du gène *Bcl2*, et ainsi d'inhiber l'apoptose. Ainsi *c-myc* se trouve impliqué, à la fois dans l'induction de la prolifération cellulaire et dans l'inhibition de la mort cellulaire par apoptose.

Les gènes de la famille *myc* sont globalement amplifiés dans environ 15 à 20 % des cancers du poumon, *c-myc* dans tous types de cancer du poumon, et *L-myc* et *N-myc* exclusivement dans les tumeurs à différenciation neuroendocrine dans environ 10 à 30 % des cas [86].

2.2. Les gènes suppresseurs de tumeur

➤ L'inactivation de *p53*

Le gène *p53* (17p13.1) code pour une protéine nucléaire qui est impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation cellulaire, la mort par apoptose et la sénescence. La protéine suppressive de tumeur *p53* est considérée comme « le gardien du génome » [87]. Dans des conditions normales, la voie *p53* n'est pas activée et le taux d'expression de la protéine reste faible. La protéine HDM2, ubiquitine ligase équivalent de MDM2 chez la souris, en se liant à *p53* va induire sa dégradation *via* le protéasome limitant ainsi la quantité de protéine intracellulaire. Lors d'un stress cellulaire comme des dommages à l'ADN (UV, hypoxie, radiations...) ou lors d'infections virales, la protéine *p53* va être modifiée de différentes manières (phosphorylation, acétylation, sumoylation...) [88].

Ces modifications post-traductionnelles inhibent son interaction avec la protéine HDM2 bloquant ainsi sa dégradation, conduisant à son accumulation dans la cellule. De plus, *p53* va être transloquée dans le noyau où elle pourra se lier sur des régions spécifiques de l'ADN et induire la transcription de nombreux gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire, induisant ainsi un blocage en phase G1, ou de gènes régulant l'apoptose conduisant à la mort de la cellule [89]. On détecte des mutations de TP53 dans 50 % des BCNPC et dans plus de 70 % des BCPC [90].

Dans 80% des cas, l'inactivation a lieu par perte d'hétérozygotie et mutation ponctuelle de l'allèle restant, mutation ciblant le domaine d'interaction à l'ADN de *p53* conduisant à une protéine *p53* non fonctionnelle [91]. Les mutations du gène *p53* observées dans les cancers du poumon sont préférentiellement des transversions de type G7T de même type que les anomalies qu'on peut reproduire expérimentalement lors de l'exposition de cellules humaines au benzopyrène [92]

➤ Dérégulation de *TP63* et *TP73*

Les deux autres membres de la famille *TP53*, *TP63* et *TP73*, sont exprimés de façon complexe au cours de la morphogenèse et de la différenciation de l'arbre bronchique. Malgré leur ressemblance structurale et biochimique avec *TP53*, ces deux gènes ne sont pas des suppresseurs de tumeurs typiques.

Ils sont néanmoins impliqués, au moins comme cofacteurs, dans la carcinogenèse bronchique. La protéine *p63* est un facteur décisif dans la différenciation épidermoïde et son expression est indispensable à la formation de l'épithélium pluristratifié. Cette protéine est surexprimée (parfois en conséquence de l'amplification du gène, localisé en 3q28) dans les métaplasies de la muqueuse bronchique et dans tous les SCC. Elle constitue un bon marqueur histologique du compartiment épidermoïde des tumeurs présentant une histologie mixte. Le rôle de *p73* est moins bien compris : cette protéine joue un double rôle dans la différenciation et la réponse au stress de nombreux types cellulaires (différenciation neuronale, épithéliale) [93].

➤ Altération de la *p16*

La protéine *p16* est localisée sur le chromosome 9p21, zone fréquemment délétée dans les cancers bronchiques. Elle est impliquée dans la régulation du cycle cellulaire. En effet, elle inhibe les kinases Cdk 4 et 6 bloquant ainsi la phosphorylation de Rb et donc la transcription dépendante du facteur E2F. Elle induit donc un blocage du cycle en phase G1. Mais elle est également impliquée dans la sénescence, limitant ainsi le nombre de cycle de réplication des cellules, ainsi que dans le processus d'anoïkis, qui induit la mort des cellules lorsque celles-ci n'adhèrent plus à leur substrat [94]. *p16* est inactivée dans 60% des CBNPC mais très rarement dans les CBPC où la protéine Rb est retrouvée mutée. Or les mutations de ces protéines s'excluent l'une l'autre. Différents processus sont responsables de cette inactivation. Les carcinogènes contenus dans la fumée de cigarette induisent une augmentation de la méthylation des promoteurs d'un certain nombre de gènes conduisant ainsi à l'inhibition de leur transcription. L'hyper-méthylation du promoteur de *p16* est retrouvée dans 24% de CBNPC et constitue le processus majoritaire d'inhibition de ce gène dans les carcinomes bronchiques. Ce phénomène serait dû aux radionucléides contenus dans la fumée de cigarette [95]. Mais il existe également des délétions homozygotes dans 20% des cas ainsi que des mutations sur les exons 1 et 2 dans 14% des cas [94]. L'inactivation de *p16* est un phénomène fréquent et précoce dans l'oncogenèse pulmonaire. En effet, la perte d'un allèle est retrouvée dans 30 à 80% des dysplasies et le pourcentage augmente avec la progression tumorale. De plus, la méthylation du promoteur est retrouvée plus fréquemment dans les stades I et II [96].

➤ Altérations de la voie *Rb*

La protéine Rb, produit du gène du rétinoblastome RB1 (chromosome 13q14), est la clé de voûte d'une voie signalétique systématiquement altérée dans les cancers pulmonaires. Ce suppresseur de tumeurs agit comme facteur limitant pour contrôler la progression des cellules dans les phases G1 et S du cycle cellulaire [97]. L'inactivation de Rb est rapportée dans plus de 90% des carcinomes pulmonaires à petites cellules [47] et dans 15-30% des CBNPCs [98]. Les carcinomes à petites cellules bronchiques présentent une perte d'expression de la protéine Rb dans 90% des cas [99] due à des altérations cytogénétiques et une perte d'hétérozygotie (LOH). La protéine Rb peut cependant être présente dans 10% des cas et être détectée en immunohistochimie car elle est stable; néanmoins, cette protéine reste inactive car dépourvue de domaine fonctionnel en raison d'une mutation ponctuelle ou d'une délétion du gène [100].

➤ **Altérations de *MEN1***

Le gène *MEN1*, localise sur le chromosome 11q13, code la Menine, une protéine très particulière qui fonctionne comme un modulateur de facteurs de transcription mitogéniques. Des mutations somatiques et des pertes d'allèles de *MEN1* sont observées dans la majorité des carcinoïdes bronchiques atypiques, mais pas dans les tumeurs neuroendocrines de haut grade. Il s'agit de la seule altération génétique connue à ce jour qui distingue les BCPC des BCNPC [97].

➤ **Inactivation de *p14ARF***

Le locus *INK4/CDKN2a* possède une structure complexe : il contient, en plus des séquences codant pour p16, un cadre de lecture pour une autre protéine, p14ARF, impliquée dans la répression de la prolifération par un mécanisme distinct de celui de p16. Dans la plupart des cas, la délétion du locus *INK4* inactive à la fois p16 et p14ARF [97]. L'inactivation du gène codant pour la protéine p14ARF, par délétion homozygote ou mutation génique, a été observée dans un certain nombre de tumeurs humaines [101]. De façon intéressante, l'expression de p14ARF est indétectable dans 65% des tumeurs neuroendocrines de haut grade (carcinomes à grandes et petites cellules) alors que les messagers sont toujours présents [102]. Dans cette même étude, la perte de p14ARF a également été observée dans 25% des CBPC [103]. Enfin, plusieurs équipes ont observé une hyper-méthylation du promoteur de p14ARF [113] qui peut atteindre 25 à 30% des cancers broncho-pulmonaires de type malpighien [105].

➤ **Altérations du gène *FHIT***

Le gène *FHIT* code une protéine possédant une activité ADP-hydroxylase, dont la fonction exacte est inconnue. Elle pourrait intervenir dans la régulation des niveaux de nucléotides

intracellulaires et exercer des effets multiples, tant sur l'activation de nombreuses voies ou des nucléotides sont impliqués que dans le contrôle de la synthèse d'ADN [97].

FHIT est un gène suppresseur de tumeur positionné sur le bras court du chromosome 3. Une délétion homozygote au niveau d'un point de translocation engendre la perte d'expression de ce gène [106]. Des altérations du gène *FHIT*, concernant principalement la région située entre les exons 4 et 8, ont été retrouvées dans environ 47% des BCNPC [106].

➤ **Le gène *PTEN***

PTEN est une protéine/lipide phosphatase, qui inactive la kinase AKT, qui est elle-même impliquée dans la promotion du système anti apoptotique Bad/Bcl2 [107]. Le promoteur de *PTEN* est hyper-méthylé dans moins de 6 % des BCNPC avec perte d'expression de la protéine, engendrant la perte du contrôle négatif sur AKT [108], et donc le signal de survie cellulaire est continuellement activé [109]. De plus, une délétion hétérozygote est observée dans 50% des BCNPC, et pourrait contribuer à une altération des fonctions du gène [110].

➤ **Mutation de *PI3K* :**

La phosphatidy-linositol 3-kinase (PI3K) fait partie des kinases lipidiques qui jouent un rôle important dans la régulation de la croissance cellulaire, la prolifération et la survie. Les mutations (plusieurs décrites) concernent le gène codant pour la sous unité p110 alpha de PI3K [111]. Leurs présences activent la voie PI3K-AKT. Ces mutations sont rares (1 à 2% des CBNPC) mais sont présentes aussi bien dans les adénocarcinomes que dans les carcinomes épidermoïdes [112]. Il faut aussi noter que les mutations *PI3KCA* dans l'adénocarcinome du poumon coexistent souvent avec une autre mutation oncogénique, comme une mutation d'*EGFR* ou de *KRAS* [111].

➤ **Altération de *RASSF1***

RASSF1 est décrit comme un gène suppresseur de tumeur, situé sur le Chromosome 3p21.3, dont la protéine présente un domaine de liaison à la protéine Ras [113]. Une délétion homozygote d'une région de 120 kb, ainsi qu'une hyper-méthylation du promoteur est fréquemment observée dans le cancer bronchique [114].

2.3. Les gènes de réparation

D'autres gènes peuvent influencer le risque de cancer, notamment ceux intervenant dans la réparation de l'ADN. Puisque des anomalies de presque toutes les voies de réparation conduisent à des prédispositions importantes à développer des cancers, on peut imaginer qu'une diminution de la capacité individuelle à réparer l'ADN puisse aussi constituer un facteur de risque de cancer. Des

études ont mis en évidence une corrélation entre la capacité de réparation et certains polymorphismes de gènes de la réparation [115] et les effets de polymorphismes de gènes impliqués dans divers systèmes de réparation (BER, NER et DSBR en particulier) sur le risque de cancer du poumon ont été évalués [116].

2.4.Pertes d'allèles en 3p

Une des altérations génétiques les plus communes dans les carcinomes broncho-pulmonaires, quel que soit leur type histologique, est la perte d'allèles dans la région p14-23 du chromosome 3, observée dans près de 80 % des BNNPC et des BCPC. Cette région chromosomique contient plusieurs candidats gènes-suppresseurs, dont *FHIT*, *RASSF1* et *SEMA3B*. *FHIT* (*Fragile Histidine Triad*) est localisée dans une région chromosomique hautement fragile, propice à la formation de délétions sous l'effet direct des agents cancérigènes de la fumée du tabac [97].

2.5.L'instabilité génique

L'aneuploïdie est un marqueur tardif établi au stade de cancer invasif. L'étude de microsatellites, séquences répétées de nucléotides réparties sur le génome, permet de mettre en évidence des délétions alléliques, ou pertes d'hétérozygotie (LOH: Loss Of Heterozygoty), souvent localisées au niveau de gènes suppresseurs de tumeur impliqués dans le cancer bronchique [115].

2.6.Activation de la télomérase

L'activation de la télomérase permet d'éviter, le raccourcissement des télomères (extrémités des chromosomes) intervenant à chaque réplication du pool génétique lors de la division cellulaire. Ce raccourcissement des télomères est l'horloge biologique qui permet aux cellules de « compter » leurs divisions et ainsi de ne pas croître indéfiniment. En effet, lorsque le télomère atteint une taille critique, la cellule rentre en mort programmée.

Il a été démontré l'activation de la télomérase chez de nombreux cancers, celle-ci permettant ainsi aux cellules de proliférer indéfiniment. L'activation de la télomérase a été mise en évidence dans 85% des BCNPC [116]. De plus, cette activation semble intervenir dans les premiers stades du développement cancéreux indiquant son important rôle dans le développement tumoral [117].

2.7.Modifications épigénétiques :

- **L'hyper-méthylation** est très fréquente dans les cancers bronchiques et de nombreux gènes suppresseurs de tumeur sont hyper-méthylés dans les cancers du poumon (p16, RASSF1, MGMT, E-Cadhérine...). De plus, le degré de méthylation augmente avec la progression

tumorale et c'est un phénomène très précoce lors de l'oncogenèse pulmonaire. Elle pourrait donc servir de marqueur relatif de risque de développer un cancer du poumon en mesurant le nombre de biomarqueurs méthylés comme cela est illustré dans les travaux de *Belinsky* [118].

- **L'acétylation** se fait sur la lysine de l'extrémité C-terminale des histones. Sous la forme hyper-acétylée, la chromatine se décompacte laissant ainsi la place aux facteurs de transcription alors que dans leur forme hypo-acétylée, les histones compactent l'ADN bloquant ainsi la liaison avec ces facteurs. Cette acétylation est régulée par les Histone Dés Acétylases ou HDAC et par les Histones Acétyle-Transférases ou HAT qui sont dérégulées dans les cancers [119]. Un inhibiteur d'HDAC, le SAHA a été montré comme inhibant la prolifération de lignées cellulaires issues de CBNPC [120].

III. MTHFR et polymorphisme génétique C677T

3.1. Structure et localisation du gène *MTHFR*

Le gène *MTHFR* localisé sur le bras court du chromosome 1 dans la région 1p36.3 [121]. Deux promoteurs majeurs du gène *MTHFR* ont été identifiés, promoteur en amont et un autre en aval situés en amont d'un ensemble de site d'initiation de transcription [122]. L'analyse génomique de la séquence du gène *MTHFR* montre que la région promotrice du gène ne contient pas de TATA box. Cependant, elle contient : des îlots CpG et une région CAAT et plusieurs séquences consensus pour les sites de liaison potentiels de facteurs de transcription tels que SP1, AP1 et AP2 [123]. Sur l'exon 1 du gène, il y a un site d'épissage alternatif, la région UTR (UnTranslated Region) est longue, montrant la complexité dans la régulation de ce gène. L'exon 11 contient le codon de terminaison [122], l'extrémité 3' de cet exon a été désignée pour la localisation de multiples sites de poly-adénylation [124].

3.2. Structure et fonction de la protéine MTHFR

La MTHFR est une enzyme clé qui régule le métabolisme des folates [125]. La MTHFR est une flavo-protéine qui convertit irréversiblement le 5,10-MTHF en 5-MTHF, en utilisant le NADPH (Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate) comme agent réducteur (Fig. 13) [135]. Une activité normale de la protéine MTHFR maintient un pool adéquat en folates circulants et prévient de l'augmentation des concentrations de l'homocystéine [127].

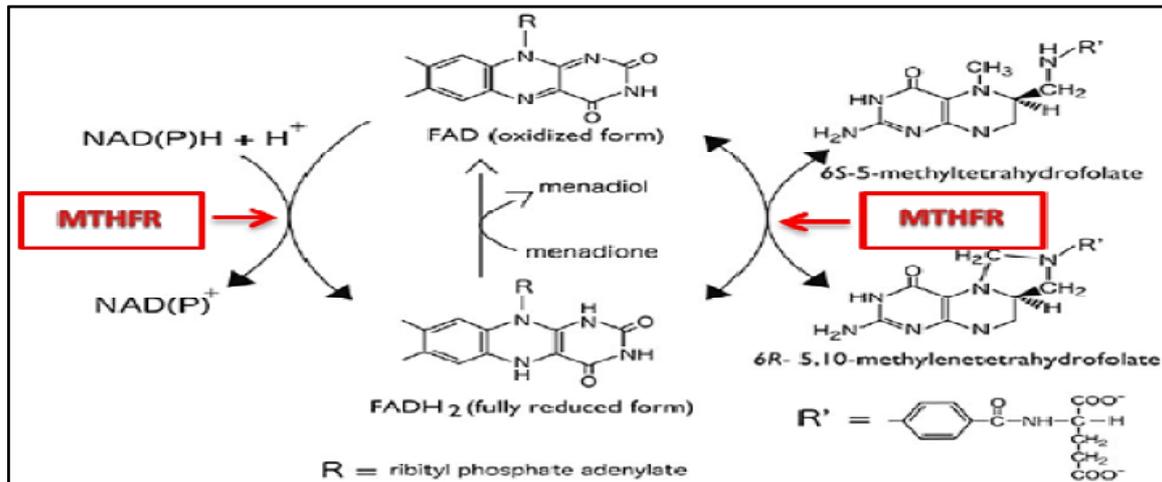


Fig.23 : Réactions catalysées par la MTHFR.

3.3. Polymorphismes du gène *MTHFR*

Plusieurs polymorphismes ont été identifiés dans ce gène jusqu'ici, parmi lesquels, 2 cas sont présentés pour être d'une grande importance dans la littérature. Le polymorphisme C677T, dans l'exon 4, est le plus fréquemment étudié dans ce gène [128]. Les personnes avec le génotype homozygote 677TT de la *MTHFR* ont une activité enzymatique de moins 30 % par rapport à ceux ayant l'allèle sauvage, tandis que l'activité de l'enzyme est de moins 60 % chez les personnes hétérozygote 677CT [129]. Un autre polymorphisme important, bien étudié dans le gène *MTHFR*, est A1298C dans l'exon 7, qui provoque la substitution du glutamate en alanine au niveau du codon 249 [128]. Le polymorphisme A1298C diminue également l'activité de la *MTHFR* mais pas tant que C677T [129]. D'autres polymorphismes ont été identifiés dans le gène codant l'enzyme *MTHFR* comme l'allèle T1317C, qui n'entraîne pas le changement de l'acide aminé dans la protéine, ou l'allèle G1793A résultant de la substitution arginine en glutamine au niveau du codon 594 [128].

▪ Polymorphisme C677T

Frosst Pet al. (1995) ont identifié une mutation commune C677T provenant du remplacement d'une cytosine en position 677 par une thymine, et à l'origine de la substitution d'une alanine par une valine en position 222 [130]. Cet allèle est communément appelée thermolabile parce que son activité diminue au-dessus de 37°C [127]. Le polymorphisme C677T provoque le changement d'acide aminé au niveau du site de liaison du cofacteur de l'enzyme *MTHFR*, le FAD. Ce polymorphisme facilite la séparation de l'enzyme de son cofacteur, et, par conséquent, la diminution de l'activité enzymatique [128]. La fréquence allélique pour l'allèle T est de 30,5 % en Algérie [131].

Les résultats rapportés de diverses études se concentrant sur le rôle du polymorphisme *MTHFR* dans la susceptibilité de différents cancers ont montré des résultats contradictoires : aucune association de la *MTHFR* C677T n'a été trouvée dans le cancer du poumon [132] et d'autres ont démontré qu'il est associé soit à une augmentation soit à une diminution du risque de cancer du poumon [133].

Partie Pratique

Patients et méthodes

Notre étude est une étude moléculaire, concernant 13 patients ayant un CBP confirmé, recrutés au sein du service CAC du CHU de Constantine. Les patients étaient comparés à une population de 16 témoins sains

- 1. Le prélèvement sanguin :** Le prélèvement sanguin destiné à l'extraction de l'ADN est recueilli dans des conditions stériles par ponction veineuse, dans un tube vacutainer contenant de l'EDTA comme anticoagulant, en quantité de 5 ml.
- 2. Étiquetage :** Tous les prélèvements sont étiquetés, portant le nom et le prénom des patients, type histologique du cancer broncho-pulmonaire et date du prélèvement.
- 3. Extraction d'ADN :** L'extraction de l'ADN se fait en trois étapes ; la préparation des leucocytes, l'extraction de l'ADN proprement dit et enfin la solubilisation.
 - a- Préparation des leucocytes :** les leucocytes sont séparés du sang total par lyse hypotonique des globules rouge comme suit ;
 - Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 30 ml avec du TE (Tris-EDTA) 20:5, laisser 10 mn dans la glace « photo1 » (voir annexe pour la composition du TE).



Photo 1 : Tube Falcon de 50 ml(sang +TE)

- Centrifuger 12 mn à 3900 tpm (tours par minute),
- Jeter le surnageant,



Photo 2 : Le culot leucocytaire (1)

- Ajouter 25 ml de TE 20:5 au culot et laisser 10 mn dans la glace, « photo 3 »



Photo 3 :25 ml de TE + culot

- Centrifuger dans les mêmes conditions,
- Jeter le surnageant pour l'obtention d'un culot leucocytaire « photo 4 »



Photo 4 : Le culot leucocytaire (2)

b- Extraction de l'ADN :

- Transvaser le culot des leucocytes dans un tube conique de 15 ml,
- Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot (voir annexe pour la composition du tampon de lyse).,
- Ajouter 200 μ l de SDS (Sodium Dodécyle Sulfate) à 10 %.
- Ajouter 100 μ l de protéinase K à 10 mg/ml,



Photo 5 : Tube conique (culot leucocytaire+tampon de lyse +SDS+PK)

- Dans l'étuve, agiter les tubes sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit
- Le lendemain, refroidir dans la glace 5 mn,
- Ajouter 1 ml de NaCl 4M et agiter vigoureusement à la main,
- Remettre 5 mn dans la glace,
- Centrifuger 12 mn à 3900 tpm,
- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml, ajouter deux fois son volume d'éthanol absolu préalablement refroidi (environ 8 ml) et agiter en retournant le tube plusieurs fois : la pelote d'ADN se forme, « photo 6 »

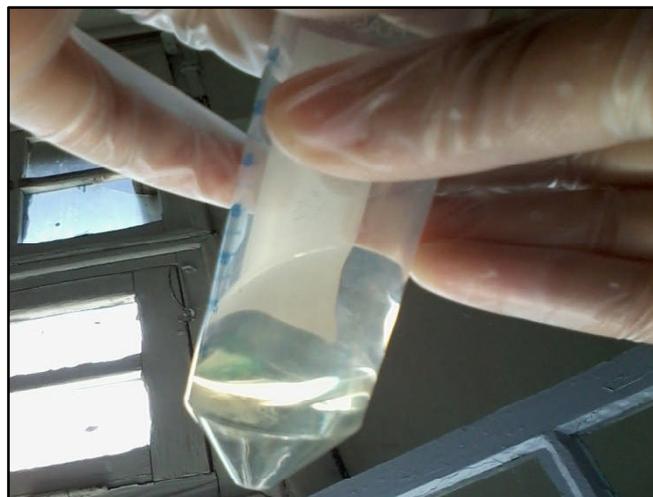


Photo 6 : La pelote d'ADN.

- Récupérer la pelote d'ADN avec une micropipette pasteur et la rincer deux fois dans l'éthanol à 70 %
- Mettre la pelote dans un tube Eppendorfs de 1,5 ml.



Photo 7 : La mise de la pelote dans le tube Eppendorfs.

c- Solubilisation : l'ADN ainsi obtenu est solubilisé en phase aqueuse ;

- Ajouter entre 300 et 1000 μ l d'eau bi-distillée stérile selon la grosseur de la pelote.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à 37° C, puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète (1 à 2 jour).

4. Génotypage de la *MTHFR* :

Le génotypage de la *MTHFR* consiste à amplifier une partie de l'ADN contenant le gène concerné, qui est le gène de la *MTHFR*, puis de différencier les génotypes par digestion à l'aide d'une enzyme de restriction spécifique, qu'est l'HinfI (enzyme de restriction produite par la bactérie *Haemophilus influenzae*). La détermination du génotype a été effectuée en plusieurs étapes successives :

a- La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) : La PCR (Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes : une dénaturation de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, une hybridation des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis une élongation grâce à l'action d'une ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible [138].

- **Préparation du milieu réactionnel de la PCR pour *MTHFR*** : Pour prospecter le polymorphisme C677T de la *MTHFR*, nous avons amplifié par PCR l'exon 4 en utilisant une paire d'amorces spécifiques.

➤ **Matériel :**

- Micropipettes et pointes,
- Eppendorfs[®],
- Vortex,
- Petite centrifugeuse,
- Tubes de PCR,
- Thermocycleur (Techne[®] iCycler).

➤ **Réactifs :**

Les réactifs utilisés pour la préparation du milieu réactionnel de la PCR ainsi que les quantités nécessaires pour chaque tube sont mentionnées dans le tableau ci-dessous. La préparation du milieu réactionnel de la PCR se fait à dans la glace.

Tableau I : Composition du milieu réactionnel de la PCR pour l'amplification de l'exon 4 de la *MTHFR*.

Réactif	Vol/tube (µl)
ADN (~50ng)	1
Tampon 10X (Sans MgCl ₂)	5
deoxyribo-Nucléotide Tri-Phosphate (dNTP) 2Mm	5
MgCl ₂ 50Mm	3
<i>Thermusaquaticus</i> (Taq) Polymérase (Bioline [®] 250U)	0.4
H ₂ O distillée (PPI)	35.2
Amorces (F)	0.2
Amorces (R)	0.2
	50

Les références des amorces utilisées pour l'amplification sont mentionnées dans le tableau ci-dessous.

Tableau II : Amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 4 de la *MTHFR*.

Amorces	Séquence (5'→3')	Nucléotide de départ	Taille de la région amplifiée (pb)
Forward (F)	TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA	770	198
Reverse (R)	AGGACGGTGCGGTGAGAGTG	968	

Tableau III : Programme du Thermocycleur utilisé pour l'amplification de l'amplification.

Processus	Température (°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94	05 minutes	1
Dénaturation	94	30 secondes	30
Hybridation	65	30 secondes	
Élongation	72	40 secondes	
Élongation finale	72	10 minutes	1

a- **Préparation des gels d'agarose** : un gel d'agarose à 2 % a été préparé comme suit :

- Mélanger 100 ml de tampon TBE (Tris Borate EDTA) 1X avec 2 g d'agarose (voir annexe pour la composition du TBE),
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes pendant 4 à 6 minutes jusqu'à ce qu'il devienne homogène et en surveillant pour éviter les projections,
- Ajouter 10 µl de BET (Bromure d'Éthidium), un agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice et qui rendra les ADN fluorescents par exposition aux UV,
- Le gel est ensuite coulé lentement pour ne pas faire des bulles dans le moule de la cuve horizontale,
- Laisser refroidir, enlever le peigne. Le gel sera prêt ainsi pour le dépôt des échantillons.

b- **Contrôle des produits de PCR** : Dans chaque puits du gel, on dépose :

- 10 µl du produit de PCR mélangé avec 3 µl BBP (Bleu de Bromo-Phénol) qui permet de suivre le front de migration.
- Dans l'avant dernier puits on met 10 µl du contenu du tube témoin mélangé avec 3 µl de BBP.
- Dans le dernier puits on met 10 µl de marqueur de taille.
- Les dépôts se font du côté cathode (-).
- Le système est soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 min.
- Cette analyse a pour but de confirmer l'amplification de notre ADN et de contrôler la taille du fragment amplifié et aussi de vérifier une éventuelle contamination de l'ADN au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc (témoin négatif : T).
- Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de BET intercalées entre les bases nucléiques émettent une lumière visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes ayant toutes la même taille de 198 paires de bases.

- c- Digestion des produits de PCR :** L'*HinfI* est une enzyme de restriction extraite à partir de la bactérie *Haemophilus influenzae*, elle reconnaît et clive la séquence G/ANTC en position 222 codant pour l'Alanine. Les produits de la PCR sont incubés pendant une nuit dans un bain Marie à 37 °C afin de permettre la digestion. Après incubation ils sont concentrés au speed-vac pendant quelques minutes
- d- Préparation du gel d'agarose pour la migration :** préparation du gel d'agarose utilisé pour la migration se fait de la même manière que celle décrite précédemment utilisée pour le contrôle des produits de PCR sauf que la concentration de celui-ci est 3 %
- e- Dépôts des échantillons :** après la polymérisation du gel, on plonge le moule dans la cuve horizontale contenant le TBE 1X. On dépose dans chaque puits du gel :10 µl du produit digéré mélangé avec 3µl de BBP.
- f- Migration :** La migration se fait en parallèle avec des fragments d'ADN appelés marqueurs de taille à un voltage de 100 volts. Après environ une heure et demie le gel est soumis au rayon UV.
- g- Profils RFLP obtenus :** Les fragments d'ADN obtenu seront de :
- 198 bases en cas d'absence de la mutation et les fragments d'ADN amplifiés et digérés apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote sauvage (CC),
 - 175 bases s'il y a mutation et les fragments d'ADN apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT),
 - les deux bandes ensemble de 175 bases et 198 bases, correspondent au type hétérozygote (CT),

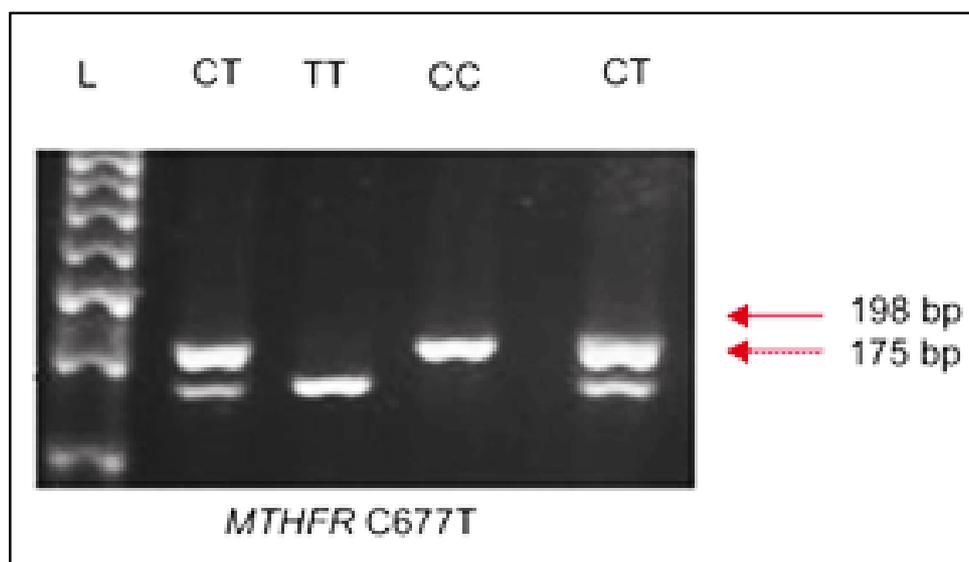


Photo 8 : Profil type de restriction (les 3 génotypes possibles) de la *MTHFR* par l'enzyme de restriction *HinfI*

h- Étude Statistique :

L'étude statistique est de type cas-témoins basée sur le calcul d'*Odds-Ratio*(OR) et la valeur p afin de déterminer s'il existe une association entre le polymorphisme étudié et le risque d'un CBP. Les calculs ont été faits en utilisant le logiciel EPI-info 7.0TM.

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne. L'IC est de 95 % (ou 0,95).

Tableau IV : Tableau de contingence croisé pour une étude cas-témoins.

	Malades	Témoins	Total
Exposés (Présence du facteur préssumé de risque de maladie)	A	B	a + b
Non-exposés (Absence du facteur préssumé de risque de maladie)	C	D	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$\text{OR} = a/b / c/d$$

Pour la valeur p , le seuil critique *à priori* est de 0,05 (vu que l'IC pour l'OR est de 95 %). Si la valeur de p calculée *à posteriori* est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

Partie Pratique

Résultats

1- Étude du polymorphisme C677T de la *MTHFR* :

Nous avons procédé au génotypage de la *MTHFR* conformément au procédé décrit dans le chapitre précédent pour 13 patients recrutés au niveau du service d'oncologie du CHU Ben-Badis entre 01 Avril 2015 et 30 Mai 2015. Une partie des résultats de cette analyse sont mentionnés dans la photo ci-dessous.

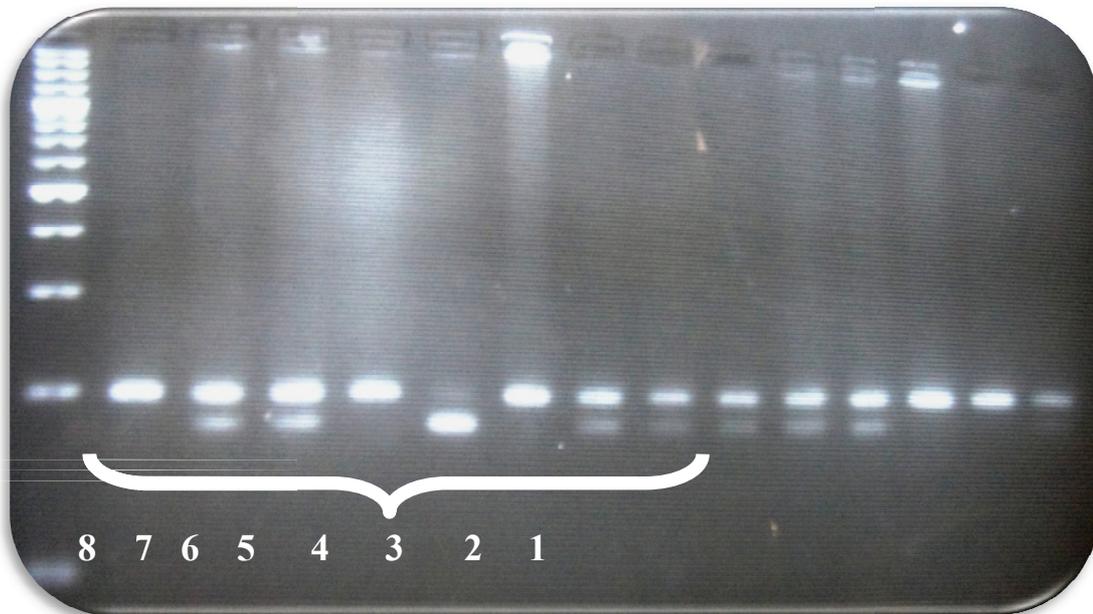


Photo9 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose des fragments obtenus après digestion du produit de PCR du gène de la *MTHFR* par *HinfI* de nos patients.

Pour notre étude cas-témoins, nous avons confronté les résultats du génotypage de la *MTHFR* de nos patients avec ceux d'un pool de témoins (16 individus en bonne santé apparente) de génotype défini (pour le polymorphisme étudié) et recrutés également au niveau du même laboratoire. Les génotypes de la *MTHFR* pour le polymorphisme étudié est mentionné dans le tableau ci-dessous ;

Tableau V : Résultats du génotypage de la *MTHFR* pour notre cohorte (patients et témoins)

	CC	CT	TT	Total
Patients	6	3	4	13
Témoins	8	7	1	16

La lecture des profils d'électrophorèse nous a permis de reconnaître tous les génotypes de la *MTHFR* de nos patients. Les fréquences génotypiques (voir figures24) et alléliques(voir figures25), pour les patients et nos témoins, est mentionnée dans la figure ci-dessous..

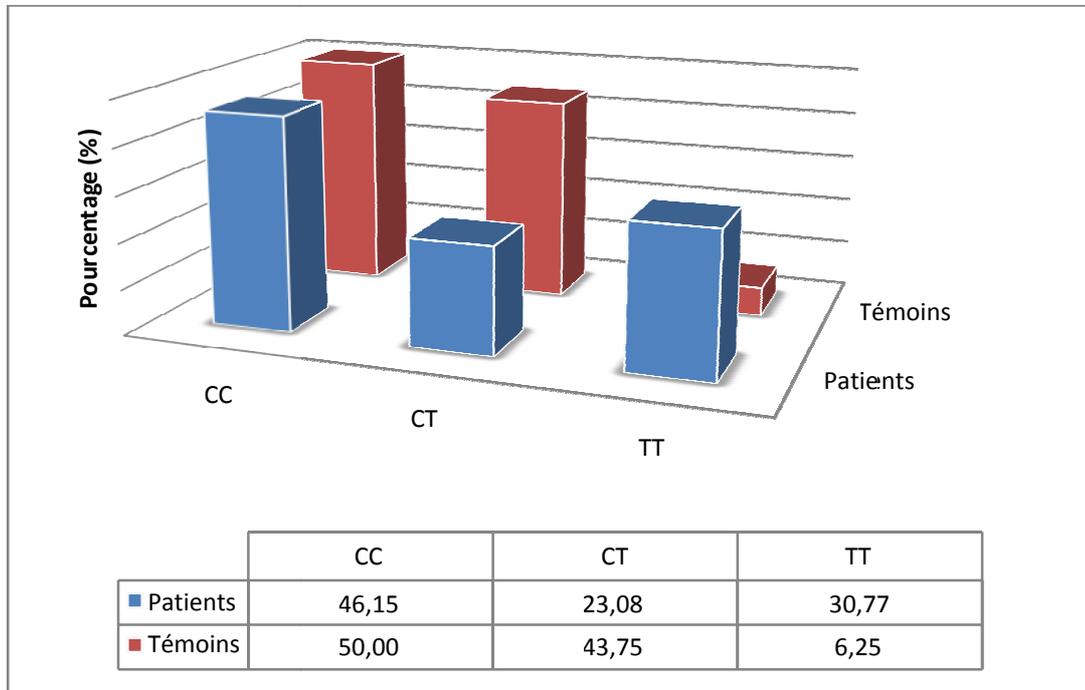


Fig.24: Répartition des différents génotypes de la *MTHFR* pour les patients et les témoins.

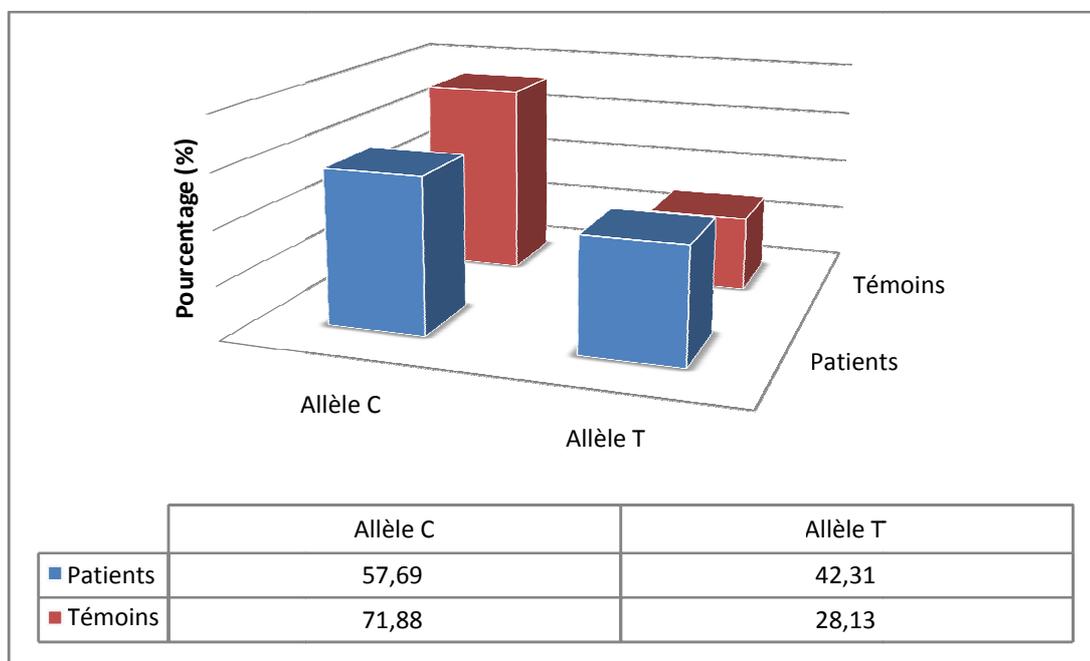


Fig.25: Répartition des deux allèles de la *MTHFR* pour les patients et les témoins.

Les résultats ainsi obtenus ont été traités avec le logiciel Epi-info 7.0 dans le but de prospecter l'association possible entre le facteur de risque étudié (polymorphisme C677T de la *MTHFR*) et l'incidence du cancer broncho-pulmonaire. Les résultats de l'analyse statistique sont mentionnés ci-dessous. (voir tableau VI).

Tableau VI: Étude statistique de l'effet du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans la survenue d'un cancer broncho-pulmonaire.

Effet recherché	OR		Conclusion
	OR (IC 95%)	Valeur <i>p</i>	
Allèle T (T vs C)	1,87 (0,62 - 5,69)	0,394	Pas d'association
Modèle homozygote (TT vs CC)	5,33 (0,46 - 60,79)	0,364	
Modèle récessif (TT vs CC + CT)	6,66 (0,64 - 69,34)	0,213	
Modèle dominant (TT + CT vs CC)	1,16 (0,26 - 5,05)	0,866	

Partie Pratique

Discussion

Discussion

Au cours des 20 dernières années, de nombreuses études ont mis en évidence le rôle de facteurs génétiques dans la survenue de cancers (*Balmain et coll., 2003*) [139]. Les premières études se sont tournées vers l'identification de mutations rares à forte pénétrance, dans des familles présentant une fréquence très élevée de sujets atteints de cancers. On considère néanmoins que la part attribuable à ces mutations dans les cancers familiaux n'excède pas 20 % (*Houlston et Peto., 2004*) [140].

Bien que de nouvelles mutations à forte pénétrance puissent être découvertes pour expliquer la part restante, d'autres modèles considèrent cependant comme plus probable l'existence de mécanismes polygéniques, mettant en jeu de nombreux allèles, conférant chacun un risque faible de cancer.

L'essentiel de nos gènes comporte des variations nucléotidiques simples ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) pouvant modifier l'efficacité biologique des protéines pour lesquels ils codent. Une diminution de cette efficacité pourrait donc moduler le risque de cancer associé à une exposition à des agents toxiques. L'étude de leurs effets dans le développement de cancers, et leurs interactions avec l'exposition aux toxiques, représentent une part importante de la recherche actuelle en épidémiologie des cancers. Ces polymorphismes peuvent avoir un impact important au niveau de la population si leur fréquence est élevée. Par exemple, 20 % des cas de cancer peuvent être attribués à un polymorphisme dont l'effet est faible (OR = 1,5) mais dont la prévalence est élevée (50 % de la population). Cette part attribuable est la même que pour un gène conférant un risque élevé (OR = 5) mais dont la prévalence est faible (5 % de la population) (*Brennan et Coll., 2002*) [141].

Les résultats de plusieurs centaines d'études d'association entre des polymorphismes génétiques relativement fréquents dans la population générale et divers cancers ont été publiés durant les 10 dernières années. En dépit de cet effort considérable, le bilan des connaissances acquises est assez décevant ; à quelques exceptions près, les associations positives mises en évidence n'ont généralement pas été confirmées (le plus souvent faute d'effectif suffisant de la population d'étude) (*Garcia-Closas et coll., 2005*) [142].

Divers polymorphismes génétiques sont associés au cancer du poumon. Ils comprennent des gènes codant pour l'interleukine 1 [143], le cytochrome P450 [144], des promoteurs d'apoptose tels que la caspase 8 [145], et les gènes de réparation de l'ADN telles que l'*XRCC1* [146]. Les porteurs de tels polymorphismes ont plus de risques de développer un cancer du poumon après exposition aux cancérigènes. Plus récemment une autre catégorie de gènes codant pour des enzymes de métabolismes communs a été incriminée ; l'une d'elles est la *MTHFR*. Enzyme clé dans le métabolisme folique, elle catalyse irréversiblement la réduction de la 5, 10 le méthylène

Discussion

tetrahydrofolate en 5 méthyl tetrahydrofolate, la forme circulatoire prédominante de folates, qui sert de cofacteur de substrat à la régénération de la méthionine.

Ce dernier mène à la production de S-adenosylmethionine (SAM); le donneur méthylé universel chez l'homme pour la méthylation d'ADN.

Sur le plan clinique, des études épidémiologiques non confirmées voir parfois controversées, en fonction de la population et de la région géographique, ont rapporté la corrélation du polymorphisme C677T de la *MTHFR* avec plusieurs processus pathologiques (*Ueland et al., 2001*) [148] notamment ceux dépendants du métabolisme des folates. Il s'agit de la schizophrénie (*Muntjewerff, JW et al., 2005; Sazci, A et al., 2003a, 2005b*) [149][150][151]; des maladies cardiovasculaires (*Lewis, S.J et al., 2005; Bennouar N et al., 2007*) [152][153]; les cancers (*Anvesha Srivastava et al., 2008*); les anomalies de développement embryonnaire dont l'insuffisance de fermeture du tube neural (*Botto I et al., 2000*) [154]. L'activité enzymatique réduite peut avoir comme conséquence les niveaux plus bas du SAM et d'un plus grand risque de cancer, y compris le cancer des poumons. *Shenet al* ont examiné l'association entre les polymorphismes du gène de *MTHFR* et le risque de cancer de poumon et a suggéré, pour la première fois, que les polymorphismes C677T et A1298C de la *MTHFR* ne jouent pas un rôle important dans l'étiologie des CBP (*Shenet al. 2001*). Cependant, *Jenga et al* a précisé en 2003 que le C677T réduit le risque de cancer de poumon évoquant ainsi pour la première fois l'effet protecteur de ce polymorphisme.

Le tableau ci-dessous (**voir tableau VII page 54**) résume les principales publications sur l'association du polymorphisme C677T de la *MTHFR* et l'apparition du cancer de poumon (Liste non exhaustive citant uniquement les publications dans lesquelles les fréquences génotypiques et/ou alléliques sont mentionnées ou peuvent être déduites et ceci pour les deux cohortes ; patients et témoins).

Nos résultats sont en accord avec :

- *Shen et al.* (2001) qui, sur une population Caucasienne, sont les premiers à avoir examiné l'effet des polymorphismes du gène de la *MTHFR* et le risque de cancer du poumon et on conclut à l'absence d'association [155].
- *Jeng et al* (2003), en Chine, ont suggéré que le génotype *MTHFR* 677TT réduit le risque de cancer du poumon [156].
- *Shi et al* (2005) ont indiqué que le génotype *MTHFR*677TT a été associé à un risque diminué de façon significative du cancer du poumon chez les femmes, mais pas chez les hommes [157].
- *Suzuki et al*, (2007), au Japon, n'ont apporté aucune preuve précisant le rôle des polymorphismes de *MTHFR* C677T dans la carcinogenèse broncho-pulmonaire [158].

Discussion

- **Lui et al** (2008), en Chine, n'ont pas trouvé d'association entre *MTHFR* C677T et le développement d'un CBP [159].
- **Cui et al** (2011), dans une étude cas-témoins en Corée du sud, ont trouvé un effet protecteur du variant allélique T de la *MTHFR* contre le développement de cancer épidermoïde du poumon [160].
- Dans l'ensemble, les génotypes 677TT et 677CT n'étaient pas significativement associés au risque de cancer du poumon par rapport au génotype 677CC. Il n'y avait aucune preuve d'une association entre *MTHFR* et le risque de cancer du poumon pour le polymorphisme étudié. Il n'y avait pas de preuve d'un effet interactif entre un faible apport en acide folique et les génotypes *MTHFR* sur le risque de cancer du poumon même si très peu d'études ont tenu compte du statut du métabolisme des folates.

Cela est en contradiction avec les travaux des équipes suivantes, qui ont décrit une association entre le variant C677T et le risque d'un CBP :

- **Siemianowicz et al** (2003), en Pologne, ont montré que les personnes ayant un génotype TT de la *MTHFR* avaient un risque de cancer du poumon augmenté par rapport à ceux avec le type sauvage homozygote [161].
- **Zhang et al.**,(2005) ont indiqué que le polymorphisme étudié est associé au plus grand risque de cancer de poumon dans la population chinoise[162].
- **Shen et al**, (2005), en Chine, ont démontré que le génotype *MTHFR* 677T augmente le risque de cancer du poumon [163].
- **Hung et al.**(2007),dans une étude sur une grande cohorte de la population d'Europe centrale (2169patients et 2803témoins),ont observé un effet modéré du polymorphisme C677Tde la *MTHFR* sur le risque de contacter un cancer de poumon[164].
- **Cheng et al** (2011) ont constaté que le variant C677T de la *MTHFR* montre une association significative avec la prédisposition au cancer du poumon chez les fumeurs et ont constaté que les porteurs homozygotes TT hommes avaient un risque de 36% plus élevé que celui observé dans la population générale [165].

D'autre part, certaines études ont démontré des rôles protecteurs pour les deux variant C et T

- Le variant C677T de *MTHFR* réduit le risque de cancer du poumon [159].
- Dans une étude, en Taiwan, les génotypes CT et TT en association avec le tabagisme confèrent une diminution du risque de CBP suggérant ainsi un effet protecteur de l'allèle T [156].

Discussion

Depuis environ 30 ans, la recherche sur un possible facteur de risque alimentaire dans le cancer bronchique a vu le jour, mais reste un sujet très controversé. La plupart des recherches dans ce domaine sont basées sur le rôle antioxydant de certains aliments (fruits, légumes, sélénium, vitamine C, caroténoïdes, thé) qui diminuerait les lésions de l'ADN [166].

L'étude de *Galéone et al* a enrôlé 218 cas de cancer bronchique entre 1987 et 1990 et a montré qu'il y avait un effet protecteur des légumes. Dans cette étude, les fumeurs avec de faibles apports en légumes et en fruits avaient respectivement 6 fois plus de risque et 4 fois plus de risque de cancer bronchique que les non-fumeurs avec de forts apports en ces nutriments [167]. En tant qu'aliments très riches en folates, les fruits et légumes fournissent un apport adéquat et par la même occasion une protection constante contre le cancer du poumon [168]. Il serait intéressant dans des études futures menées sur l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR* survenue du CBP de tenir compte du statut du métabolisme des folates conditionné essentiellement par l'apport alimentaire en cet élément.

Il est intéressant de noter que la supplémentation en acide folique pourrait influencer les niveaux d'homocystéine plasmatique. Une étude suggérait que les individus homozygotes pour l'allèle variant C677T de la *MTHFR* tendaient à avoir des niveaux d'homocystéine plasmatique normaux lorsque l'apport de folates était adéquat (*Rozen et al. 1997*). Un apport suffisant en folates réduirait ainsi l'impact de la baisse d'activité de l'enzyme due au polymorphisme sur la méthylation de l'ADN ou l'incorporation de l'uracile dans l'ADN (*Blount et al., 1997*). Certains auteurs suggèrent que le polymorphisme C677T pourrait ainsi réduire le risque de cancer si la prise de folates est adéquate ou, au contraire, augmenter le risque de cancer si la prise de folates est inadéquate (*Kim et al., 2000*).

Avant de formuler toute affirmation concernant une probable association, il est utile de tenir compte également d'une éventuelle association subtile de type gène-gène ; En effet, tout déficit portant sur l'un des systèmes enzymatiques impliqués dans le métabolisme des folates peut avoir un effet potentiellement cancérogène. Les cinq polymorphismes les plus communs des gènes impliqués dans le métabolisme des folates sont : la *MTHFR* (C677T et A1298C), la méthionine synthase (*MTR*) A2756G, la méthionine synthase réductase (*MTRR*) A66G et la Cystathionine B-Synthase (*CBS*) 844ins68. De plus, un polymorphisme portant sur une protéine de transport de la vitamine B12, la transcobalamine (*TCN II*) C776G, a été rapporté et peut également s'associer à une perturbation du métabolisme folique. Des études d'association de l'effet combiné de ces polymorphismes (haplotypes) doivent être menées.

Les différentes études réalisées de par le monde ont montré une distribution très hétérogène du polymorphisme C677T de la *MTHFR* et correspond à des variations ethniques et régionales dans

Discussion

différentes populations et selon un gradient croissant Nord-sud, notamment en Europe et en Amérique du Nord. De ce fait, l'origine ethnique est un facteur de première importance dans l'interprétation des résultats d'une étude de type cas-témoins sur l'impact de ce polymorphisme et ce pour toute pathologie étudiée.

Tableau VII : Liste des publications (PubMed) sur l'association du polymorphisme C677T de la *MTHFR* est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats.

N°	Référence	Ethnie	Patients						Témoins						Résultats obtenus sur l'association
			Cohorte	CC (%)	CT (%)	TT (%)	C (%)	T (%)	Cohorte	CC (%)	CT (%)	TT (%)	C (%)	T (%)	
1	<i>Shen et al., 2001</i>	Caucasien (USA)	550	43,82	45,82	10,36	66,73	33,27	554	44,22	45,49	10,29	66,97	33,03	-
2	<i>Jeng et al., 2003</i>	Chinoise	59	61,02	37,29	1,69	79,66	20,34	232	53,02	40,95	6,03	73,49	26,51	-
3	<i>Siemianowicz et al., 2003</i>	Polonaise	146	26,03	41,10	32,88	46,58	53,42	44	40,91	45,45	13,64	63,64	36,36	+
4	<i>Zhang et al., 2005</i>	Chinoise	505	23,76	45,54	30,69	46,53	53,47	500	32,00	46,20	21,80	55,10	44,90	+
5	<i>Shen et al., 2005</i>	Chinoise	116	28,45	56,03	15,52	56,47	43,53	111	47,75	37,84	14,41	66,67	33,33	+
6	<i>Shi et al., 2005</i>	Caucasien (USA)	1051	45,96	44,53	9,51	68,22	31,78	1141	43,65	45,49	10,87	66,39	33,61	-
7	<i>Suzuki et al., 2007</i>	Japonaise	515	35,34	49,71	14,95	60,19	39,81	1030	36,80	46,02	17,18	59,81	40,19	-
8	<i>Hung et al., 2007</i>	Européenne	2169	46,52	42,83	10,65	67,93	32,07	2803	49,84	40,92	9,24	70,30	29,70	+
9	<i>Liu et al., 2008</i>	Chinoise	500	31,40	49,00	19,60	55,90	44,10	517	28,82	51,26	19,92	54,45	45,55	-
10	<i>Liu et al., 2009</i>	Chinoise	358	57,26	34,64	8,10	74,58	25,42	716	50,56	40,64	8,80	70,88	29,12	-
11	<i>Yao et al., 2010</i>	Chinoise	93	29,03	49,46	21,51	53,76	46,24	106	33,96	48,11	17,92	58,02	41,98	+
12	<i>Yang et al., 2010</i>	Chinoise	120	40,83	43,33	15,83	62,50	37,50	165	37,58	45,45	16,97	60,30	39,70	+
13	<i>Cui et al., 2011</i>	Corée du sud	438	13,24	54,79	31,96	40,64	59,36	641	18,88	50,70	30,42	44,23	55,77	-
14	<i>Cheng et al., 2011</i>	Chinoise	178	27,53	32,58	39,89	43,82	56,18	180	26,11	48,89	25,00	50,56	49,44	-
15	<i>Ma et al., 2012</i>	Chinoise	120	16,67	45,00	38,33	39,17	60,83	60	36,67	46,67	16,67	60,00	40,00	-
16	<i>Notre étude (2015)</i>	Algérienne	13	46,15	23,08	30,77	57,69	42,31	16	50,00	43,75	6,25	71,88	28,13	-

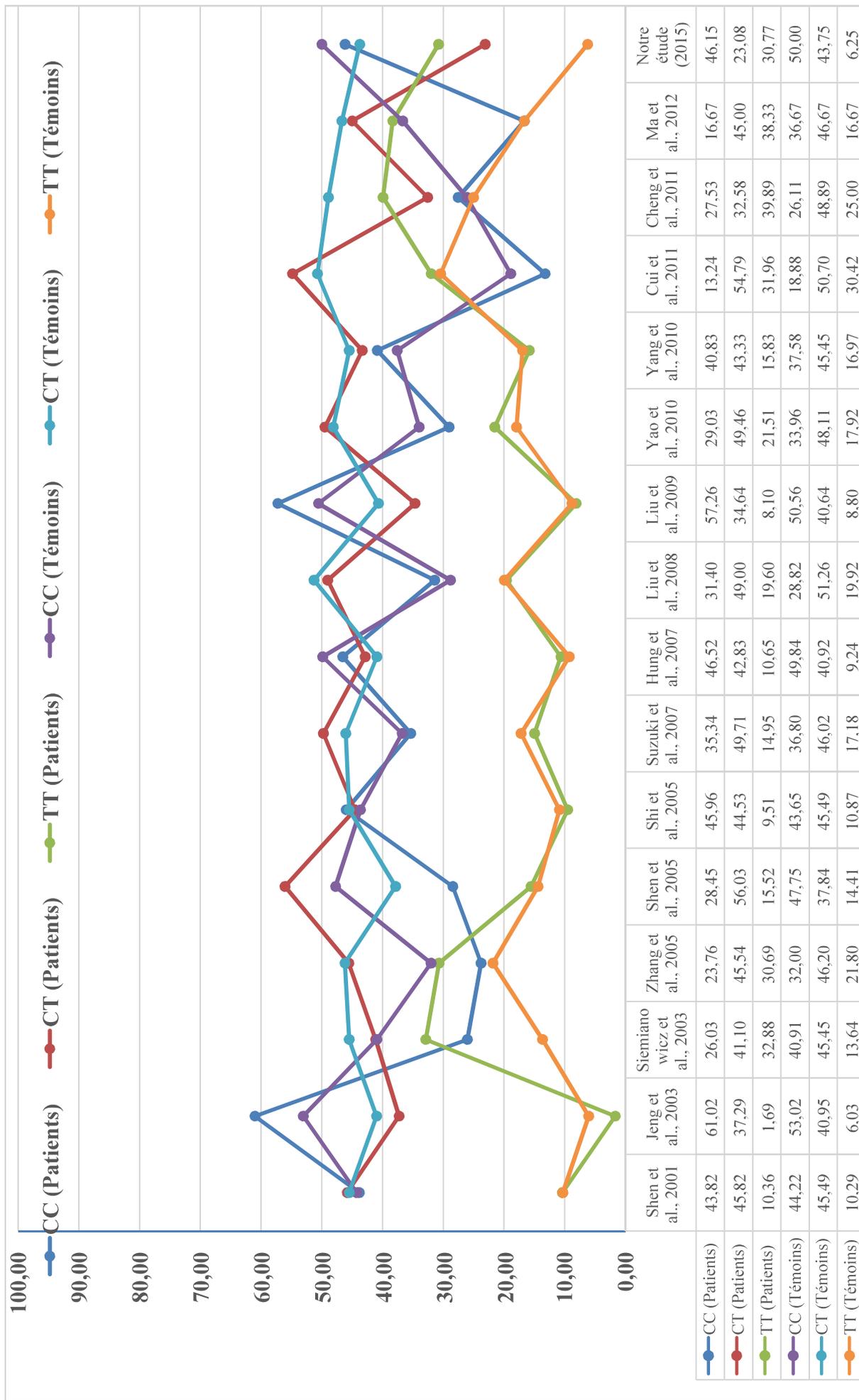


Fig.27 : Représentation graphique des fréquences génotypiques (CC, CT et TT) d'études menées sur l'association du polymorphisme C677T de la *MTHFR* est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats.

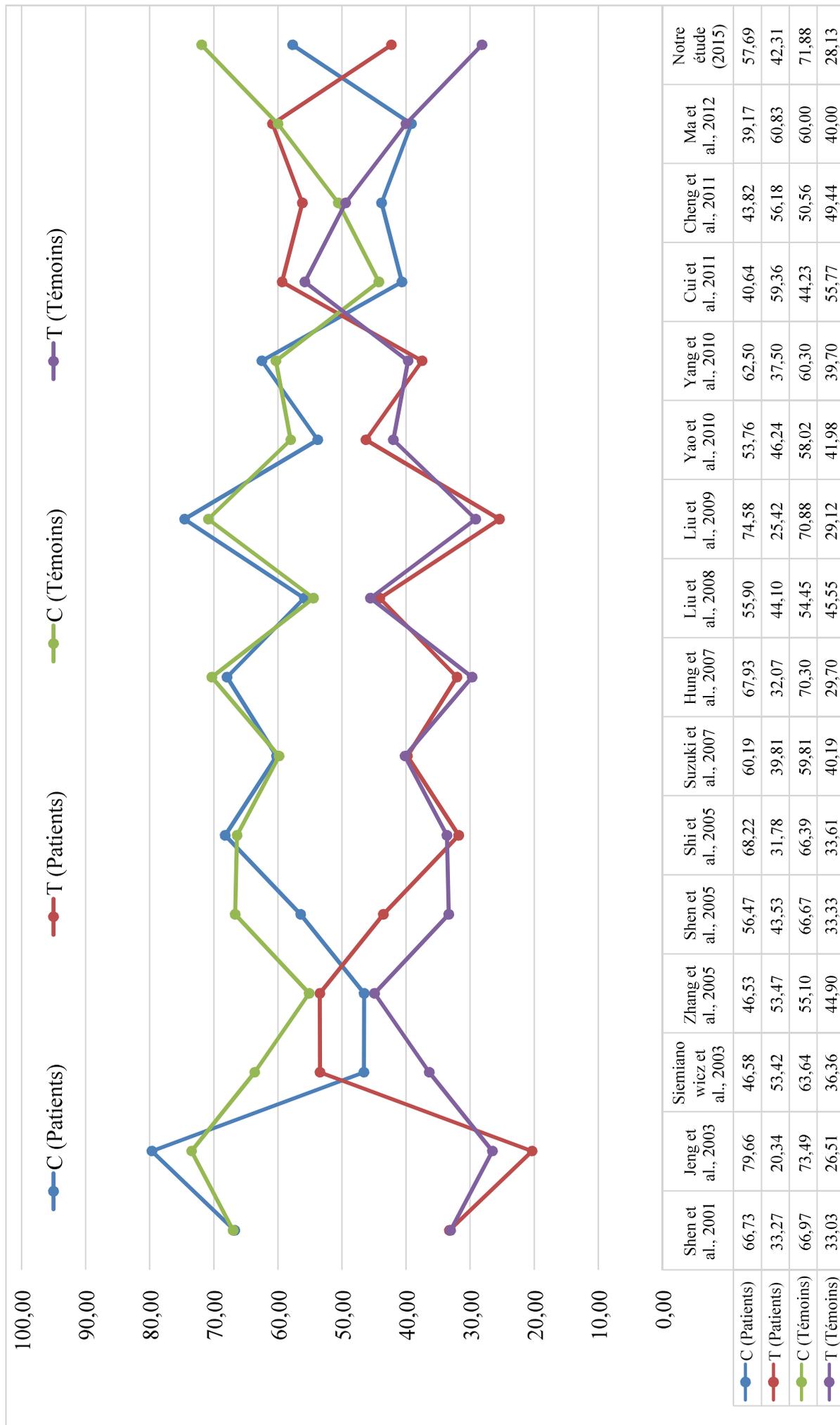


Fig.28 : Représentation graphique des fréquences alléliques (C et T) d'études menées sur l'association du polymorphisme C677T de la *MTHFR* est le risque de développement d'un cancer broncho-pulmonaire en comparaison avec nos résultats.

Conclusions et perspectives

Le CBP est un véritable problème de santé publique car son incidence ne cesse de croître surtout chez les femmes. En effet, c'est la première cause de mortalité par cancer dans le monde, la survie à 5 ans n'est que de 15% et ceci est largement dû à des diagnostics tardifs et à un fort pouvoir métastatique. L'amélioration de la prise en charge de ce type de cancer implique donc une meilleure connaissance des processus d'oncogenèse et d'invasion tumorale.

Dans cette démarche, nous avons essayé par une enquête de type cas-témoins de prospecter l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR*, souvent rapporté dans la bibliographie comme facteur de risque établi ou suspecté, dans la survenue du CBP sur un échantillon de la population Algérienne (13 patients et 16 témoins).

Après génotypage de la *MTHFR* obtenus par PCR/Digestion et révélés sur les profils électrophorétiques, l'étude statistique n'a montré aucune association significative entre l'incidence de CBP et le polymorphisme C677T de la *MTHFR*. Cependant, et faute d'effectifs suffisant, ces résultats ne peuvent conclure à l'absence de relation entre le polymorphisme étudié et l'apparition de CBP. S'ajoute à cela les données contradictoires rapportées par la bibliographie concernant l'effet de ce polymorphisme dans la survenue du CBP.

Après une recherche bibliographique approfondie sur le sujet et à la lumière des résultats obtenus, il paraît clair que la constitution génétique joue un rôle prépondérant dans le développement du CBP. Cependant, la contribution exacte de chaque gène dans la cancérogenèse pulmonaire reste difficile à estimer. La *MTHFR*, de par sa position centrale dans le métabolisme des folates, peut être un candidat idéal de gènes dont l'altération (ou le polymorphisme) est susceptible de contribuer au développement du CBP. Néanmoins, toute étude visant à mettre en évidence l'effet de ce polymorphisme doit tenir compte de la présence d'autres variant alléliques de gènes impliqués dans le métabolisme des folates ou d'autres voies métaboliques susceptibles d'être intriquées avec cette dernière. Il ne faut pas perdre de vue également l'apport alimentaire en folates dont la source est essentiellement la consommation de fruits et de légumes. Un apport adéquat pourrait masquer l'effet d'un polymorphisme délétère de la *MTHFR*. Malheureusement, cet apport n'est pas toujours garanti et est fonction du niveau de vie.

Il serait intéressant dans l'avenir de poursuivre l'étude de l'influence du polymorphisme C677T de la *MTHFR* dans l'étiologie du CBP en utilisant un échantillon de taille suffisante et en tenant compte de l'origine ethnique et du statut du métabolisme des folates en interaction avec des facteurs génétiques et environnementaux.

References Bibliographiques

1. FERLAY J, SHIN, HR, BRAY F, et al.(2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*;127:2893-917.
2. KARIM, H. VRIES, E., SOERJOMATARAM, et al. (2008). Recent trends of cancer in Europe: a combined approach of incidence, survival and mortality for 17 cancer sites since the 1990s. *Eur J Cancer* 44, 1345-1389.
3. HANAHAN D, WEINBERG RA.(2000) The hallmarks of cancer. *Cell*, 100 : 57-70
4. Sun, S., J.H. Schiller, and A.F. Gazdar, ,(2007).Lung cancer in never smokers--a different disease. *Nat Rev Cancer*. 7(10): 778-90.
5. WHEATER, P.YOUNG, B.HEATH. J. (2001).Histologie fonctionnelle, Bruxelles, Boeck et larcier, 413p, p222.
6. SHERWOOD, L. (2006) .Physiologie humaine, Bruxelles, Boeck, ,616p, p367.
7. LACOMBE L. (2000), Précis d'anatomie et de physiologie, Edition Lamarre, (28^{ème} édition) ,10 : 92-101
8. ALAIN, R, SYLVIE, T. (2009) Anatomie et physiologie, Paris, Elsevier Masson, 318p, p189-196
9. http://www.ligue-cancer.net/sites/default/files/img_poumons1.gif Consulté le : 14/04/2015
10. <https://www.ponroy.com/image/400x334/public/CONSEILS%20SANTE/DEFENSES%20NATURELLES/respirer.jpg> Consulté le : 14/04/2015
11. <https://www.ponroy.com/image/400x334/public/CONSEILS%20SANTE/DEFENSES%20NATURELLES/respirer.jpg> Consulté le : 14/04/2015
12. <http://www.utc.fr/tsibh/public/3abih/10/stage/gromczyk/index.html> Consulté le : 14/04/2015
13. CHATER, Asma. 2014. Thèse de doctorat : « Cancer broncho pulmonaire et thérapeutique », Algérie, université Abou Bekr Belkaid de Tlemcen, 120p, p1-p19.
14. WISSLER, MariePierre. Thèse de doctorat : « bilan de l'analyse du statut mutationnel EGFR de 1000 patients atteints d'adénocarcinomes pulmonaires pris en charge par la plateforme d'oncologie moléculaire du CHU_CAV de Nancy, Université de Lorraine », université de nancy, 2012,113p, p13-14.
15. HANAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000, 100 : 57-70
16. BRAMBILLA E, GOUYER V, GAZZIERI S, et al. Mécanismes de la carcinogénèse bronchique. *Encycl Med Chir (Elsevier, Paris), Pneumologie*, 6-002-G25, 1996, 12p
17. GROUSSARD, O, DASTE, G. (2001), « Anatomie pathologique des cancers broncho-pulmonaires », éditions scientifiques et médicales Elsevier, vol.17, n°6p.7.
18. SHIMOSATO Y, KODAMA T, KAMEYA T. (1982),Morphogenesis of peripheral type adenocarcinoma of the lung. In : Shimosato Y, Melamed MR, Nettesheim P, eds. *Morphogenesis of lung cancer*, vol 1 Boca Raton, KL : CRC Press : 65- 90.
19. D. Travis, W., (2004),Pathology and genetics of tumours of the lung, pleura, thymus and heart - Page 305. p. 344.
20. Depierre A. (2006), *Cancers broncho-pulmonaires, mise au point*. Montrouge : Edition John Libbey ; 212
21. THUN MJ, Lally CA, FLANNERY JT, Calle EE, Flanders WD, Heath CW Jr. Cigarette smoking and changes in the histopathology of lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1580-1586.
22. MOREAU D. Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules pharmaco-modulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de doctorat. Nantes, 2006 ; 1-65.
23. LABABEDE, O., MEZIANE, M. A. and Rice, T. W. (1999).TNM staging of lung cancer: a quick reference chart. *Chest*; 115 (1): 233-5.
24. SPIRO, S. G. and Porter, J. C. (2002).Lung cancer--where are we today? Current advances in staging and nonsurgical treatment. *Am J Respir Crit Care Med*; 166 (9): 1166-96.

25. DEPERRE A. Cancers broncho-pulmonaires, mise au point. Montrouge : Edition John Libbey ,2006 ; 212
26. TRAVIS WD, BRAMBILLA E, NOGUCHI M, (2008), et al. International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society: international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma: executive summary. Proc Am Thorac Soc 2011;8:381-5.
27. BEGUERET, H. « Anatomie pathologique des cancers broncho-pulmonaires », Elsevier Masson, vol.23, n°6p.14.
28. STURM N, ROSSI G, LANTEUEJOUL S,et al .(2003)34BetaE12 expression along the whole spectrum of neuroendocrine proliferations of the lung, from neuroendocrine cell hyperplasia to small cell carcinoma. Histopathology., 42:156-66.
29. KEITH RL, MILLERYE, GEMMILL RM, et al.(2000) Angiogenic squamous dysplasia in bronchi of individuals at high risk for lung cancer. Clin Cancer Res, 6: 1616-1625.
30. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E, et al .(2008)Cancer statistics. CA Cancer J Clin 2008;58:71-96.
31. Dr. F. Agag; (2012)Epidémiologie des Cancers; établissement hospitalier universitaire d'Oran; service d'épidémiologie et de médecine préventive; décembre ; p16.
32. JEMAL A, TRAVIS WD, TARONE RE,et al .(2003) Lung cancer rates convergence in young men and women in the United States: analysis by birth cohort and histologic type. Int J Cancer;105:101-107.
33. YOULDEN DR, CRAMB SM, BAADE PD. (2008) The international epidemiology of lung cancer geographical distribution and secular trends. J Thorac Oncol;8:819-831.
34. M.Hamdi Cherif.Z.Zaidi et al.2010.Registre du cancer du Sétif(Algérie) : incidence, tendance et survie, 1986-2005.J.Afr.cancer2 :245-258.
35. THIBERVILLE, L. and C. Paris (2004). "Epidémiologie et facteurs de risque des cancers bronchiques primitifs." EMCpneumologie 1(1): 7-18
36. MOREAU D. (2006) Étude de nouvelles cibles moléculaires de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules pharmaco-modulées par des substances originales naturelles et synthétiques. Thèse de doctorat. Nantes; 1-65.
37. THUNMJ, HENLEY SJ, CALLE EE.(2002) Tobacco use and cancer: an epidemiologic perspective for geneticists. Oncogene;21:7307-7325.
38. ALBERG AJ, Ford JG, SAMET JM. (2007)American College of Chest Physicians. Epidemiology of lung cancer: ACCP evidence-based clinical practice guidelines. Chest;132:29S-55S.
39. TYNCZNSKI JE, BRAY F, PARKIN DM. (2000) Lung cancer in Europe in 2000: epidemiology, prevention,
40. 27. VINEIS P, PERERA F.(1988); DNA adducts as markers of expo-sure to carcinogens and risk of cancer. Int J Cancer;88:325-328.
41. 29. JEMAL A, SIEGEL R, WARD E.et al . (2006)Cancer statistics, 2006. CA Cancer J Clin;56:106-130.
42. WIRTHN, BOHADANA A, SPINOSA A,et al . (2009) Les pathologies respiratoires liées au tabagisme passif. Rev Mal Respir;26(6):667-78.
43. ZHONG L, GOLDBERGMS, PARENT ME,et al . (2000)Exposure to environmental tobacco smoke and the risk of lung cancer : a meta-analysis. Lung Cancer.;27(1):3-18.
44. GAMBLE J. (2010)Lung cancer and diesel exhaust : a critical review of the occupational epidemiology literature. Crit Rev Toxicol;40(3):189-244.
45. . GUHA N, MERLETTIF, StEENLAND NK,et al . (2010) Lung cancer risk in painters : a meta-analysis. Environ Health Perspect.;118(3):303-12.
46. DARBY S, HILL D, AUVINEN A, et al.(2005) Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. BMJ;330:223.
47. BOFFETTA P. (2006) Human cancer from environmental pollutants: The epidemiological evidence. Mutat Res-Gen Tox En.;608(2 Special Issue SI):157-62.
48. OISSON AC, FEVOTTE J, FIETCHER T, et al.(2010)Occupational exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and lung cancer risk : a multicenter study in Europe. Occup Environ Med.;67(2):98-103.
49. IARC (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER). HAP. IARC Monographs on evaluation to carcinogenic risks to humans, Lyon, France, 2006.
50. BESSO, A., NYBERG, F. & PERSHANGEN, G. (2003). Air pollution and lung cancer mortality in the vicinity of a nonferrous metal smelter in Sweden. International Journal of Cancer, 107, 448-452.

51. GRULICH AE, WAN X, LAW MG, et al. (1999) Risk of cancer in people with AIDS. *Aids*;13:839—43.
52. SAVES M, CHENE G, DUCIMETIEREP, et al.(2003)Risk factorsfor coronary heart disease in patients treated for human immunodeficiency virus infection compared with the general population. *Clin Infect Dis*;37:292—8.
53. ENGELES EA, BROCK MV, CHEN J, et al.(2006) Elevated incidence of lung cancer among HIV-infected individuals. *J Clin Oncol*;24:1383—8.
54. REEEKIE J, KOSA C, ENGSIG F, et al. (2010) Relationship between current level of immunodeficiency and non-acquired immunodeficiency syndrome-defining malignancies. *Cancer*;116:5306—15.
55. FONG KM, MINNA JD. (2002) Molecular biology of lung cancer: clinical implications. *Clin Chest Med*.;23(1):83-101.
56. TRAVISWD, BRAMBILLA E, MULLER HK.(2004) ;WHO classification of tumours. *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart*. IARC Press: Lyon 2004.
57. PFEIFER GD, DENISSENKO MF, OLIVIER M,et al . (2002)Tobacco smoke carcinogens, DNA-damage and p53 mutations in smoking-associated lung cancers. *Oncogene*, 21 : 7435-7451
58. PAO W, MILLER VA. (2005) Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and nonsmall- cell lung cancer: current knowledge and future directions. *J Clin Oncol*;23:2556-68
59. TANG X, SHIGEMASTSU H, BEKELE BN, et al. (2005) EGFR tyrosine kinase domain mutations are detected in histologically normal respiratory epithelium in lung cancer patients. *Cancer Res*;65:7568-72
60. SHIGEMASTSU H, GAZDARAF.(2006) Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*;118:257-62
61. BRONTE, G., et al. (2010), Driver mutations and differential sensitivity to targeted therapies: a new approach to the treatment of lung adenocarcinoma. *Cancer Treat Rev.*, 36 Suppl 3: p. S21-9.
62. MITSUMI, T; YATABE. (2009)Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*, 277(2): p. 301-8.
63. Gazdar, A.F. (2009) Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lungcancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*,.28 Suppl 1: p. S24-31.
64. PAEZ JG, JANNE PA, LEE JC, et al.(2004) ; EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*;304:1497-500
65. RIELY GJ, MARKS J, PAO W. (2009) KRAS mutations in non-small cell lungcancer. *Proc Am Thorac Soc*;6:201-5.
66. BOURNE HR,SANDERS DA, MCCORMICK F.(1991) ; The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature*,349: 117-27.
67. LINARDOU H, DAHABREH IJ, KANALOUPTID, et al. (2008);Papadimitriou CA, Murray S. Assessment of somatic k-RAS mutations as a mechanism associated with resistance to EGFRtargeted agents: a systematic review and meta-analysis of studies in advanced non-small-cell lung cancer and metastatic colorectal cancer. *The Lancet Oncology*Oct;9(10):962-972.
68. MARCHETTI A. et al.(1996). Bronchiolo-alveolar lung carcinomas: K-ras mutations are constant events in the mucinous subtype. *J Pathol.*, 179(3): p. 254-9.
69. GREENBLATT MS, BENNETT WP, HOLLSTEIN M. et al. (1994); Mutations in the p53 tumor suppressor gene : clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*, 54: 4855- 4878.
70. MAZIERES J and al. (2012) ;les mutations de HER 2 dans les cancers bronchiques : caractéristiques et perspectives thérapeutiques *Rev Mal Respir.*, 4 ; 657-660
71. MAZIERES J et al. (2013) Lung cancer that harbors a HER2 mutation: epidemiological characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. Jun 1;31(16):1997-2003.
72. TOMIZAWA, K., et al. (2011);Prognostic and predictive implications of HER2/ERBB2/newgene mutations in lung cancers. *Lung Cancer.*, 74(1): p. 139-44.
73. ZIEGLER A, LUEDKE GH, FABBRO D,et al . (1997)Induction of apoptosis in small-cell lung cancer by an antisense oligodesoxynucleotide targeting the Bcl-2 coding sequence. *J Natl Cancer Inst*, 89: 1027-1036.

74. PAO, W. Girard,(2011). New driver mutations in non-small-cell lung cancer. *Lancet Oncol*, 12(2): p. 175-80.
75. GEOFFREY R. OXNARD, ADAM B, et al. (2013) New Targetable Oncogenes in Non-Small-Cell Lung Cancer *J Clin Oncol* 31:1097-1104.
76. SCAGLOTTI, G, et al. (2010). Phase III study of carboplatin and paclitaxel alone or with sorafenib in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28(11): p.1835-42.
77. CORSO S, MIGLIORE C, GHISO E, et al. (2008) Giordano S. Silencing the MET oncogene leads to regression of experimental tumors and metastases. *Oncogene* janv;27(5):684-693.
78. BEAN J, BRENNAN C, SHIH J-Y, et al.(2007) ; MET amplification occurs with or without T790M mutations in EGFR mutant lung tumors with acquired resistance to gefitinib or erlotinib. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. déc*;104(52):20932-20937.
79. LEE S, KIM Y, SUN J-M, et al . (2011) août. Molecular profiles of EGFR, K-ras, c-met, and FGFR in pulmonary pleomorphic carcinoma, a rare lung malignancy. *J. Cancer Res. Clin. Oncol*;137(8):1203-1211.
80. SODA, M., et al.(2007) ; Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in nonsmall- cell lung cancer. *Nature.*, 448(7153): p. 561-6.
81. SHAW, A.T., et al., Clinical features and outcome of patients with non-small-cell lung cancer who harbor EML4-ALK. *J Clin Oncol*. 27(26): p. 4247-53.
82. MITSUDOMI, T. and Y. Yatabe, (2009) Epidermal growth factor receptor in relation to tumor development: EGFR gene and cancer. *FEBS J*. 277(2): p. 301-8.
83. JOKOJI, R., et al. (2010) ;Combination of morphological feature analysis and immunohistochemistry is useful for screening of EML4-ALK-positive lung adenocarcinoma. *J Clin Pathol.*, 63(12): p. 1066-70.
84. BERGETHON K et al. (2012) Mar ; ROS1 rearrangements define a unique molecular class of lung cancers. *J Clin Oncol*. 10;30(8):863-70
85. CADRANEL. (2013) .Crequit P Ruppert and col Mutation de l'EGFR, de l'étude du gène à la pratique clinique : exemplarité ou exception *Rev mal resp*5,519-537
86. WANG R, HU H, PAN Y, et al. (2012);RET fusions define a unique molecular and clinic-pathologic subtype of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*;30:4352-60.
87. GAZZERI S, BRAMBILLA E, CARON ;et al. (1994) p53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinoma. *Int J Cancer*, 58:24-32.
88. DLAMINI Z, MBITA Z, ZUNGU M .(2004). Genealogy, expression, and molecular mechanisms in apoptosis. *Pharmacol Ther* 101: 1-15.
89. WOODS, D, Vousden, K.H. (2001). Regulation of p53 function. *Exp Cell Res* 264, 56-66.
90. VOGELSTEIN, B., Lane, D, Levine, A.J. (2000). Surfing the p53 network. *Nature* 408, 307-310.
91. LE CALVEZ F, MUKERIA A, HUNT JD, et al. (2005) ; TP53 and KRAS mutation load and types in lung cancers in relation to tobacco smoke: distinct patterns in never, former, and current smokers. *Cancer Res*, 65 : 5076-5083
92. SOUSSI T, DEHOUCHE K, BEROUD, C; (2000). p53 website and analysis of p53 gene mutations in human cancer: forging a link between epidemiology and carcinogenesis. *Hum Mutat* 15: 105- 13.
93. BREY J, SOLARY E, EYMIN B. (2001) p73, nouveau médiateur de l'apoptose *Médecine/Sciences*, 17 :647-9.
94. SHIGEMATSU H, GAZDAR A. (2005) ; Somatic mutations of epidermal growth factor receptor signaling pathway in lung cancers. *Int J Cancer*, 118 : 257-262
95. ROCCO, J.W. SIDRANSKY, D. (2001). p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 264, 42-55.
96. PRUEITT, R.L., GOODMAN, J.E. VALBERG, P.A. (2009). Radionuclides in cigarettes may lead to carcinogenesis via p16(INK4a) inactivation. *J Environ Radioact* 100, 157-161.
97. OTA, N., KAWAKAMA, K., OKUDA, T. et al . (2006). Prognostic significance of p16(INK4a) hypermethylation in non-small cell lung cancer is evident by quantitative DNA methylation analysis. *Anticancer Res* 26, 3729-3732.

98. BOSSARD N, VELTEN M, REMONTET L, et al. (2007) ; Survival of cancer patients in France: a population-based study from The Association of the French Cancer Registries (FRANCIM). *Eur J Cancer* 43 : 149-160
99. BEASLEY,MB, BRAMBILLA E,TRAVIS ,WD. (2005), The 2004World Health Organization classification of lung tumors. *Semin Roentgenol*;40:90 -7.
100. MITSUUCHI Y, TESTA JR (2002). Cytogenetics and molecular genetics of lung cancer. *Am J Med Genet* 115: 183-8.
101. KUBO A, KAYE FJ. (2001),Searching for selective cyclin-dependent kinase inhibitors to target the retinoblastoma/p16 cancer gene pathway. *J Natl Cancer Inst*, 93: 415-7.Kaye FJ. RB and cyclin dependent kinase pathways: defining a distinction between RB and p16 loss in lung cancer. *Oncogene*. 2002, 21:6908 14.
102. SHARPLESS, N.E. DEPINHO, R.A., (1999). Sharpless NE, DePinho RA (1999). The INK4A/ARF locus and its two gene products. *Curr Opin Genet Dev* 9: 22-30.
103. EYMIN B, GAZZERI S, BRAMBILLA C.(2002),Mdm2 overexpression and p14(ARF) inactivation are two mutually exclusive events in primary human lung tumors. *Oncogene*;21:2750^61.
104. SANCHEZ M, REED AL, BUTA M, et al (1999). Inactivation of the INK4A/ARF locus frequently coexists with TP53 mutations in non-small cell lung cancer. *Oncogene* 18: 5843-9.
105. ESTELLER M, CORDON CORDO C, et al (2001a). p14ARF silencing by promoter hypermethylation mediates abnormal intracellular localization of MDM2. *Cancer Res* 61: 2816-21.
106. FURONAKA O, TAKESHIMA Y, AWAYA H, et al .(2004). Aberrant methylation of p14(ARF), p15(INK4b) and p16(INK4a) genes and location of the primary site in pulmonary squamous cell carcinoma. *Pathol Int* 54: 549-55.
107. SOZZI, G. (2001). Molecular biology of lung cancer. *European Journal of Cancer*, 37, 63-73.
108. CROWELLE, J.A. Steele, V.E. (2003). AKT and the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway: Important molecular targets for lung cancer prevention and treatment. *Journal of the National Cancer Institute*, 95, 252-253.
109. BROGNARD, J., CLARK, A.S. DENNIS, P.A. (2001). Akt/protein kinase B is constitutively active in non-small cell lung cancer cells and promotes cellular survival and resistance to chemotherapy and radiation. *Cancer Research*, 61, 3986-3997.
110. SORIA, J.C., LEE, H.Y ,WANG, L.et al . (2002). Lack of PTEN expression in non-small cell lung cancer could be related to promoter methylation. *Clinical Cancer Research*, 8, 1178- 1184.
111. OKAMI, K., WU, L., CAIRNS, P.et al . (1998). Analysis of PTEN/MMAC1 alterations in aerodigestive tract tumors. *Cancer Research*, 58, 509-511.
112. JAMIE E. CHAFT, MERIA E. Arcila, Paul K. Paik, et al.(2012) Coexistence of PIK3CA and Other Oncogene Mutations in Lung Adenocarcinoma –Rationale for Comprehensive Mutation Profiling. *Mol Cancer Ther*;11:485-491.
113. CADRANEL, CREQUIT P and al. (2013) Mutation de l'EGFR, de l'étude du gène à la pratique clinique : exemplarité ou exception *Rev mal resp*5,519-537
114. BURBEE, D.G., FORGASC, E., ZOCHBAUER et al . (2001). Epigenetic inactivation of RASSF1A in lung and breast cancers and malignant phenotype suppression. *Journal of the National Cancer Institute*, 93, 691-699.
115. DAMMANN, R., LI, C., YOON, J.H.et al . (2000). Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nature Genetics*, 25, 315-319.
116. SANCHEZ-CESPEDES M, DECKER PA, DOFFEK KM,et al.(2001). Increased loss of chromosome 9p21 but not p16 inactivation in primary non-small cell lung cancer from smokers. *Cancer Res*, 61 :2092-6.
117. HIYAMA, K., HIYAMA, E., ISHIOKA, S.et al . (1995). Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 895-902.
118. YASHIMA, K., WISTUBA, I.I., GAZDAR, et al. (1997). Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Research*, 57, 2373 2377.
119. BELINSKY, S.A. (2004). Gene-promoter hypermethylation as a biomarker in lung cancer. *Nat RevCa*

120. ARCHER, S.Y. Hodin, R.A. (1999). Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9, 171-174.
121. KOMASTU, N., KAWAMATA, N., TAKEUCHI, et al. (2006). SAHA, a HDAC inhibitor, has profound anti-growth activity against non-small cell lung cancer cells. *Oncol Rep* 15, 187-191.
122. GOS M., SZPECHET-POTOKA A. (2002). Genetic basis of neural tube defects II. Genes correlated with folate and methionine metabolism. *J. Appl. Genet.* : 43(4), 511-524.
123. PICKELLI L., WU Q., WANG X.L. et al. (2011) ; Targeted insertion of two Mthfr promoters in mice reveals temporal- and tissue-specific regulation. *Mamm Genome*: 22(11-12), 635-647.
124. GAUGHAN D.J., BARBAUX S., KIUIJT MEN L.A. et al. (2000) ; The human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) genes: genomic organization, mRNA structure and linkage to the CLCN6 gene. *Gene.* : 257(2), 279-289.
125. TRAN P., LECLERC D., CHAN M. et al. (2002) ; Multiple transcription start sites and alternative splicing in the methylenetetrahydrofolate reductase gene result in two enzyme isoforms. *Mamm Genome.* : 13(9), 483-492.
126. CICEK M.S., NOCK N.L., LI L. et al. (2004) Relationship between methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C genotypes and haplotypes and prostate cancer risk and aggressiveness. *Cancer Epidemiol. Biomark.* : 13 (8), 1331-1336.
127. YAMADAK., CHEN Z., ROZEN R. et al. (2001) ; Effects of common polymorphisms on the properties of recombinant human methylenetetrahydrofolate reductase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* : 98(26), 14853-14858.
128. BOTTO L.D., YANG Q. (2000) ; 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am J of Epidemiol.* : 151(9), 862-877.
129. VAHID P., FARNAZ R., ZAKER F, et al. (2010), Methylenetetrahydrofolate Reductase Gene Polymorphisms and Risk of Myeloid Leukemia. *LabMedicine.* : 41(8), 490-494.
130. ROBIEN K., ULRICH C.M. (2003). 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms and leukemia risk : a HuGE minireview. *Am J Epidemiol.* : 157, 571-582.
131. HAMBABA L., ABDESSEMED S., YAHIA M et al. (2008); Relationship between hyperhomocysteinemia and C677T polymorphism of methylene tetrahydrofolate reductase gene in a healthy Algerian population. *Ann Biol Clin.* : 66(6), 637-641.
132. WILCKEN B., BAMFORTH F., LI Z et al. (2003) ; Geographical and ethnic variation of the 677C>T allele of 5,10 methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR): findings from over 7000 newborns from 16 areas worldwide. *J Med Genet.*: 40(8), 619-625.
133. SHEN, H., SPITZ, M.R., WANG, L.E et al. (2001). Polymorphism of methylenetetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer: a case control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 397-401.
134. HOFFMAN PC, MAUER AM, VOKES EE. (2000), Lung cancer. *Lancet*;355(9202):479-85.
135. VANDERMEERS F, KETTMAN F, WILLEMS L. (2008). Implication des modifications épigénétiques dans les cancers: développement de nouvelles approches thérapeutiques. *BiotechnolAgronSoc Environ*; 12 (2) 211-218
136. HERON JF. (2000). Cancérologie générale. Pr Heron JF de l'Université de Caen, 13/0812005. Disponible sur <http://www.oncoprof.net/Generale/index.html>
137. FURUKAWA K, KATO H, KONAKA C, et al. (2005) ; Locally recurrent central-type early stage lung cancer < 1.0 cm in diameter after complete remission by photodynamic therapy. *Chest*;128(5):3269-75.
138. ASENSIO Gil .L.(2007). PCR – based methods for fish and fishery products authentication .*Trend in food Sciens and Technology* 18(11) :558-566.
139. BALMAIN A, GRAY J, PONDER B. (2003) ; The genetics and genomics of cancer. *Nature Genet* , 33 (Suppl) : 238-244
140. HOULSTON RS, PETO J. (2004) ; The search for low-penetrance cancer susceptibility alleles. *Oncogene*, 23 : 6471-6476
141. BRENNAN P. (2002) ; Gene-environment interaction and aetiology of cancer: what does it mean and how can we measure it? *Carcinogenesis*, 23 : 381-387

142. GARCIA-CLOSAS M, MALATS N, SILVERMAN D, et al. (2005); NAT2 slow acetylation, GSTM1 null genotype, and risk of bladder cancer: results from the Spanish Bladder Cancer Study and meta-analyses. *Lancet*, 366 : 649-659
143. E.A. ENGELES et X. WU, J. GU et al. juillet(2007); « Systematic evaluation of genetic variants in the inflammation pathway and risk of lung cancer », *Cancer Research*, American Association for Cancer Research, vol. 67, n° 13,, p. 6520–6527 .
144. A.S. WENZLEFF et M.L. COTE, C.H. BOCK et al. décembre (2005); « CYP1A1 and CYP1B1 polymorphisms and risk of lung cancer among never smokers : a population-based study », *Carcinogenesis*, Oxford University Press, vol. 26, n° 12,, p. 2207–2212.
145. J.W. SON et H.K. KANG, M.H. CHAE et al. septembre (2006); « Polymorphisms in the caspase-8 gene and the risk of lung cancer », *Cancer Genetics and Cytogenetics*, vol. 169, n° 2,, p. 121–127 .
146. J. YIN et U. VOGEL, Y. MA et al. mai(2007).« The DNA repair gene XRCC1 and genetic susceptibility of lung cancer in a northeastern Chinese population », *Lung Cancer*, vol. 56, n° 2,, p. 153–160.
147. K. TOMODA et T. OHKOSHI, K. HIROTA, et al. février (2009) ; « Preparation and properties of inhalable nanocomposite particles for treatment of lung cancer », *Colloids Surf. B : Biointerfaces*, vol. 71,, p. 177 Ueland, M., Steinar, H., Schneede, J., Refsum, H., and Vollset, SE., 2001, Biological and clinical implications of the MTHFR C677T polymorphism. *Pharmacological Sciences*, Vol.22, No.4.
148. MUNTJEWERFF, JW., HOOGENDOORN, ML., KAHN, RS., et al. (2005), Hyperhomocysteinemia, methylenetetrahydrofolate reductase 677TT genotype, and the risk for schizophrenia: a Dutch population based case-control study. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 135:69–72.
149. SAZCI, A., ERGUL, E., GUZELHAN, Y., et al. (2003), Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms in patients with schizophrenia. *Brain Res Mol Brain Res* 117:104–7.
150. SAZCI, A., ERGUL, E., KUCUKALI, I., et al. (2005), Association of the C677T and A1298C polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase gene with schizophrenia: association is significant in men but not in women. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 29:1113–23.
151. LEWIS, SJ., EBRAHIM, S., SMITH, GD. (2005), Meta-analysis of MTHFR 677C->T polymorphism and coronary heart disease: does totality of evidence support causal role for homocystéine and preventive potential of folate?. *BMJ*; 331: 1053
152. BENNOUAR, N., ALLAMI, A. AZEDOUG, H. et al, (2007), Thermolabile Methylene tetrahydrofolate Reductase C677T Polymorphism and Homocysteine Are Risk Factors for Coronary Artery Disease in Moroccan Population. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, volume 2007, Article ID 80687, 9 pages.
153. BOTTO, L.D. YANG, Q. (2001), 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151:862-877 Cavalli-Sforza, LL., Menozzi, P., Piazza, A., 1994, the History and Geography of Human Genes. Princeton Univ. Press.
154. SHEN et al. (2001). Polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer: a case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001;10: 397-401.
155. JENG YL, WU MH, HUNG HB, et al (2003). The methylenetetrahydrofolate reductase 677C" T polymorphism and lung cancer risk in a Chinese population. *Anticancer Res*, 23, 5149-52.
156. SHI Q, ZHANG Z, LI G, PILLOW PC, et al. Sex differences in risk of lung cancer associated with methylenetetrahydrofolate reductase polymorphisms. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14:1477-84.
157. SUZUKI T, MATSUO K, HIRAKI A, et al (2007). Impact of one-carbon metabolism-related gene polymorphisms on risk of lung cancer in Japan: a case-control study. *Carcinogenesis*, 28, 1718-25.
158. LUI H, JIN G, WANG H, et al (2008). Association of polymorphisms in one-carbon metabolizing genes and lung cancer risk: a case-control study in Chinese population. *Lung Cancer*, 61, 21-9.
159. CUI LH, SHIN MH, KIM HN, et al (2011a). Methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism in patients with lung cancer in a Korean population. *BMC Med Genet*, 12, 28.

160. SIEMIANOWICZ K, GMINSKI J, GARCZORZ W, et al.(2003) Methylenetetrahydrofolate reductase gene C677T and A1298C polymorphisms in patients with small cell and non-small cell lung cancer. *Oncol Rep*;10:1341 – 4.
161. ZHANG XM, MIAO XP, TAN W, et al (2005). Association between genetic polymorphisms in methylenetetrahydrofolate reductase and risk of lung cancer. *Acta Academiae Medicinae Sinicae*, 27, 700-3.
162. SHEN M, ROTHMEN N, BERNDT SI, et al (2005). Polymorphisms in folate metabolic genes and lung cancer risk in Xuan Wei, China. *Lung Cancer*, 49, 299-309.
163. HUNG RJ, HASHIBE M, MCKAY J, et al (2007). Folate-related genes and the risk of tobacco-related cancers. *Carcinogenesis*, 28, 1334-40.
164. CHENG Z, WANG W, SONG YN, et al (2011). Investigation of the relationship between C677T polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and lung cancer risk. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 34, 57 58.
165. PETO R, DOLL R, BUCKLEY JD, SPORN MB. (1981) ; Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? *Nature*;290:201-208.
166. GALEONE C, NEGRI E, PELUCCHI C, LA VECCHIA C, et al . (2007) Dietary intake of fruit and vegetable and lung cancer risk: a case-control study in Harbin, northeast China. *Ann Oncol*;18:388-392.
167. LEE, M.S., ASOMANING, K., SU, L., WAIN, J.C., MARK, et al .(2012). MTHFR polymorphisms, folate intake and carcinogen DNA adducts in the lung. *Int. J. Cancer* 131 (5), 1203–1209.
168. Rozen R. (1997). Genetic predisposition to hyperhomocysteinaemia: deficiency of methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). *Thromb Haemost*;78:523e6.
169. BLOUNT BC, MACK MM, WEHR CM, et al (1997). Folate deficiency causes uracil misincorporation into human DNA and chromosome breakage: implications for cancer and neuronal damage. *Proc Natl Acad Sci USA*, **94**, 3290-5.
170. KIM, Y. I. (2000). Methylene-tetrahydrofolate reductase polymorphisms, folate, and cancer risk: a paradigm of gene-nutrient interactions in carcinogenesis. *Nutr. Rev.*, 58: 205–209.

Classification histologique OMS 1999 - 2004 des carcinomes broncho-pulmonaires.

TUMEURS ÉPITHÉLIALES MALIGNES : CARCINOMES

CARCINOMES ÉPIDERMOÏDES

- Papillaire
- À cellules claires
- À petites cellules
- Basaloïde

CARCINOMES À PETITES CELLULES

Carcinome à petites cellules composite

ADÉNOCARCINOMES (Nouvelle classification 2011 de l'IASLC/ATS/ERS)

LÉSIONS PRÉINVASIVES

- Hyperplasie atypique adénomateuse
- Adénocarcinome in situ (anciennement bronchiolo-alvéolaire)
- Non-Mucineux
- Mucineux (très rares)

ADÉNOCARCINOMES À INVASION MINIME (tumeur ≤ 3 cm à prédominance lipidique 51
50 avec invasion ≤ 5 mm ou ≤ 10 % de la tumeur)

ADÉNOCARCINOMES INVASIFS

- Prédominance lipidique (anciennement carcinome bronchiolo-alvéolaire non-Mucineux)
- Prédominance acineuse
- Prédominance papillaire
- Prédominance micro-papillaire

Variantes

- Adénocarcinome Mucineux à prédominance lipidique (ancien bronchiolo-alvéolaire Mucineux)
- Cyto-adénocarcinome Mucineux
- Adénocarcinome colloïde
- Adénocarcinome fœtal (bas et haut grade)
- Adénocarcinome entérique

Annexe 1

CARCINOMES À GRANDES CELLULES

- Carcinome neuroendocrine à grandes cellules
- Carcinome neuroendocrine à grandes cellules composite
- Carcinome basaloïde
- Carcinome lymphoépithélioma-like
- Carcinome à cellules claires
- Carcinome à grandes cellules rhabdoïde

CARCINOMES ADÉNOSQUAMEUX

CARCINOMES SARCOMATOÏDES

- Carcinome pléiomorphe
- Carcinome à cellules géantes
- Carcinome à cellules fusiformes
- Carcino-sarcome
- Blastome pulmonaire

CARCINOÏDES

- Carcinoïde typique
- Carcinoïde atypique

TUMEURS DE TYPE GLANDES SALIVAIRES

- Carcinome muco-épidermoïde
- Carcinome adénoïde kystique
- Carcinome épithélial-myoépithélial

LÉSIONS PRÉINVASIVES

- Dysplasie et carcinome in situ
- Hyperplasie alvéolaire atypique
- Hyperplasie neuroendocrine diffuse idiopathique

Annexe 2

Classification TNM du cancer bronchique(2007)

Classification pathologique TNM (pTNM) selon l'UICC

La classification TNM (ANNEXE II) repose sur l'évaluation de 3 critères :

- T : taille de la tumeur primitive ou envahissement tissulaire local
- N : atteinte locorégionale ganglionnaire (« Nodes »)
- M : présence ou absence de métastase à distance

Elle permet d'apprécier le stade histo-pathologique d'extension d'une tumeur (pTNM) grâce à des examens anatomopathologiques de la pièce tumorale et des ganglions, ainsi que des examens d'imagerie obtenus lors du bilan d'extension. Elle associe donc des éléments microscopiques et macroscopiques.

T	
T0	Pas de tumeur
Tis	Carcinome in situ
Tx	Tumeur non évaluée
T1	Tumeur < 3 cm de grand axe, sans infiltration pleurale, sans invasion de la bronche souche T1a : < 2cm T1b : > 2 cm et < 3 cm
T2	Tumeur > 3 cm et < 7 cm de grand axe ou présentant une infiltration pleurale (PL1, PL2) ou atteignant la bronche souche à > 2 cm de la carène ou associé à une atélectasie ou une pneumopathie obstructive s'étendant à la région hilare sans atteindre le poumon complet T2a : > 3 cm et < 5 cm T2b : > 5 cm et < 7 cm
T3	Tumeur > 7 cm ; ou toute tumeur envahissant paroi thoracique, le diaphragme, le nerf phrénique, la plèvre médiastinale ou pariétale (PL3), le péricarde; ou tumeur de la bronche souche à < 2 cm de la carène ou associée à une atélectasie complète du poumon entier ; ou nodule(s) satellite(s) du même lobe
T4	Tumeur de toute taille envahissant une des structures suivantes : médiastin, cœur, gros vaisseaux, trachée, nerf récurrent laryngé, œsophage, corps vertébral, carène; ou nodule(s) satellite(s) dans un autre lobe ipsilatéral
N	
NX	Non déterminé
N0	Pas de métastase ganglionnaire
N1	Métastase(s) ipsilatérale intrapulmonaire, péribronchique ou hilare incluant les métastases par contiguïté
N2	Métastase(s) médiastinale ipsilatérale et/sous carénaire
N3	Métastase(s) médiastinale ou hilare controlatérale ou sus claviculaire
M	
MX	Non déterminé
M0	Absence de métastase à distance
M1	M1a : nodule satellite dans un lobe controlatéral ; ou carcinome pleurale ou péricardique M1b : métastase(s) extrapulmonaire

STADIFICATION

Une fois que le diagnostic de cancer est confirmé, il faut déterminer le stade du cancer.

La stadification du cancer consiste à définir la taille de la tumeur et à vérifier si elle s'est développée au-delà du site où elle a pris naissance.

Cancer du poumon non à petites cellules :

. **Carcinome occulte** : des cellules cancéreuses sont décelées dans les crachats expulsés des poumons, mais il n'y a pas de tumeur visible dans le poumon.

. **Stade 0** : des cellules anormales sont présentes dans la paroi des poumons ou des voies respiratoires (trachée, bronches ou bronchioles). Ces cellules anormales ne se sont pas propagées aux tissus du poumon lui-même, mais elles peuvent devenir cancéreuses et se disséminer par la suite. Le cancer de stade 0 est également appelé carcinome in situ.

. **Stade 1 :**

. **Stade 1A** : La tumeur est localisée uniquement dans le poumon (3cm)

. **Stade 1B** : La tumeur mesure plus de 3cm ou elle croise dans la principale voie aérienne du poumon (trachée). Elle peut aussi s'être propagée à la membrane du poumon (plèvre) ou avoir provoqué un affaissement partiel du poumon.

. **Stade 2 :**

. **Stade 2A** : La tumeur mesure moins de 3cm mais s'est propagée aux ganglions lymphatiques voisins.

. **Stade 2B** : La tumeur mesure plus de 3cm et s'est propagée aux ganglions lymphatiques voisins. Ou elle a envahi la paroi thoracique, la plèvre, la couche musculaire sous les poumons ou l'enveloppe du cœur.

. **Stade 3 :**

. **Stade 3A** : La tumeur peut être de toute taille. Les cellules cancéreuses se sont propagées aux ganglions lymphatiques du milieu du thorax (médiastin) sans avoir atteint l'autre côté de la poitrine.

. **Stade 3B** : Deux tumeurs ou plus sont présentes dans le même poumon.

. **Stade 4** : le cancer s'est propagé à d'autres parties du corps, comme le foie, le cerveau ou les os.

Cancer du poumon à petites cellules :

. **Stade limité** : Des cellules sont présentes dans un seul poumon et dans les ganglions lymphatiques voisins. Elles peuvent également être décelées dans le liquide pleural.

. **Stade étendu** : Le cancer s'est propagé à l'extérieur du poumon dans la région thoracique ou d'autres parties du corps.

Questionnaire

Numéro de dossier :.....

Nom et prénom :.....

Date de naissance ou âge:.....

Wilaya :.....

Profession :.....

Premiers symptômes : Toux :..... Dyspnée :.....Hémoptysie :.....Douleur :.....

Date de découverte de la maladie :.....

Date de la première consultation :.....

Tabagisme actif :..... Sevrage :.....

Tabagisme passif :.....

Alcool :.....

Antécédents personnels :.....

Antécédents familiaux :.....

Localisation tumorale :.....

Chirurgie :.....

Chimiothérapie :.....

Radiothérapie :.....

Type histologique :.....

TNM:.....

Consentement (patient)

J' donne mon accord à la réalisation des études génétiques qui peuvent aider au diagnostic ou à la prévention de la maladie dont je souffre.

J' donne mon accord pour que mon prélèvement soit à la disposition de la communauté scientifique à des fins de recherche biomédicale.

Nom :Prénom :Né(e) le..... /..... /.....

Fait à Constantine, le /..../..... Signature

Annexe 5

Composition des solutions tampons utilisées pour l'extraction d'ADN :

TE 20:5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7,5) auto clavé :

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

Tampon de lyse :

- NaCl 400 mM
- EDTA 2 mM
- Tris 10 mM
- pH 8,2

2- Préparation du TBE 10X et 1X.

TBE 10X :

- Tris 108 g
- Acide borique 55 g
- Ajuster le PH à 8,3 avec l'acide acétique glacial
- EDTA 9.3 g
- QSP H2O pour 1L

TBE 1X :

- 100 ml de TBE 10X
- 900 ml H2O

Étude moléculaire du cancer broncho-pulmonaire dans la région de Constantine (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)

Le cancer broncho-pulmonaire résulte de la transformation maligne de l'épithélium qui tapisse les voies aériennes intra-thoraciques. C'est un cancer grave dont la prévalence élevée est liée en grand part à la consommation de tabac ainsi qu'à certaines expositions professionnelles et pollutions atmosphériques et domestiques.

Malgré le développement des connaissances sur mécanismes moléculaires de l'oncogénèse bronchique, l'étiologie de ces pathologies demeurent en grande partie inconnue. La piste génétique avec l'imputation de polymorphismes de gènes impliqués dans diverses voies métabolique et de plus en plus étudiée.

Dans cette optique, nous avons essayé, par une enquête de type cas-témoins, de prospecter l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR*, souvent rapporté dans la bibliographie comme facteur de risque établi ou suspecté, dans la survenue du CBP sur un échantillon de la population Algérienne (13 patients admis au service d'oncologie du CHU Ben-Badis et 16 témoins en bonne santé apparente). Après génotypage de la *MTHFR* par PCR/Digestion, une étude statistique visant à calculer l'effet du polymorphisme a été réalisée.

Nos résultats suggèrent l'absence d'association entre le facteur de risque potentiel étudié (*MTHFR* C677T) et l'occurrence du CBP dans la population Algérienne. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'infirmier avec certitude la présence de cette association

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, Biologie moléculaire, *MTHFR*.

Molecular study of bronchopulmonary cancer in the area of Constantine (*MTHFR*C677T polymorphism)

Broncho-pulmonary cancer results from the malignant transformation of epithelial lining cells of intrathoracic airway. It is a serious cancer whose high prevalence is linked in large part to tobacco consumption as well as some professional expositions, domestic and atmospheric pollution.

Despite the development of knowledge on molecular mechanisms of bronchial oncogenesis, the etiology of these diseases remains largely unknown. The genetic trail with the imputation of polymorphisms of genes involved in more studied and metabolic pathways.

With this in mind, we have tried, by a case-control investigation to explore the involvement of the *MTHFR* C677T polymorphism often reported in the literature as risk factor established or suspected in the occurrence of CBP on a sample of the Algerian population (13 patients admitted to the service of Oncology of the Badis Ben CHU and 16 healthy controls). After genotyping by PCR/Digestion *MTHFR*, a statistical study to calculate the effect of polymorphism was carried out.

Our results suggest the lack of association between (*MTHFR*C677T) studied potential risk factor and the occurrence of the CBP in the Algerian population.

However, these results do not rule out with certainty the presence of this association.

Key words: Bronchopulmonary cancer, molecular biology, *MTHFR*.

دراسة جزيئية للسرطان الرئوي تعدد أشكال *MTHFR* (C677T)

ينتج سرطان الرئة نتيجة التحويل الخبيث لبطانة الشعب الهوائية الصدرية الداخلية. يرجع ارتفاع معدل انتشاره بشكل كبير إلى استهلاك التبغ وأيضاً بعض حالات التعرض المهنية وتلوث الغلاف الجوي و المنزلي.

على الرغم من تطور المعارف حول الآليات الجزيئية لتكون الورم القصي تبقى المسببات المرضية لهذه الأمراض غير معروفة إلى حد كبير. أن المسار الجيني مع تعدد الأشكال الجينية للجينات المسؤولة عن مختلف المسارات الأيضية هي الأكثر دراسة.

حاولنا في هذا المنظور عن طريق إجراء تحقيق من نوع حالات شواهد التنقيب حول اشتراك تعدد الأشكال C677T المذكور سابقاً في قائمة المراجع كعامل خطر معترف أو مشتبه به لظهور السرطان الرئوي في عينة من سكان الجزائر (١٣ حالة مرضية موجودة بقسم الأورام بن باديس و ١٦ شاهداً في صحة جيد)

بعد التتميط الجيني للـ *MTHFR* بواسطة التقنية PCR و قد أجريت دراسة إحصائية لحساب تأثير تعدد الأشكال الذي تم إجراؤه

نتائجنا تشير إلى عدم وجود علاقة بين العامل الخطر المحتمل دراسته وظهور CBP عند سكان الجزائر ومع ذلك فإن هذه النتائج لا تسمح بالتأكيد على وجود هذا الارتباط.

Étude moléculaire du cancer broncho-pulmonaire dans la région de Constantine (Polymorphisme C677T de la *MTHFR*)

Mémoire de fin de cycle pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique Moléculaire.

Le cancer broncho-pulmonaire résulte de la transformation maligne de l'épithélium qui tapisse les voies aériennes intra-thoraciques. C'est un cancer grave dont la prévalence élevée est liée en grand part à la consommation de tabac ainsi qu'à certaines expositions professionnelles et pollutions atmosphériques et domestiques.

Malgré le développement des connaissances sur mécanismes moléculaires de l'oncogénèse bronchique, l'étiologie de ces pathologies demeurent en grande partie inconnue. La piste génétique avec l'imputation de polymorphismes de gènes impliqués dans diverses voies métabolique et de plus en plus étudiée.

Dans cette optique, nous avons essayé, par une enquête de type cas-témoins, de prospecter l'implication du polymorphisme C677T de la *MTHFR*, souvent rapporté dans la bibliographie comme facteur de risque établi ou suspecté, dans la survenue du CBP sur un échantillon de la population Algérienne (13 patients admis au service d'oncologie du CHU Ben-Badis et 16 témoins en bonne santé apparente). Après génotypage de la *MTHFR* par PCR/Digestion, une étude statistique visant à calculer l'effet du polymorphisme a été réalisée.

Nos résultats suggèrent l'absence d'association entre le facteur de risque potentiel étudié (*MTHFR* C677T) et l'occurrence du CBP dans la population Algérienne. Cependant, ces résultats ne permettent pas d'infirmes avec certitude la présence de cette association.

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, Biologie moléculaire, *MTHFR*.

Laboratoire de recherche : Laboratoire de biologie génétique du CHUC.

Jury d'évaluation :

Président du jury : *Gharzouli Razika* (Docteur - UFM Constantine),

Rapporteur : *Rezgoune Mohamed Larbi* (MA.A - UFM Constantine),

Examineur : *Benlatreche Moufida* (MA.A - UFM Constantine).

Date de soutenance : 29/06/2015