

Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique

République du Mali
Un Peuple-Un But-Une Foi

Université des Sciences, des Techniques et des Technologies
de Bamako (USTTB)



Faculté de Pharmacie



Année universitaire: 2021-2022

N°...

THÈSE

**Évaluation de l'Hétérogénéité Tumorale et l'Instabilité
Génomique dans le Cancer du Sein par la
Télogénomique Cellulaire**

Présentée et soutenue publiquement le 19/01 /2023 devant la
Faculté de Pharmacie

Par
Mme ONGOIBA Christine

**Pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie
(Diplôme d'État)**

JURY

Président : Pr. Mahamadou TRAORE

Membre : Dr. Madani LY

Membre : Dr. Mamadou KEITA

Membre : Dr. Touré Dinkorma OUOLOGUEM

Directeur : Pr. Oumar SAMASSEKOU

DEDICACES

Je dédie ce travail

- À **Dieu** le tout puissant le Miséricordieux, l'Omniscient, l'Omnipotent, celui qui m'a permis d'arriver au bout de ce cycle.

Merci Seigneur de m'avoir donné la capacité et la santé de mener à bien ce travail si long, pénible et important. Merci pour ta protection et pour ton soutien.

Seigneur donne-moi le courage d'achever ce travail ardu et fait que j'apporte un peu de joie dans la vie de ceux qui souffrent. Amine !

-A mon père, **Jean Baptiste Ongoiba**

Papa vous avez toujours été soucieux du devenir de vos enfants. Votre dévouement, vos prières, vos bénédictions ainsi que votre soutien ne nous ont jamais faits défaut. Votre générosité, votre courage, votre sens de l'honneur, de la dignité et du respect des valeurs font que vous resterez à jamais un exemple pour nous. Trouvez en cet œuvre l'expression de ma profonde gratitude et de toute ma reconnaissance. Que Dieu vous accorde encore une longue vie pleine de santé et de bonheur.

-A ma mère, **Martine Dara**

En ce jour si précieux les mots me manquent tellement l'émotion est grande. Vous êtes la source de ma force de mon courage et de mon inspiration. La distance ne change en rien tout l'amour et l'affection que j'ai pour vous. Ce modeste travail ne suffit pas à récompenser tant d'années de sacrifices, je prie Dieu d'adoucir tes souffrances. Que le Tout puissant vous accorde une longue vie pleine de bonheur pour profiter de la réussite de vos enfants.

-A mon très cher époux, **Dr Traoré Amadou dit Baba**

Votre rencontre est l'un des merveilleux événements qui me soit arrivé. Vous avez toujours été là pour me soutenir dans les moments difficiles aucun mots ne pourra exprimer ma gratitude envers vous. Votre amour, Vos encouragements et Votre soutien total m'ont été d'une grande importance durant la réalisation de ce travail.

Nous avons partagé des moments agréables parfois difficiles, mais le plus important est que nous avons toujours fini par nous comprendre.

Je te dédie ce travail en témoignage de mon amour, puisse le Seigneur veiller davantage sur nous pour nous permettre de réaliser nos vœux et nous ouvrir les portes du bonheur pour un meilleur et exemplaire foyer.

-A ma tante, **Sara Dara**

Vous avez toujours été là tant dans les moments de joie que dans les difficultés. Ce sont vos conseils, votre soutien, votre amour et vos bénédictions qui m'ont permis de réaliser ce travail. Un bien fait n'est jamais perdu, je vous remercie infiniment pour l'hospitalité ; pour cette famille que vous m'avez offerte. Que le seigneur te le rende au centuple

-A mon oncle, **Boureima Dara**

Merci tonton de m'avoir donné une deuxième famille ici à Bamako ; vous m'avez aidé à surmonter certaines difficultés de la vie. Malgré nos différents vous avez su être compréhensif

-A mes **Frères et Sœurs**,

Chère frères et sœurs, grandir ensemble dans une même maison n'est pas une chose facile mais nous avons toujours été soudés. Votre compréhension, votre humour et votre amour m'ont fait vivre des moments inoubliables. Vous avez tous d'une manière ou une autre contribué à l'aboutissement de ce travail, il est le vôtre.

Je vous le dédie en gage de ma profonde affection et de mon attachement indéfectible. Qu'Allah nous donne la tolérance et resserre d'avantage nos liens de fraternité car l'union fait toujours la force.

-A mes **encadreurs**

Chers encadreurs de loin ou de près ayant contribué à mon encadrement ce travail vous est dédié. La transmission du savoir n'est pas facile mais vous avez fait de cela une vocation un grand hommage à vous tous.

Ce travail est aussi dédié :

A toutes les **victimes du cancer du sein**.

A tous ceux qui œuvrent pour la lutte contre le cancer du sein.

REMERCIEMENTS

Mes remerciements vont à l'endroit de tous mes enseignants de l'école catholique sœur Geneviève de Gao, de l'école George Biard de Bandiagara, du lycée de Bandiagara, de la faculté de Médecine et d'Odonto-Stomatologie et de la faculté de Pharmacie.

❖ Au professeur Mahamadou Traoré :

Merci de m'avoir accepté dans votre département. Votre disponibilité, votre simplicité et votre amour pour la recherche nous ont permis de mener à bien ce travail.

❖ Au professeur Oumar Samassékou :

Votre collaboration m'a été d'une aide très précieuse. Vous avez été un père, un guide et une idole pour moi. Ce travail est aussi le vôtre. Recevez mes remerciements les plus sincères.

❖ Au Professeur Guida Landouré :

Votre humanisme, votre disponibilité et votre dévouement nous laisse sans voix. Vous avez su nous montrer que l'humilité est l'une des valeurs sociales les plus importantes, soyez-en remercié.

❖ Au Dr Mamadou Keita :

Merci de votre disponibilité et de vos conseils, vous êtes un encadreur exemplaire et dévoué pour la cause de ses étudiants. Recevez toute notre profonde gratitude.

❖ A toute l'équipe du département de la neurologie :

Dr Abdoulaye Yalcouyé Dr Abdoulaye Tamega Mamoutou Sangaré A toute l'équipe de Neurogénétique : Pr Guinto Cheick Oumar, Pr Mahamadou Traore, Pr Souleymane Coulibaly, Dr Guida Landouré, Dr Samassékou Oumar, Dr Seybou H Diallo, Dr Coulibaly Thomas, Dr Coulibaly Souleymane dit Papa, Dr Diallo Salimata, Dr Cissé Lassana, Dr Diarra Salimata, Dr. Taméga, Abdoulaye, Dr. Yalcouyé Abdoulaye, Dr. Bocoum Abdoulaye, Dr. Dembélé Mohamed Emile, Dr. Fousseyni Kané , Dr. Oumou Traoré, Dr Cheick O Sidibé, Salia Bamba, Kadidiatou Diallo, Issouf Ballo, Soumaila Niaré, Boubacar Karambé, Modibo Goita, Amoro Traoré, Demba Samaké, Bintou Coulibaly, Moussa Aly Sangaré, Aïssata Touré, Linda Fotsa, Samuel Ephrata Mefoung, Ibrahim Guindo, Mahamadou Kotioumbé.

❖ A toute l'équipe de la pharmacie Hirondelles :

Votre hospitalité et votre sens du savoir vivre en équipe sont d'une qualité inestimable. Dr Deidia Mahamane kattrra vous avez été une mère, une institutrice et un exemple à suivre pour moi.

❖ A mes camarades de la 11eme promotion du numerus clausus :

Vous avez été plus que des camarades pour moi au-delà de cette relation scolaire qui nous lie, vous avez su faire de cette classe une famille, le MUPPES en est la preuve, merci pour votre bonne collaboration.

❖ A mes amis et camarades de classe :

Lamine Diallo, Nana Kadidia Togola, Aminata Mounkoro, Bakaina Diarra, Marie Hortense Tienou, Diata B Diarra, Lassine Diallo, Bakary Diombera, Mah Sylla, Fatoumata Sam, Mohamed Yanoga, Anaeye Djiguiba, Salian Couloubaly, Djeneba Teme, Basil Arama, Sylvain Guindo.

❖ A la famille Dara

❖ A la famille Traoré :

une belle famille exemplaire, grâce à votre bonté je n'ai eu aucune difficulté à m'intégrer, merci de l'accueil ,merci de l'hospitalité

Ce travail est aussi dédié :

A toutes les victimes du cancer du *sein*

A tous ceux qui œuvrent pour la lutte contre le cancer du sein

HOMMAGES AUX MEMBRES DU JURY

A notre Maître et président du jury :

Professeur Mahamadou TRAORE

Professeur honoraire de génétique à la Faculté de Pharmacie de l'USTTB

Co-investigateur de l'étude sur les pathologies neurologiques héréditaires au Mali

Co-investigateur de l'étude sur la génétique de l'épilepsie au Mali

Président et membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine

Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa)

Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine

Membre de la Société Malienne de Neurosciences

Cher maître

La qualité de votre enseignement lors des cours de génétique à la faculté de pharmacie a éveillé ma passion pour cette discipline.

Votre ardeur au travail, votre dévouement, l'amour du travail bien fait, le souci constant et permanent de la formation et votre compétence nous ont marqués et forcé notre admiration.

Vous nous avez appris le travail en équipe et le savoir-vivre social, votre simplicité et votre générosité sont à salués.

Dès nos premiers cours de génétique, votre particularité nous a séduit et a dès lors, suscité en nous le désir d'être compté parmi vos élèves. Grâce à la confiance que vous avez eu en nous en nous confiant ce travail, notre rêve s'est réalisé. Ceci nous a permis de comprendre auprès de vous, la délicatesse du geste et de la parole (Ethique) dans ce métier. En plus de l'enseignement scientifique remarquable reçu, vous avez fixé en nous, à jamais, quatre vertus qui nous paraissent indispensables à une vie socioprofessionnelle active et bien remplie : la persévérance, la conviction dans tout ce que l'on fait, la franchise et par-dessus tout, l'humilité. Tout au long de ce travail nous avons été émus par votre disponibilité, votre modestie, votre sens de responsabilité, votre gentillesse, votre patience, votre rigueur scientifique, vos qualités humaines et pédagogiques qui font de vous un modèle à suivre. A votre côté nous avons été à l'école de la vie et de la science. Vous nous avez enseigné tel qu'un père enseigne ses enfants sans oublier toute la générosité qui va avec.

A notre Maître et membre du jury

Dr Madani LY,

Médecin spécialiste en oncologie médicale et en hématologie,
Chef du service d'oncologie médicale du CHME le Luxembourg,
Ancien praticien hospitalier au service d'hématologie et oncologie médical du CHU Point G,
Membre de la société Malienne d'hématologie et d'oncologie (SOMAHO),
Président du comité scientifique de la Ligue malienne contre le cancer.
Vice-président de l'association ONCOMALI,
Chargé de cours d'oncologie médicale à la FMPOS et UKM.
Cher maître,

Nous avons été marqués par la spontanéité avec laquelle vous avez accepté de siéger dans le jury de cette thèse malgré vos nombreuses responsabilités. Très cher maître, votre ardeur et votre rigueur au travail font de vous un exemple à suivre. Vos qualités scientifiques et cliniques font de vous un excellent clinicien chercheur. Vos qualités humaines attestées entre autres par votre engagement auprès des malades souffrant du cancer afin d'améliorer leur prise en charge font de vous un exemple à suivre pour nous la jeune génération. Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et notre sincère gratitude

Nous sommes fiers d'avoir été un de vos élèves et nous manifesterons le désir de Continuer à demeurer auprès de vous pour apprendre la science.

Soyez rassuré, cher Maître de notre entière disponibilité et de notre profonde gratitude.

Qu'Allah vous garde encore longtemps auprès de nous et en bonne santé pour que nous Pussions continuer à bénéficier de vos enseignements.

A notre maître et membre du jury

Dr Mamadou KEÏTA

Docteur en pharmacie ;

PhD en biologie cellulaire et moléculaire ;

Détenteur d'une maîtrise en immunologie ;

Co-investigateur de laboratoire de biologie clinique pour les instituts nationaux de la santé des USA au Mali

Cher maître,

Honorable maître, nous ne cesserons jamais de vous remercier pour la confiance que vous aviez placée en nous, pour effectuer ce travail. Votre rigueur scientifique, votre assiduité, votre remarquable ponctualité, votre simplicité hors norme, votre amour du travail bien fait, votre courage et vivacité font de vous un grand homme de science dont la haute culture scientifique forge le respect et l'admiration de tous. Ce travail est le vôtre car vous avez été présents dès sa conception en guidant mes premiers pas dans le laboratoire de neuroscience. Vous m'aviez initiée aux techniques de biologie moléculaire et inculquée la patience et courage qu'un scientifique doit faire preuve en cas d'échec. C'est un grand honneur et une fierté pour nous de compter parmi vos élèves. Nous vous prions cher Maître, d'accepter nos sincères remerciements et l'expression de notre infinie gratitude. Que Dieu vous donne longue et heureuse vie

A notre maître et membre du jury :

Dr Touré Dinkorma OUOLOGUEM

Docteur en Pharmacie

PhD en biologie Cellulaire à l'université Pennsylvania aux USA

Maître-assistante de biologie Cellulaire à la FAPH

Cher Maître,

Tout au long de notre cursus universitaire, nous avons été émerveillés par votre disponibilité, vos qualités humaines et surtout votre culture scientifique. Nous vous remercions de votre spontanéité d'accepter d'être membre du jury de cette thèse malgré le délai court de la soumission du document.

Votre disponibilité constante et votre amour pour le travail bien fait font de vous une Enseignante-Chercheuse respectée.

Permettez-nous, cher Maître, de vous adresser l'expression de notre immense gratitude et de nos sincères remerciements.

A notre Maître et directeur de thèse

Professeur Oumar Samassékou

Spécialiste en génétique médicale et pathologie moléculaire

Maitre de conférences en génétique et génomique à la F.M.O.S

Membre fondateur de la Société Malienne de Génétique Humaine

Membre de la Société Africaine de Génétique Humaine

Membre du consortium Human Hereditary and Health in Africa (H3Africa)

Cher maître,

Cher Maître, en plus du bon accueil que vous nous avez réservé, malgré vos multiples occupations vous avez su être disponible même à des heures tardives pour nous. Vous avez su nous orienter avec sagesse et éveiller notre intérêt pour le sujet. Votre rigueur, votre compétence, votre souci constant de transmettre le savoir faire et surtout votre honnêteté intellectuelle font de vous un être exceptionnel. Vous nous avez appris à nous surpasser, nous sommes fières de nous compter parmi vos élèves. Veuillez recevoir ici notre profond respect et notre immense gratitude.

TABLE DES MATIÈRES

1.INTRODUCTION	1
2.OBJECTIFS	3
2.1. Objectif général	3
2.2. Objectifs spécifiques.....	3
3. GÉNÉRALITÉS	4
3.1. Définition du cancer du sein.....	4
3.2. Rappels sur le sein normal.....	4
3.2.1. Rappels anatomiques	4
3.2.2. Rappels physiologiques	8
3.3. Épidémiologie du cancer du sein.....	9
3.4.Facteurs de risque	10
3.5. Diagnostic	10
3.5.1 Circonstances de découverte.....	10
3.5.2. Examen clinique.....	11
3.5.2.1. Interrogatoire	11
3.5.3. Examens anatomo pathologiques.	12
3.6.Classifications.....	15
3.6.1.Classification biologique	15
3.6.2. Classification T.N.M	19
3.6.3. Stadification	19
3.6.4. Grades du cancer du sein	20
3.7.Traitement:	22
3.7.1. Chirurgie	22
3.7.2. Radiothérapie	22
3.7.3. Traitement systémique	22

7.3.4. Prise en charge des métastases.....	24
3.8. L'instabilité génomique dans le cancer du sein.....	25
3.9. Télomères	27
3.9.1 Définition	27
3.9.3 Fonction des télomères	29
3.9.4 La longueur des télomères	30
3.9.5 Organisation nucléaire des télomères	30
3.9.6 Télomères dans le cancer	31
3.9.7 Dysfonctionnement des télomères dans le cancer du sein	32
3.10 Télogénomique cellulaire	33
3.10.1 Définition	33
3.10.2 But.....	33
3.10.3 Principe	34
3.10.4 Avantages et limites	34
3.10.5 Étapes	35
3.10.5 Paramètres de la télogénomique cellulaire	40
4. METHODOLOGIE	44
4.1. Cadre et lieu d'étude.....	44
4.2 Type et période et durée d'étude	44
4.3 Population d'étude.....	44
4.3.1 Critères d'inclusion.....	44
4.3.2 Critères de non inclusion :	44
4.4 Collecte des données	45
4.4.1 Données pathologiques	45
4.4.2 Données télogénomiques	45
5. RESULTATS	53
5.1 Age.....	53

5.2 Données pathologiques	54
5.2.1 Données histologiques	54
5.2.2 Données immunohistochimiques	56
5.2.3 Données de FISH HER2	59
5.2.4 Données moléculaires	61
5.3 Données télégénomiques cellulaires	62
5.3.1 Images télégénomiques cellulaires	62
5.3.2 Paramètres télégénomiques cellulaires	67
5.4 Intégration des données histologiques et télégénomiques cellulaires	76
5.4.1 Patiente P1	76
5.4.2 Patiente P2	78
5.4.3 Patiente P3	80
5.4.5 Patiente P5	85
6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION	88
7. CONCLUSION.....	95
8. RECOMMANDATIONS.....	96
9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	105

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: classification TNM du cancer du sein	19
Tableau II: Classification de Scarff Bloom et Richardson.....	21
Tableau III : Caractéristiques macroscopiques des échantillons	54
Tableau IV : Caractéristiques microscopiques des échantillons.....	55
Tableau V: Immunohistochimie des récepteurs d'œstrogène	56
Tableau VI: Immunohistochimie des récepteurs de progestérone.....	57
Tableau VII: Immunohistochimie du récepteur d'HER2	58
Tableau VIII: Caractéristiques du statut d'HER2 à la FISH.....	59
Tableau IX: Résultats récapitulatifs du statut final de HER2.....	60
Tableau X: Test Oncotype Dx.....	61

LISTE DES FIGURES

Figure 1: structure anatomique du sein	7
Figure 2: Différents types de classification des cas de HER2	18
Figure 3: Les différentes caractéristiques d'une cellule cancéreuse.	25
Figure 4: Schéma illustratif de télomère	28
Figure 5: structure de l'hétérochromatine	29
Figure 6: Organisation 3D nucléaire des télomères	31
Figure 7 : Image d'illustration de la technique FISH télomérique.....	38
Figure 8: Représentation schématique du principe de la microscopie 3D des télomères	39
Figure 9: Illustration du territoire télomériques	42
Figure 10: Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères.....	43
Figure 11: Répartition des patientes selon l'âge en année.	53
Figure 12: Images télométries cellulaires de P1	62
Figure 13: Images télométries cellulaires de P2	63
Figure 14: Images télométries cellulaires de P3	64
Figure 15: Images télométries cellulaires de P4	65
Figure 16: Images télométries cellulaires de P5	66
Figure 17: Représentations graphiques du nombre des signaux télomériques.....	67
Figure 18: Représentations graphiques des intensités des signaux télomériques	68
Figure 19: Représentations graphiques du nombre d'agrégats télomériques.....	69
Figure 20: Représentations graphiques de l'indice de distribution nucléaire des télomères... ..	70
Figure 21: Représentations graphiques du nucléaire des télomères.....	71
Figure 22: Représentations graphiques de la distance télomérique du centre nucléaire	72
Figure 23: coefficient de variation (cellulaire/échantillon).....	73
Figure 24: coefficient de variation (cellulaire/zonal).....	73

Figure 25: Coefficient de variation des paramètres télégénomiques cellulaire en fonction des zones pathologiques	74
Figure 26:xxx	75
Figure 27 Caractéristiques histologiques des fragments de biopsie de P1	76
Figure 28: Paramètres télégénomiques cellulaires des fragments de biopsie de P1	77
Figure 29: Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de P2	78
Figure 30 Paramètres télégénomiques cellulaires de P2	79
Figure 31: Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de P3	80
Figure 32: Paramètres télégénomiques cellulaires de P3	81
Figure 33: Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de P4	82
Figure 34: Paramètres télégénomiques cellulaires de P4	83
Figure 35 Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de P5	85
Figure 36: Paramètres télégénomiques cellulaires de P5	86

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : degré Celsius

µl : microlitre

µm³ : micromètre cube

2D : di-dimensionnelle

3D : tridimensionnelles

A : adénine

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

AT : agrégats télomériques

ATCD : antécédent

BRCA: breast cancer gene

C : cytosine

CCIS: carcinome canalaire in situ

CHU : centre hospitalier universitaire

CLIS: carcinome lobulaire in situ

Cy³ : teinture de cyanure³

DAPI : 4' 6' diamidino-2 phenylindole

FISH: fluorescence in situ hybridation

FSH: follicle stimulating hormone

G : guanine

G₀ : phase G₀ du cycle cellulaire

G₁ : phase G₁ du cycle cellulaire

G₂ : phase G₂ du cycle cellulaire

H₂O : eau distillée

HER2: Human Epidermal growth factor Receptor 2

IC : instabilité chromosomique

IHC : immunohistochimie

Kb : kilo bases

Ki67 : antigène marqueur de prolifération

LH: luteinizing hormone

M : métastases

Mb : méga bases

MBD2 :méthyl CPGbinding protein 2

MIN : instabilité des microsatellites

ml : millilitre

Myc :myelocytomatosis viral oncogène

N : nodule

nm : nanomètre

OR : récepteur de l'œstrogène

Pb : paire de base

PNA : acide nucléique peptidique

POT1 :protection of telomere 1

PR : récepteur de la progestérone

Rap :Ras related protein

RB1 : rétinoblastome 1 gène

RH : récepteur hormonal

T : taille

T : thymine

TBS : tris buffer saline

TERC : télomérase RNA component

TERRA : répétition télomérique en ARN

TERT :telomerase reverse transcriptase

TIN2:TERF1 interacting nuclear factor 2

TP53 : protéine du gène suppresseur de tumeur P53

TPP1:protéine du gène de l'adrenocortical displasia

TRF :telomeric repeat binding factor

UDH :usual ductal hyperplasia

1. INTRODUCTION

Le cancer est une croissance anormale de cellules qui est causée par de multiples changements dans l'expression génique conduisant à une rupture de l'équilibre entre la prolifération et la mort cellulaire. Cette croissance anormale et les changements génomiques qui en résultent entraînent la formation de clones cellulaires qui peuvent envahir des tissus de voisinage et se métastaser à des sites distants causant une morbidité, et en absence de traitement, le décès du malade (1).

Le cancer du sein est une des premières causes de cancer chez la femme et constitue une préoccupation majeure de santé publique dans le monde. La prévalence du cancer du sein est la plus élevée parmi les autres cancers atteignant 2,26 millions de nouveaux cas en 2020 dans le monde. En outre, son taux de mortalité est le plus élevé parmi les autres cancers avec 685 000 décès, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) (2). Au Mali, le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme. En effet, selon GLOBOCAN (Global Cancers Observatory), le Mali a enregistré 2448 nouveaux cas de cancer du sein en 2020 (3).

Les femmes maliennes payent un lourd tribut dû au cancer du sein. Plus de trois quarts des patientes sont diagnostiqués à des stades avancés de la maladie, et environ 50% d'entre elles ne vivent pas au-delà de 4 ans (4). Plusieurs facteurs concourent à ce taux bas de survie. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer le contexte socio-économique, le diagnostic tardif, et la fréquence élevée des formes biologiques très agressives. La découverte de biomarqueurs aidant à faire un diagnostic précis et à guider des thérapies adaptées de ces formes agressives permettraient de relever ce taux bas de survie du cancer du sein au Mali et ailleurs.

L'agressivité du cancer du sein est associée à l'instabilité génomique et l'hétérogénéité tumorale. L'altération de l'organisation nucléaire des télomères ou la télométrie cellulaire est l'une des premières caractéristiques cellulaires et génomiques préjudiciables à l'instabilité

génomique dans le cancer. L'altération de la télégénomique cellulaire a été démontrée comme facteurs de pronostic ou de réponse thérapeutique dans plusieurs pathologies cancéreuses (5–7). Il est à noter que l'hétérogénéité tumorale est aussi associée à l'instabilité génomique et à des formes agressives du cancer du sein (8,9). Le développement d'une méthodologie qui permettrait d'évaluer la télégénomique cellulaire et l'hétérogénéité tumorale tout en intégrant les données histologiques dans le cancer du sein pourrait s'avérer d'un grand atout pour évaluer l'instabilité génomique et l'agressivité de cette pathologie. Cette approche pourrait ainsi permettre de découvrir de nouveaux biomarqueurs diagnostiques, pronostiques ou thérapeutiques dans les formes agressives du cancer du sein.

La présente étude s'inscrit dans la logique de développer une nouvelle approche méthodologique qui permettrait d'intégrer les données de la télégénomique cellulaire à celles histologiques pour évaluer l'impact de l'instabilité génomique et l'hétérogénéité tumorale dans le cancer du sein.

2. OBJECTIFS

2.1. Objectif général

Développer une méthodologie pour étudier l'instabilité génomique et l'hétérogénéité cellulaire des formes agressives du cancer du sein.

2.2. Objectifs spécifiques

- Décrire les caractéristiques pathologiques des formes équivoques de HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2).
- Évaluer les paramètres de la télégénomique cellulaire dans les formes équivoques de HER2
- Déterminer l'hétérogénéité des cellules cancéreuses en utilisant les paramètres de la télégénomique cellulaire
- Intégrer les données histologiques et de la télégénomique cellulaire pour évaluer l'hétérogénéité tumorale et l'instabilité génomique

3. GÉNÉRALITÉS

3.1. Définition du cancer du sein

Le cancer du sein est une prolifération maligne du tissu néoformé au niveau de la glande mammaire. Il peut se développer aux dépens de l'épithélium des canaux galactophores et des lobules pour donner le carcinome. Les sarcomes se développent aux dépens du tissu conjonctif (10).

3.2. Rappels sur le sein normal

3.2.1. Rappels anatomiques

3.2.1.1. Définition et situation

Le sein, du Latin *sinus* qui signifie «courbure», est un organe pair chez l'Homme. Ils sont plus volumineux chez la femme que chez l'homme. Ils sont constitués de graisses, de tissus conjonctifs, de glandes et de canaux. Chez la femme, après l'accouchement, ils secrètent du lait qui permet de nourrir le nouveau-né (11).

Les seins sont situés sur la partie antéro-supérieure du thorax, de part et d'autre du sternum, en avant des muscles pectoraux, et en regard de l'espace compris entre la 3^{ème} et la 7^{ème} côte. Le mamelon se situe au niveau de la 9^{ème} vertèbre dorsale. Leur poids est variable en fonction de l'état morphologique ou physiologique de la femme et oscille entre 200g à 900g (12).

3.2.1.2. Structure du sein (13)

➤ La peau et la plaque aréolo- mamelonnaire :

- **Le mamelon** désigne la région située au centre de l'aréole et d'où sort le lait. Il est aussi appelé "ostium papillaire" ou "papille ». Le mamelon est fait de fibres musculaires. Quand ces fibres se contractent, le mamelon durcit, ou pointe vers l'extérieur. Le mamelon est composé de l'aréole et du téton et est associé à un muscle sphincter qui permet au téton de se contracter. La peau du mamelon est poreuse et laisse passer le lait maternel au moment de l'allaitement.

- **L'aréole** est la surface ronde, rosée ou brunâtre qui entoure le mamelon. Elle contient de petites glandes qui libèrent, ou sécrètent, une substance huileuse qui agit comme lubrifiant pour le mamelon et l'aréole. De taille variable selon les individus, elle a en général un diamètre de 3 cm mais peut recouvrir entièrement la surface du sein ou être à peine visible. L'aréole est recouverte de quelques glandes aréolaires qui protègent le sein contre les infections et le dessèchement. L'aréole contient également un muscle qui permet l'érection du mamelon (11).

- **La glande mammaire** est une masse de densité variable, discoïde aplatie d'avant en arrière et de contour irrégulier. Elle est organisée en une vingtaine de lobes. Chaque lobe est composé de 20 à 40 lobules et chaque lobule contient 10 à 100 alvéoles. Les glandes produisent du lait quand elles sont stimulées par des hormones, et ce lait est transporté au niveau du mamelon par les canaux lactifères.

-**L'acinus ou alvéole** est une cavité arrondie en forme de cul de sac qui constitue la partie sécrétrice de la glande. Chaque acinus se draine par un canal intra lobulaire ou alvéolaire ou canal de troisième ordre. Plusieurs acini et les canaux intra lobulaires confluent pour former un lobule qui se draine par un canal inter lobulaire (canal galactophore de deuxième ordre). Plusieurs lobules se réunissent pour former un lobe glandulaire qui se draine par un canal galactophore de premier ordre. Les canaux galactophores convergent vers le mamelon. Ils s'élargissent d'abord pour former les sinus lactifères et se rétrécissent ensuite pour déboucher au niveau des pores du mamelon.

- **Le tissu adipeux et conjonctif** est étroitement lié au tissu glandulaire. La quantité de tissu adipeux est en grande partie responsable du volume des seins. On distingue deux couches graisseuses. La couche antérieure pré-glandulaire cloisonnée par des travées conjonctives et la couche postérieure qui est limitée par le fascia superficialis. Les ligaments qui sont des bandes serrées de tissus conjonctifs traversent les seins de la peau jusqu'aux muscles où ils se fixent au thorax.

➤ **La vascularisation.**

• **Vascularisation artérielle**

Elle est assurée par le réseau sous-dermique et le réseau pré-glandulaire. La plaque aréolo-mamelonnaire est vascularisée par trois groupes de fines artères : le plexus sous-dermique et sous aréolaire, les capillaires péri-galactophoriques, rétro-mamelonnaire, et les branches radiaires venues du cercle artériel péri-mamelonnaire.

• **Vascularisation veineuse**

Dans la région aréolo-mamelonnaire, il existe deux plexus veineux : un plexus péri aréolaire et un plexus péri mamelonnaire comprenant un courant superficiel et profond.

• **Vascularisation lymphatique**

Les lymphatiques du sein sont divisés en lymphatiques cutanés et en lymphatiques de la glande elle-même. La vascularisation joue un rôle important dans la survenue de métastases. Les cellules tumorales peuvent acquérir une motilité accrue, ce qui leur permet de se séparer de la masse tumorale et voyager à travers canaux lymphatiques, par la circulation sanguine, ou directement à travers les tissus conjonctifs. Par contre, d'autres cellules subissent des modifications structurales tout en changeant leurs expressions protéiques pour temporairement ressembler à des cellules mésenchymateuses qui ont une tendance plus grande de se métastaser.

• **Innervation**

Le sein est innervé par trois grands groupes de nerfs qui convergent vers la plaque aréolo-mamelonnaire: le groupe antérieur (les branches cutanées antérieures des 2^{ème}, 3^{ème}, 4^{ème}, et 5^{ème} nerfs intercostaux), le groupe latéral (les rameaux cutanés latéraux du 4^{ème} et 5^{ème} nerfs intercostaux), le groupe supérieur (la branche sous-claviculaire du plexus cervical superficiel) (14). Nous avons ci-dessous une image de la structure du sein (figure 1)

FIG. 4.11. Coupe sagittale du sein et de la paroi thoracique

1. m. subclavier
2. fascia clavi-pectoral
3. fascia endothoracique
4. plèvre pariétale
5. m. grand pectoral
6. m. petit pectoral
7. espace rétro-mammaire
8. fascia thoracique superficiel
9. fascia pectoral
10. sillon supra-mammaire
11. fascia rétro-mammaire
12. fascia pré-mammaire
13. ligaments suspenseurs du sein
14. lobule mammaire
15. sinus lactifère
16. papille
17. aréole
18. graisse pré-mammaire
19. sillon infra-mammaire

Cartouche : aspect schématique des ligaments suspenseurs du sein

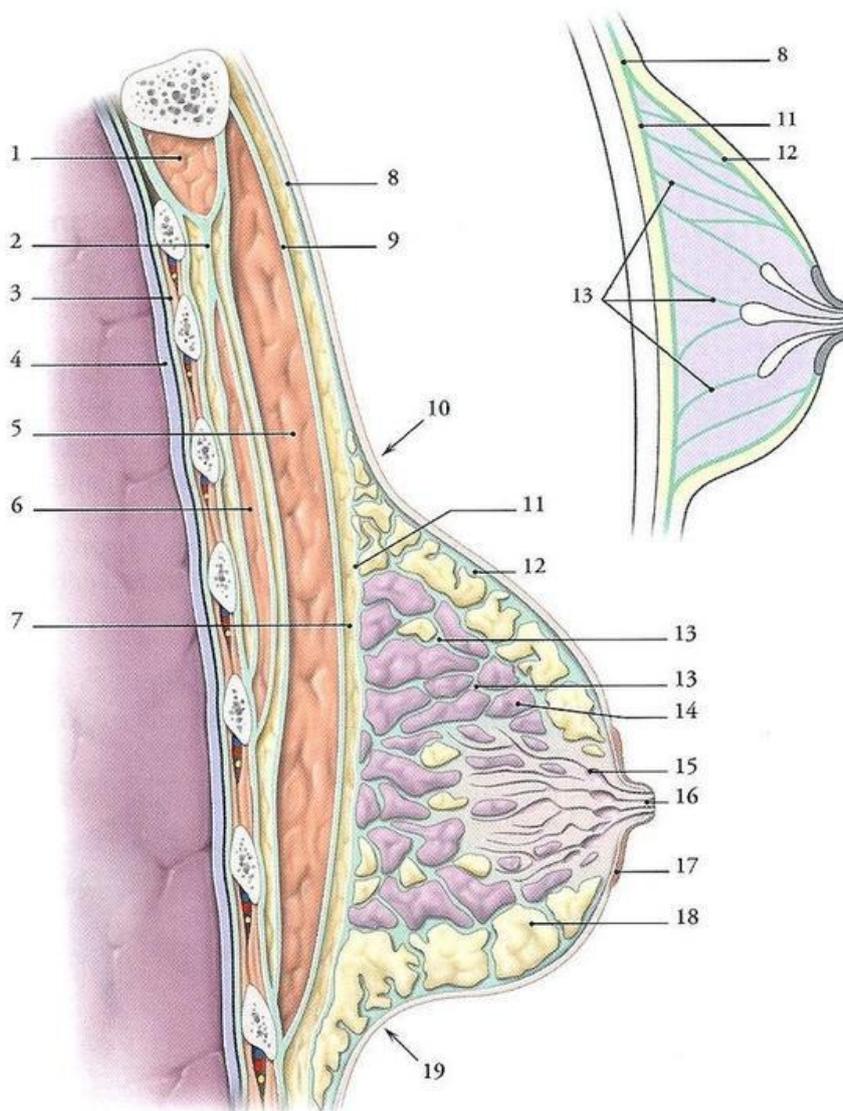


Figure 1: structure anatomique du sein

<https://talc.forumgratuit.org/t6699-qcm-32-qcm-36-201>

3.2.2. Rappels physiologiques

Il existe une grande variation physiologique du sein durant les différentes étapes de la vie d'une femme. Toutes ces variations seraient dues à l'action de plusieurs hormones sur les glandes mammaires.

- La période post natale: il y a une sécrétion du colostrogène qui entraîne une tuméfaction des seins.
- La période infantile: les canaux galactophores s'allongent et les conduits interlobulaires se ramifient.
- La période pubertaire: il y a un accroissement du stroma conjonctif et une augmentation du corps mammaire.
- La période du cycle menstruel: l'œstrogène et de la progestérone entraînent une modification du volume des seins qui apparaissent généralement plus tendus voir sensibles ou douloureux.
- La gestation: en plus de l'œstrogène et de la progestérone, il y a sécrétion de l'hormone placentaire lactogène et de l'hormone chorionique somatotrope. Le corps mammaire augmente considérablement de volume.
- La lactation : l'action de la prolactine entraîne la sécrétion du lait. Le lait est conduit au mamelon par les canaux galactophoriques. La production de lait cesse dans les 7 à 10 jours, s'il n'y a pas de stimulation par succion du mamelon.
- La période ménopausique : la diminution du taux d'œstrogène et de progestérone conduit à une disparition progressive des acini.

3.2.2.1. Action des hormones sur le sein

- **Œstrogènes**

Les œstrogènes sont des hormones qui agissent directement sur les canaux excréteurs de la glande mammaire afin de stimuler la croissance des canaux galactophores ainsi que la différenciation et le développement de l'épithélium galactophorique.

- **Progestérone**

C'est une hormone qui limite les effets des œstrogènes et interagissant avec la prolactine. Elle s'oppose à l'augmentation de la perméabilité capillaire, provoquée par les œstrogènes, et diminue donc les phénomènes œdémateux en contribuant au développement des acini.

- **Prolactine**

La prolactine agit au niveau des acini mammaires pour entraîner la sécrétion du lait, et son action peut être inhibée par les œstrogènes et la progestérone.

Il existe d'autres hormones agissant sur le sein telles que : l'ocytocine, la LH (Luteinizing Hormone), et la FSH (Follicle Stimulating Hormone) (15).

3.3. Épidémiologie du cancer du sein

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme et la principale cause de décès dû au cancer chez les femmes. En 2020, il y avait un environ 2,3 millions de nouveaux cas de cancer du sein et 685 000 décès du cancer du sein dans le monde. Le cancer du sein est la première cause de décès par cancer avec un taux de 6,9% du total de décès par cancer (2). Le taux de survie du cancer du sein est très variable d'un pays à l'autre, allant jusqu'à 80% ou plus en Amérique du Nord, au Suède et au Japon. Ce taux est de 60% dans les pays à revenus intermédiaires, et moins de 40% dans les pays à faibles revenus (16).

Au Mali en 2020, le cancer du sein était classé comme étant le cancer le plus fréquent. Malgré la sous-évaluation du nombre de cancer du sein due à la difficulté d'accès aux données,

le Mali a enregistré 2448 nouveaux cas en 2020 selon GLOBOCAN. Ce qui représentait 17,3% du total de cancers des deux sexes confondus (masculin et féminin) et 27,2% du total de cancer chez la femme (17). L'accroissement de ce taux serait dû aux habitudes alimentaires, à la sédentarité, à l'obésité, à certaines habitudes comportementales et à des facteurs génétiques (4, 18).

3.4. Facteurs de risque

L'étiologie du cancer du sein n'a pas été totalement élucidée. Cependant, il existe certains facteurs de risque tels que:

- Âge;
- Sexe;
- Antécédents personnels de pathologies mammaires (cancer du sein, hyperplasie atypique);
- Antécédents familiaux de cancer du sein dont les prédispositions génétiques (principalement mutation des gènes *BRCA1*, *BRCA2* ou *TP53*);
- Antécédents de radiothérapie thoracique à haute dose (par exemple pour un lymphome de Hodgkin);
- Surpoids et obésité chez la femme ménopausée;
- Durée de l'exposition de l'organisme aux hormones;
- Tabagisme et la consommation d'alcool;
- Facteur viraux (cytomégalovirus, virus de l'herpès virale, virus d'Epstein Barr, ou papilloma virus) (18,19);

3.5. Diagnostic

3.5.1 Circonstances de découverte

Le cancer du sein peut être découvert :

- Lorsqu'une tuméfaction est découverte par la patiente ou lors d'un examen systématique;
- Lors d'une mammographie systématique ou de dépistage ;
- Par la présence d'écoulement mamelonnaire séreux ou sanglant;
- Par la découverte d'une anomalie du mamelon : maladie de Paget (ulcération, prurit, lésion eczématiforme);
- Par la déformation du sein due à une masse tumorale;
- À partir d'adénopathies ou de métastases;

3.5.2. Examen clinique

3.5.2.1. Interrogatoire

Il précise l'âge, la profession, le statut familial, les antécédents médico-chirurgicaux et gynéco-obstétricaux (facteurs de risque, traitement hormonal, antécédent d'irradiation, etc.), les antécédents familiaux du cancer du sein (intérêt de réaliser un arbre généalogique s'il existe plus d'un cas), le délai passé depuis le premier symptôme, et le mode évolutif etc.

3.5.2.2 Examen physique

Il comprend :

- **Inspection**

C'est le premier temps de l'examen au cours duquel on peut retrouver : un aspect inflammatoire « peau d'orange », une déformation du sein (voussure plate, ride cutanée, rétraction de la peau et/ou du mamelon). Dans certains cas avancés, on peut retrouver une peau œdémateuse associée à un bourgeonnement, des ulcérations ou des nodules de perméation. Enfin, l'examen peut retrouver un écoulement parfois sanguinolent ou une maladie de Paget du mamelon.

➤ **Palpation**

Elle doit se faire de façon rigoureuse et doit être indolore. Les deux seins sont explorés quadrant par quadrant sans oublier le prolongement axillaire en commençant par le sein supposé sain, à la recherche de nodule ou de masse dont on précisera les caractères (11).

3.5.2.3. Examens complémentaires

➤ **La mammographie**

C'est l'examen essentiel dont la sensibilité est de l'ordre de 80%. Elle utilise des clichés des deux seins afin d'apprécier l'opacité stellaire maligne typique et les micros calcifications malignes typiques.

➤ **L'échographie**

C'est un examen qui est utile, surtout en cas de sein dense chez la jeune femme où la mammographie est peu sensible. Elle permet de différencier une tumeur pleine d'un kyste.

➤ **L'Imagerie par résonance magnétique**

Elle n'est indiquée qu'en cas de difficulté d'analyse des lésions par des explorations classiques ou dans l'exploration des seins préalablement traités par une chirurgie conservatrice.

➤ **La galactotrophie**

Elle est indiquée chaque fois qu'il existe un écoulement d'un refoulement, d'une lacune irrégulière ou d'une amputation d'un galactophore.

➤ **La Kystographie**

Elle est indiquée quand il existe des gros kystes.

3.5.3. Examens anatomo pathologiques (20)

3.5.3.1. Cytologie

Elle est très utile et complète l'examen clinique, la mammographie et l'échographie. Elle fait partie du bilan diagnostique et peut orienter le clinicien dans les cas incertains. La cytoponction doit être réalisée sur tout nodule. En cas de tumeur palpable de nodule

mammographique, la cytoponction est réalisée par ponction à l'aiguille fine en plein masse. Pour les tumeurs non palpables, elle se fera sous échographie guidée.

3.5.3.2 Histologie

L'examen histologique certifie le caractère néoplasique de la lésion. Cet examen est le préalable indispensable à toute attitude thérapeutique, ainsi qu'au bilan d'extension. Il permet, en outre, de préciser les caractéristiques histologiques de la tumeur, de réaliser la gradation histologique de Scarff, Bloom et Richardson (SBR), d'effectuer une évaluation des récepteurs hormonaux aux œstrogènes et à la progestérone, et de guider les examens moléculaires. L'examen histologique pourra se faire sur une biopsie ou une exérèse chirurgicale.

3.5.3.3 Examen macroscopique

L'examen macroscopique du cancer du sein est d'abord réalisé par le chirurgien, et ensuite plus en détails par l'anatomopathologiste. Il permet d'avoir une forte présomption sur la nature d'une tumeur ainsi que son extension. Au cours de l'examen macroscopique, la pièce opératoire est pesée, mesurée et éventuellement photographiée. Des prélèvements numérotés, identifiant différentes zones, sont faits pour l'examen microscopique.

3.5.3.4.Examen microscopique

L'examen microscopique est un processus qui comprend: la fixation et l'inclusion de l'échantillon, l'utilisation de colorations standards telles que la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine, l'immunohistochimie et l'observation microscopique. Cet examen microscopique permet de déterminer les formes pathologiques suivantes :

➤ Les carcinomes non-infiltrants ou carcinomes *in situ*

- **Le carcinome canalaire *in situ* (CCIS)**

Il constitue 4% des cancers du sein. C'est un carcinome des canaux galactophores n'infiltrant pas le tissu conjonctif voisin et est caractérisé par quatre types architecturaux : massifs, comédons, papillaires, et cribriformes. L'aspect macroscopique du CCIS peut se

traduire par une tumeur à contour irrégulier ou un placard tumoral mal individualisé. Il existe deux types de CCIS: le CCIS comédocarcinome et le CCIS non comédocarcinome. Le carcinome canalaire in situ comédocarcinome se distingue par la présence de nécrose dans la partie centrale des cellules cancéreuses. Ce type de cancer se développe plus rapidement et a tendance à se propager au tissu mammaire voisin. Le carcinome canalaire *in situ* non comédocarcinome comprend le CCIS solide, le CCIS cribriformes et le CCIS papillaire (21).

- **Le carcinome lobulaire *in situ* (CLIS):**

Le carcinome lobulaire in situ se développent au niveau des canalicules qui sont comblés et distendus par une prolifération de cellules peu jointives sans envahissement du tissu conjonctif voisin. À l'histologie, il présente un aspect en « sac de billes ». Ils sont rares (environ 0,5 % des carcinomes mammaires) et sont actuellement plutôt considérés comme des marqueurs de risque de développer un cancer infiltrant (risque de 8 par rapport à la population normale) qu'il soit homo- ou controlatéral. L'âge moyen de survenue est de 45 ans. Le carcinome lobulaire *in situ* a une évolution multicentrique. Dans certains cas il est susceptible de bilatéralité (22).

➤ **Les carcinomes infiltrants**

- **Les carcinomes canaux infiltrants :**

Ils constituent l'entité la plus importante avec une fréquence de 70%. Ils peuvent comporter des foyers de carcinome intra canalaire. Le quadrant supéro-externe est sa zone de prédilection d'apparition, et les femmes en pré et post ménopause sont plus susceptibles de faire un carcinome canalaire infiltrant. À la macroscopie on observe une tumeur sous forme étoilée, irrégulière, circonscrite, ou lobulée.

On distingue :

- ✓ Les carcinomes canaux infiltrants hautement différenciés qui comportent les formes tubuleuses et les formes papillaires infiltrantes ;

- ✓ Les carcinomes polymorphes qui associent des plages glandulaires et des travées;
- ✓ Les carcinomes atypiques qui n'ont aucune structure glandulaire.

- **Carcinomes lobulaires infiltrant (CLI)**

Ce carcinome lobulaire infiltrant formé de cellules régulières ressemblant à celles du carcinome lobulaire *in situ* et ayant en général un faible taux de mitoses. Il est beaucoup moins fréquent que le carcinome canalaire infiltrant (5 à 15% des cancers du sein). Macroscopiquement, il est caractérisé par un placard de blindage très mal limité. À l'histologie, il est associé dans 70% des cas à un carcinome lobulaire *in situ* (C.L.I.S). La forme typique est caractérisée par des cellules isolées en « fil indienne », groupées de façon concentrique au tour des canaux. Ces cellules sont régulières avec inclusions cytoplasmiques de mucus. Le carcinome lobulaire infiltrant est caractérisé aussi par un aspect très particulier des métastases ganglionnaires sous forme « pseudo réticulaire » rendant souvent difficile leur détection sur les coupes histologiques. (15)

Il existe d'autres types histologiques du cancer du sein tels que :

- La maladie de Paget du mamelon
- Le carcinome muqueux ou cancer colloïde
- Le carcinome tubuleux
- Les carcinomes à cellules fusiformes
- Les sarcomes

3.6. Classifications

3.6.1. Classification biologique

L'examen histopathologie permet d'obtenir des informations sur le choix du traitement et le pronostic vital du cancer.

➤ **La forme hormono-dépendante:** cette forme est positive aux récepteurs d'œstrogènes et/ou progestérone à l'immunohistochimie. Les cancers appartenant à cette forme

se nourrissent d'un excès de production d'hormones (œstrogènes et /ou progestérone). Ils ont une bonne réponse aux traitements anti hormonaux et un bon pronostic par rapport aux autres formes biologiques

➤ **La forme HER2**(human epidermal growth factor receptor 2) **positive** : Le gène du récepteur 2 du facteur de croissance épidermique humain (*HER2*, symbole officiel *ERBB2*) est situé sur le bras long du chromosome 17 (17q) et amplifié chez 15 à 20 % des patientes atteintes d'un cancer du sein. L'amplification de *HER2* est un biomarqueur pronostique associé à un mauvais pronostic. L'expression de *HER2* est également un prédicteur des réponses aux médicaments qui ciblent HER2 (y compris le trastuzumab, le lapatinib et le pertuzumab) qui sont actuellement approuvés par plusieurs organismes de réglementation des médicaments pour le traitement des patientes atteintes d'un cancer du sein HER2 positif . Les patientes avec un score IHC de 3+ sont éligibles pour une thérapie ciblée sur HER2, tandis que les patientes avec un score de 0 ou 1+ ne surexpriment pas HER2 et sont donc inadaptées au traitement. Les échantillons de patients avec un résultat équivoque en immunohistochimie (IHC 2+) doivent être évalués pour déterminer le nombre de copies du gène *HER2* en utilisant l'hybridation *in situ* qui peut être en fluorescence ou pas. Dans environ 5% des échantillons de cancer du sein, le nombre de copies HER2 ne peut pas être évalué avec FISH (fluorescence in situ hybridization) en raison de la mauvaise qualité des tissus, qui peut être due à une mauvaise manipulation, en particulier dans les cas où des méthodes de fixation inappropriées sont utilisées (23) .

La surexpression de la protéine HER2 peut être causée en général par une amplification du gène *HER2* ou un autre mécanisme pouvant entraîner une expression accrue de la protéine HER2. Cette surexpression entraîne une prolifération anormale des cellules et une instabilité génomique. Sans une thérapie ciblée, cette forme a un mauvais pronostic.

➤ **La forme triple négative** : les cancers de cette forme n'expriment les récepteurs œstrogènes et progestérone, et il n'y a pas d'amplification du gène *HER2* ou de surexpression de la protéine HER2. Ces cancers sont associés à un risque élevé de récurrence, de métastases et de d'un taux de mortalité élevé.

➤ **Forme HER2 équivoque** : Cette forme est classée cliniquement parmi celles des hormono-dépendante ou des triple négative. Cependant, ce groupe nosologique est très difficile à traiter car il présente une instabilité génomique associée à une relative polysomie du chromosome 17 et/ou d'une aneuploïdie. Cette forme de cancer du sein est un modèle idéal pour étudier l'instabilité génomique à cause de la grande variation de nombre copies chromosomiques observées dans ces formes (24). Les formes HER2 équivoques sont diagnostiquées sur la base de l'immunohistochimie ou la technique FISH. Les critères de diagnostic sont : le score +2 en immunohistochimie ; le nombre de copie de *HER2* entre 4-6/cellule et le ratio HER2/Centromère de 17 < 2 en FISH.

Algorithme d'interprétation des résultats d'immunohistochimie HER2 (25)

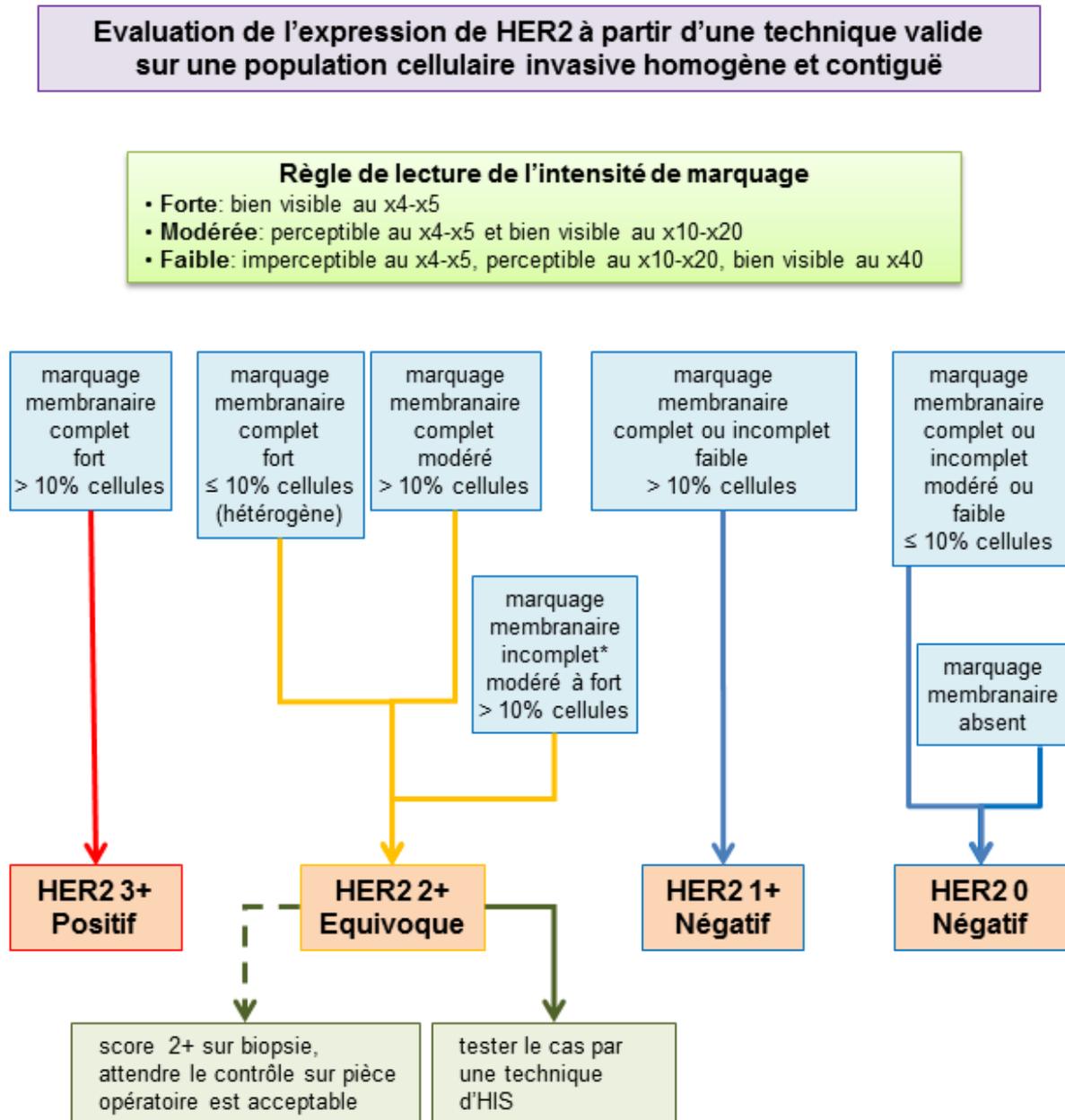


Figure 2: Algorithme d'interprétation des résultats d'immunohistochimie HER2

3.6.2. Classification T.N.M (4)

Tableau I: classification TNM du cancer du sein

T : Tumeur primitive	N : Adénopathies regionaux	M : Métastases à distance
TIS : Carcinome in situ ou Maladie de paget du mamelon sans tumeur décelable		
Tx: Détermination de la tumeur impossible	Nx : Appréciation impossible	Mx: Appréciation impossible
To: Pas de tumeur primitive	No: pas de ganglion Axillaire palpable	Mo: pas de métastase à distance
T1: Tumeur < 2cm	N1: Ganglions axillaires homolatéraux mobiles	M1: Métastases à distance (y compris ganglions sus claviculaires)
T2: Tumeur >2 cm et <5cm	N2: Ganglions axillaires homo latéraux fixes	
T3: Tumeur > 5cm	N3: Ganglions Mammaires homolatéraux fixes	
T4: Extension directe à la paroi thoracique ou à la peau		

3.6.3. Stadification (26)

Elle permet d'apprécier l'étendue du cancer et s'effectue à l'aide des examens cliniques radiologique et anatomopathologique. Elle est fonction de la classification TNM. La classification TNM est la plus fréquemment utilisée, elle repose sur 3 critères:

« **T** » pour la **taille** et l'infiltration de la tumeur, allant de Tx (tumeur non évaluable) à T4.

« **N** » pour le degré d'envahissement des **ganglions** lymphatiques, allant de Nx (envahissement des ganglions non évaluable) à N3.

« **M** » pour la présence ou non de **métastases** à distance; avec Mx (renseignements insuffisants pour classer les métastases), M0 (absence de métastase) ou M1 (présence de métastases).

La combinaison TNM indique le stade.

Stade 0 : Cancer *in situ* :

La tumeur reste localisée au niveau du canal où elle a pris naissance. La tumeur est non infiltrante et n'a pas dépassé la membrane basale (Tis N0 M0).

Stade I : Tumeur \leq 2cm, sans atteinte ganglionnaire, sans métastases à distance

Stade II : comprend deux types

- Tumeur \leq 5 cm avec envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sentinelles mammaires internes, sans métastases (T0/1/2 N1 M0)
- Tumeur $>$ 2 cm, sans atteinte ganglionnaire, sans métastases (T2/3 N0 M0).

Il existe les stades IIA et IIB.

Stade III :

- Toute tumeur, sans métastases, avec au moins 4 ganglions axillaires atteints ou envahissement mammaire interne clinique ou atteinte des ganglions sous-claviculaires ou des ganglions sus-claviculaires homolatéraux (tous T N2/3 M0) ;
- ou tumeur avec extension directe à la paroi thoracique ou à la peau ; ou tumeur inflammatoire (T4 tous N M0);
- ou tumeur $>$ 5 cm avec envahissement de 1 à 3 ganglions axillaires ou atteinte des ganglions sentinelles mammaires internes (T3/4 N1 M0).

Il existe les stades IIIA, IIIB et IIIC.

Stade IV : cancer métastatique.

Indépendamment de la taille de la tumeur et du degré d'envahissement ganglionnaire, la présence de métastases à distance classe le cancer en stade IV (tous T tous N M1).

3.6.4. Grades du cancer du sein

Le grade de Scarff Bloom et Richardson est basé sur 3 paramètres affectés d'un score. Le grade est déterminé par la somme des 3 scores et permet d'évaluer l'agressivité de la tumeur.

Tableau II: Classification de Scarff Bloom et Richardson (27).

Paramètres histologiques	Scores		
	Score : 1	Score : 2	Score : 3
Formation Glandulaire	Plus de 75% de la tumeur	Entre 10 et 75% de la tumeur	Moins de 10% de la tumeur
Pléomorphisme Nucléaire	Petits noyaux réguliers	Noyaux légèrement augmentés de taille	Augmentation marquée, atypies marquées
Index mitotique	0-8 mitoses par champs	9-17 mitoses par champ	17 mitoses ou plus par champ

Chacun de ces 3 critères est noté de 1 à 3, le score global obtenu détermine le grade histologique

Il est déterminé lors de l'examen anatomopathologique, en prenant en compte :

- L'aspect des cellules cancéreuses: plus une cellule cancéreuse s'est modifiée par rapport aux cellules normales, plus elle est agressive.
 - Les caractéristiques des noyaux des cellules: plus les noyaux des cellules sont gros et de tailles et de formes variées, plus les cellules sont agressives.
 - Le nombre de cellules en mitoses (multiplication des cellules): plus ce nombre est important, plus les cellules de la tumeur se divisent rapidement, plus le cancer peut se propager, ce qui est un critère d'agressivité.
- Le **grade** est **I** ou bas grade pour des scores totaux de 3, 4 ou 5. Les tumeurs sont les moins agressives.
 - Le **grade** est **II** pour les scores de 6 ou 7. Les tumeurs sont d'une agressivité intermédiaire et peuvent présenter une clonalité accrue.
 - Le **grade** est **III** ou haut grade x pour des scores de 8 ou 9. Les tumeurs sont très agressives.

3.7.Traitement: (4)

Le traitement consiste en la guérison ou à l'atténuation des symptômes du cancer. Il est fonction du type, du stade, du grade, de la sensibilité aux hormones.

Il existe différents types de traitement dont le traitement locorégional (radiothérapie, chirurgie) et les traitements pharmacologiques (chimiothérapie, hormonothérapie, thérapie ciblée et immunothérapie)

3.7.1. Chirurgie

- La mastectomie radicale consiste à retirer la totalité de la glande mammaire, la plaque aréolo-mamelonnaire et conservant les muscles pectoraux en associant un curage axillaire homolatéral.

- La tumorectomie (chirurgie mammaire conservatrice) associée à un curage axillaire homolatéral (étages inférieur et moyen du creux axillaire) est de plus en plus fréquente.

3.7.2. Radiothérapie

La radiothérapie consiste à délivrer localement des rayons, ou radiations ionisantes, qui provoquent des dommages à l'ADN. Ces dommages entraînent l'arrêt du cycle cellulaire et la mort des cellules par apoptose (28).

3.7.3. Traitement systémique

Ce traitement systémique peut se faire en néoadjuvant dont l'objectif est de diminuer la masse tumorale et connaître la sensibilité des cellules tumorales aux traitements utilisés. Le traitement néoadjuvant précède toujours toute procédure chirurgicale. Après une intervention chirurgicale, on peut administrer un traitement adjuvant dont l'objectif est de diminuer les risques de récurrence. Le traitement systémique consiste à administrer la chimiothérapie, l'hormonothérapie, la thérapie ciblée ou l'immunothérapie.

➤ **Chimiothérapie** : La chimiothérapie est indiquée lorsqu'il y a des risques de récurrence tels que des stades avancés du cancer du sein, des formes agressives (le triple négative, HER2

positives, formes équivoques d'HER2). C'est le traitement du cancer par des agents chimiques toxiques tels que les agents intercalants (Adriamycine, Epirubicine); les alkylants (Carboplatine, Oxaliplatine, etc.); les antimétabolites (5-Fluorouracile, Capécitabine, antagonistes puriques ou foliques); les agents toxiques pour fuseau mitotique (Vinorelbine, Taxanes, Eribuline).

➤ **Hormonothérapie:** Elle est indiquée lorsqu'il existe une positivité des cellules cancéreuses aux récepteurs d'œstrogènes et progestérone. Elle utilise des molécules agissant sur la sécrétion des hormones qui agissent sur les cellules cancéreuses (œstrogène et la progestérone). On utilise des modulateurs sélectifs des récepteurs de l'œstrogène : Tamoxifène (effets secondaires : bouffée de chaleur, ostéoporose, sècheresse vaginale) ; ou des inhibiteurs de l'aromatase (IA) : Anastrozole, Letrozole, Exemestane (effets secondaires : cataracte, bouffée de chaleur et écoulement vaginal).

➤ **Thérapie ciblée :**

La thérapie ciblée agit de façon très sélective les cellules cancéreuses selon une des caractéristiques (protéine, gène, récepteur) influant le développement de la tumeur. Ces thérapies ciblées entraînent en général moins d'effets secondaires que les chimiothérapies auxquelles elles sont associées. Lorsque les résultats anatomopathologiques de la tumeur du sein retrouvent une expression de la protéine HER2 positive, on peut adjoindre à la chimiothérapie la thérapie ciblée. Les classes de molécules utilisées en thérapie ciblée dans le cancer du sein sont les suivantes.

- Anticorps monoclonaux : ce sont des protéines qui se fixent à la protéine HER2 sur les cellules cancéreuses, pour inhiber la croissance cellulaire

-Trastuzumab (Herceptin) est un anticorps monoclonal utilisé comme traitement standard du cancer du sein métastatique HER2 positif.

-Pertuzumab (Perjeta) est un nouvel anticorps humanisé recombinant, son association au trastuzumab plus docétaxel a été approuvée pour le traitement HER2 positif

-Margetuximab (Margenza) est un anticorps monoclonal de deuxième génération pour le traitement du cancer du sein HER2-positif.

- Les anticorps conjugués: ce sont des anticorps monoclonaux associés à une molécule de chimiothérapie

-Ado-trastuzumab/ emtansine (Kadcyla)

- Les inhibiteurs de kinases :

-Lapatinib (Tykerb): est un double inhibiteur de la tyrosine kinase (TKI), bloquant l'activité de la tyrosine kinase HER1 et HER2 en se liant au site de liaison à l'adénosine triphosphate (ATP) du domaine intracellulaire du récepteur.

- Nératinib (Nerlynx) : est un inhibiteur du récepteur de la tyrosine kinase disponible par voie orale qui est utilisé dans le traitement adjuvant prolongé du cancer du sein à un stade précoce.

7.3.4. Prise en charge des métastases

Il permet de :

- ✓ Prolonger la survie
- ✓ Contrôler les symptômes
- ✓ Améliorer la qualité de vie

3.8. L'instabilité génomique dans le cancer du sein

L'instabilité génomique est une des caractéristiques du cancer (figure 3). Elle fait référence à la vitesse accrue à laquelle les cellules cancéreuses subissent des altérations génomiques. La figure 3 représente les différentes caractéristiques acquises par une cellule cancéreuse.

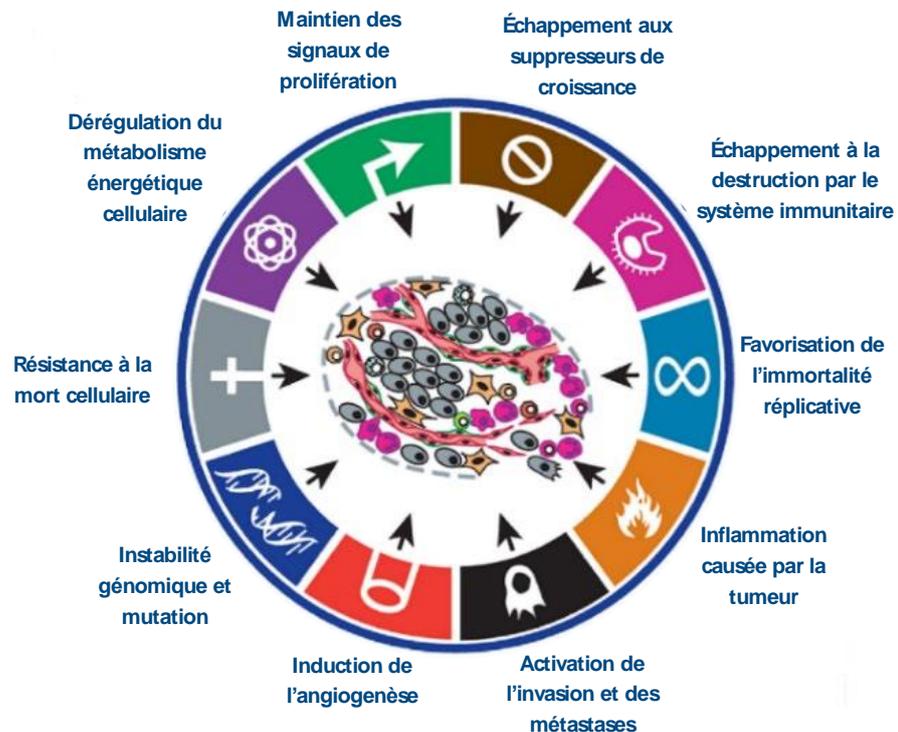


Figure 3: Les différentes caractéristiques d'une cellule cancéreuse.

<https://www.ccra-acrc.ca/wp-content/uploads/2021/09/Understanding-Cancer-Hallmarks-of-Cancer-FR.pdf> (29)

Ces altérations comprennent de petites variations structurelles, telles que des mutations de paires de bases et de courtes insertions ou délétions, ainsi que des variations structurelles importantes, comme la perte ou le gain de fragments de chromosomes ou de chromosomes en entier. L'acquisition de ces derniers est également appelée instabilité chromosomique (CIN). L'intégrité génomique est étroitement surveillée par plusieurs mécanismes, notamment les points de contrôle des dommages à l'ADN, les mécanismes de réparation de l'ADN et les points

de contrôle mitotique. Les altérations de ces mécanismes de surveillance peuvent provoquer l'instabilité génomique(30).

Les cellules du cancer du sein présentent fréquemment des modifications chromosomiques numériques et structurelles (31).

L'instabilité chromosomique numérique (nCIN) fait référence au gain ou à la perte de chromosomes entiers, ce qui entraîne un nombre anormal de chromosomes, également appelé aneuploïdie. La nCIN est favorisée par plusieurs mécanismes, notamment des défauts dans la réparation des dommages à l'ADN, la réplication de l'ADN, la ségrégation des chromosomes et la stabilité des télomères. Ces mécanismes sont intimement liés. L'instabilité chromosomique structurelle (sCIN) fait référence au gain ou à la perte de fragments de chromosomes ou à des réarrangements chromosomiques, entraînant des translocations, des délétions, des amplifications et/ou des inversions (32). Deux mécanismes majeurs sont maintenant bien établis pour la sCIN. Premièrement, la réparation incorrecte des cassures double brin d'ADN dans les cellules cancéreuses du sein, qui peut provoquer des translocations, des duplications et des délétions, est directement favorisée par les lésions affectant les gènes de réparation de l'ADN (par exemple, les mutations de *BRCA1*, *BRCA2*). Deuxièmement, l'activation ou la surexpression d'oncogènes favorise les cassures à double brin d'ADN, associées à la réplication, ce qui est appelé "stress de réplication de l'ADN induit par les oncogènes".

Les génomes des cancers du sein sont souvent tétraploïdes ou quasi-triploïdes (33) et présentent des aberrations chromosomiques numériques et structurelles complexes spécifiques, ainsi que des altérations du nombre de copies, telles que le gain 1q et l'amplification *ERBB2* (31,34).

La genèse de ces modifications caryotypiques n'est souvent pas aléatoire. Par exemple, les petits chromosomes sont perdus plus facilement et les dommages à l'ADN se produisent de préférence dans les régions euchromatiques (35,36). En outre, l'observation de la récurrence de

certaines altérations chromosomiques indique qu'elles sont sélectionnées au cours du développement du cancer du sein, ainsi qu'en réponse aux traitements de chimiothérapie (35,37).

Sur la base de l'analyse de l'altération du nombre de copies (ANC), trois d'altérations génomiques distinctes ont été rapportées (38). Le premier modèle associé à l'ANC, appelé "simple ou simplex", présente un gain caractéristique de 1q et de 16p avec perte de 16q et est associé à aux tumeurs positives aux récepteurs d'œstrogènes (ER). Le second modèle est appelé "amplificateur" et présente des amplifications focales de haut niveau de l'ADN, regroupées sur un ou plusieurs bras chromosomiques. Ce modèle est caractéristique des tumeurs du sous-type luminal B et principalement ERBB2 (également connu sous le nom de HER2 pour human epidermal growth factor receptor 2) avec des sites fréquemment amplifiés, tels que *FGFR1*, *MYC*, *CCND1*, *MDM2*, *ERBB2* et *ZNF217*. Enfin, le troisième modèle, appelé " complexe ", est caractérisé par des profils complexes de gains et de pertes, couvrant généralement de courtes régions chromosomiques. Ce type de signature s'observe principalement dans les tumeurs triple-négatives de type basal (38).

Les efforts récents pour comprendre l'instabilité sont axés sur la nécessité d'élucider son rôle dans l'initiation ou la progression du cancer et d'identifier les signatures moléculaires propres à chaque sous-type de cancer du sein. En outre, ils visent à découvrir et développer des outils de diagnostic et de nouvelles pistes thérapeutiques.

3.9. Télomères

3.9.1 Définition

Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques constitué de répétitions de séquences TTAGGG situés au niveau des extrémités des chromosomes associées à des protéines spécialisées. En somme, les télomères sont constitués d'ADN, d'ARN, de protéines et d'hétérochromatine (39).

3.9.2 Structure

La structure des télomères est formée de l'ADN télomérique, des protéines spécifiques aux télomères, de l'hétérochromatine télomérique, de nucléosomes télomériques, de l'ARN télomérique, et des protéines associées. Dans les cellules de mammifères, l'ADN télomérique contient des répétitions en tandem double brin de TTAGGG suivies d'une prolongation de l'extrémité 3' riche en G monobrins (Figure 4). En raison de leur richesse en G au niveau du brin G 3', des quadruplex de guanines peuvent se former, où chaque base G sert à la fois de donneur et d'accepteur pour la liaison hydrogène. L'ADN des télomères adopte la structure de la boucle en T, où l'extrémité des télomères se replie sur elle-même et la prolongation du brin 3' G coiffe l'autre brin et sert de capuchon. L'image illustrative d'un chromosome est représentée par la figure ci-dessous (figure 4).

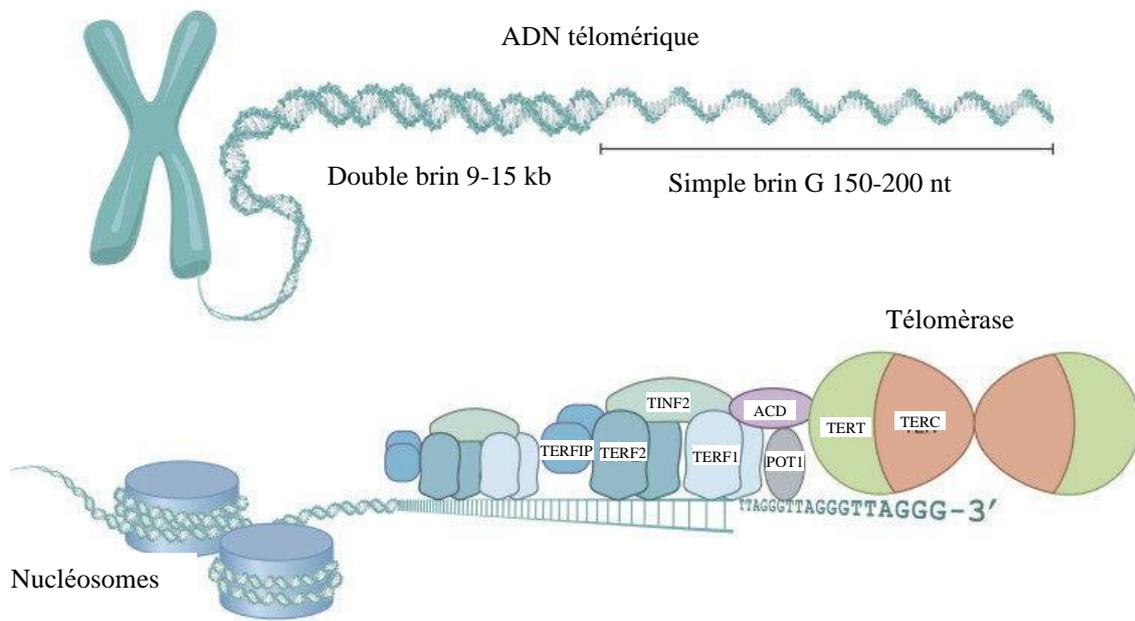


Figure 4: Schéma illustratif de télomère (40)

Le complexe de shelterin constitue l'ensemble des protéines télomériques nécessaires au bon fonctionnement des télomères. Ces protéines jouent des rôles importants dans la

régulation de la longueur et de la structure des télomères. Elles sont au nombre de six protéines : TERF1, TERF2, TINF2, ACD, POT1 et TER2IP (41).

Comme le reste de l'ADN génomique, les télomères sont enveloppés dans des nucléosomes, mais avec quelques particularités. Les télomères ont une affinité plus faible pour l'octamère d'histones que le reste de l'ADN génomique (42). Les nucléosomes télomériques ont également une longueur plus courte que celle du reste du génome (43). Les nucléosomes télomériques sont aussi plus mobiles que leurs homologues du reste du génome (44). En somme, ces différentes caractéristiques des nucléosomes télomériques feraient qu'ils assument des fonctions régulatrices de la structure et de la longueur des télomères en permettant aux protéines télomériques et à la télomérase d'avoir un plus grand accès. L'hétérochromatine télomérique représenté par la figure 5 sert de support au filament d'ADN et est constituée de protéines histoniques méthylées et acétylés.

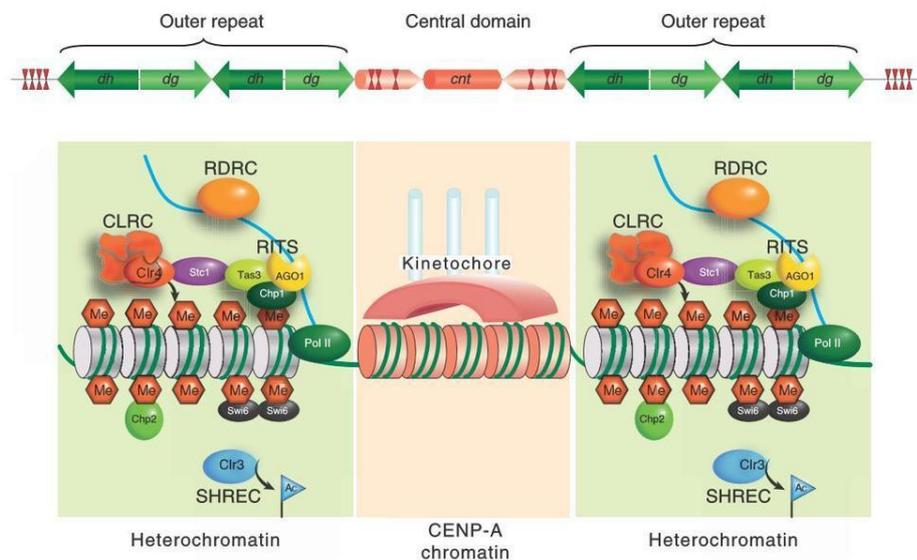


Figure 5: structure de l'hétérochromatine (45).

3.9.3 Fonction des télomères

Le rôle principal des télomères est de préserver l'intégrité du matériel génétique cellulaire (chromosomes). Ils servent de coiffe protectrice empêchant ainsi la perte de séquences nucléotidiques. Les télomères sont essentiels pour empêcher la formation d'agrégats

télomériques et de chromosomes dicentriques. Leur rôle a été décrit dans la reconnaissance des chromosomes homologues et dans la transcription (39,46).

3.9.4 La longueur des télomères

La longueur moyenne de l'ADN télomérique varie de quelques dizaines de paires de bases à plusieurs kilobases selon l'espèce. Ils jouent un rôle très important dans la prolifération et dans l'immortalité cellulaire. Des modifications au sein de leur structure entraîneraient soit une sénescence ou une mort cellulaire par apoptose, ce qui empêcherait la prolifération des cellules cancéreuses.

La longueur moyenne des télomères des cellules humaines est inversement proportionnelle de l'âge de l'individu. En effet, les télomères ont été désignés comme l'horloge biologique cellulaire ou de l'individu parce qu'ils diminuent de taille avec les divisions cellulaires ou l'âge de l'individu (47).

La télomérase est une ribonucléoprotéine qui ajoute des séquences télomériques à l'extension 3' des télomères (48,49). L'activation de la télomérase dans les cellules souches et les cellules cancéreuses compense la perte des télomères (50,51). Toutefois, l'activité de la télomérase est insuffisante pour éviter une certaine perte de séquences télomériques dans les cellules souches (52,53). Dans les cellules tumorales, la télomérase maintient l'homéostasie de la longueur des télomères afin d'assurer la capacité proliférative des cellules cancéreuses.

3.9.5 Organisation nucléaire des télomères

L'étude de l'organisation nucléaire tridimensionnelle des télomères ou la télométrie cellulaire permet de comprendre la dynamique d'organisation des télomères au cours des différentes phases du cycle cellulaire. Dans les cellules humaines normales, les télomères ne se chevauchent pas et leur distribution nucléaire dépend du cycle cellulaire. Ils occupent l'ensemble du volume nucléaire durant les phases G0/G1 et S, alors qu'ils sont alignés au centre du noyau et forment le disque télomérique lors de la phase G2 (54,55). La fonction

de ce disque serait d'assurer une meilleure séparation des chromosomes lors de la mitose (56). Les télomères peuvent aussi occuper des micro territoires, tout au long du cycle cellulaire, en formant des groupes de télomères qui ont une localisation périphérique. Cette organisation de voisinage des télomères permettrait des recombinaisons chromosomiques et une participation à l'organisation nucléaire des chromosomes (figure 6) (57).

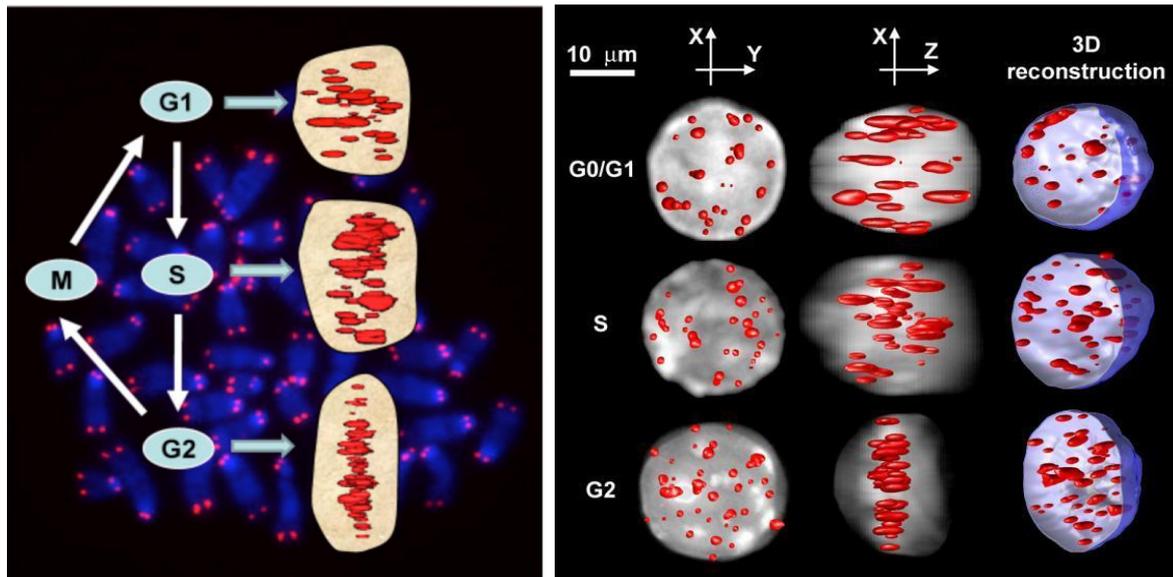


Figure 6: Organisation 3D nucléaire des télomères (55)

(A) L'organisation tri dimensionnelle des télomères dans le noyau des cellules de mammifères dépend du cycle cellulaire. (B) Trois distributions typiques des télomères. Un noyau est vu dans Phase G0 / G1 (en haut), phase S (au milieu) et phase G2 (en bas). Tout le noyau est montré en vue de dessus (plan xy), en vue de côté (plan xz) et sous forme de visualisation 3D (xyz). On voit bien que les télomères en phases G0/G1 et S sont répartis dans tout le noyau, tandis que ceux de la ligne de phase G2 dans un disque.

3.9.6 Télomères dans le cancer

Les différentes fonctions des télomères dans la stabilité et l'intégrité du génome leur confèrent une place primordiale dans le processus néoplasique. Ils sont d'ailleurs considérés comme l'élément déterminant dans le processus d'immortalisation des cellules cancéreuses et pourraient même être un des éléments déclencheurs de certaines tumeurs. La longueur des télomères et les mécanismes de leur maintien sont des caractéristiques des télomères qui sont

les plus étudiées dans le cancer. Leur organisation nucléaire fait également l'objet d'une certaine attention. La plupart des cellules cancéreuses humaines ont des télomères courts à cause de leur grande capacité proliférative. D'ailleurs, la longueur des télomères a été corrélée au facteur de pronostic dans plusieurs tumeurs (58,59)

En outre, plusieurs études ont montré une altération de l'organisation nucléaire des télomères dans le cancer. Cette altération se manifeste par un changement du nombre de copies télomériques, un raccourcissement des télomères, un nombre élevé d'agrégats télomériques, des volumes nucléaires importants, et un changement de la distribution et position des télomères dans le noyau. Cette altération a été associée à une progression ou des stades très agressifs de plusieurs cancers tels que les glioblastomes, la leucémie myéloïde chronique, le cancer de la prostate, la maladie de Hodgkin, le myélome multiple, le cancer de l'œsophage, le cancer de la thyroïde, le syndrome myélodysplasique, le cancer de la vessie etc. (9,54,55).

3.9.7 Dysfonctionnement des télomères dans le cancer du sein

Comme dans la plupart des cancers, le raccourcissement des télomères est une des caractéristiques du cancer du sein. Des télomères courts ont été associés à une tumeur de haut grade, des métastases ganglionnaires, des aneuploïdie, une instabilité génomique et à une survie réduite à 5 ans sans cancer du sein (60)

Une comparaison de la longueur des télomères entre différents sous-types de cancer du sein a montré que les sous-types TNBC, luminal B et ERBB2 présentent une proportion plus élevée de télomères courts qu'une forme moins agressive de cancer du sein, le sous-type luminal A (61). Des études ont aussi retrouvé que des télomères individuels peuvent être affectés dans le cancer du sein. Par exemple, les télomères courts retrouvés sur les bras chromosomiques 9p des lymphocytes sont caractéristiques chez certaines des patientes souffrant du cancer du sein (Zheng et al., 2009). Une autre étude a retrouvé dans les cellules tumorales du cancer du sein

que les télomères sur les bras chromosomiques 17q se raccourcissaient plus rapidement que la longueur moyenne des télomères (62).

3.10 Télégénomique cellulaire

Le dysfonctionnement des télomères est l'une des principales causes d'instabilité génomique. L'utilisation des sondes à ADN et de la microscopie à fluorescence dans la recherche clinique et fondamentale ont considérablement fait avancer nos connaissances sur l'organisation du génome. L'avènement de ces nouvelles techniques a permis de visualiser toutes les régions nucléaires avec une grande spécificité et de permettre l'étude de l'organisation nucléaire tridimensionnelle (3D) des télomères (59). La télégénomique cellulaire est l'étude de l'organisation nucléaire ou tridimensionnelle des télomères. La télégénomique cellulaire est basée sur la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH)-3D des télomères, la microscopie 3D et l'utilisation d'un logiciel (TeloViewTM) qui analyse les paramètres définissant cette organisation nucléaire des télomères.

3.10.1 Définition

L'une des principales composantes de la télégénomique cellulaire est l'hybridation *in situ* en fluorescence qui est une technique cytogénétique moléculaire. Elle permet l'hybridation d'une séquence d'acide nucléique couplée à un fluorochrome (sonde) à un brin complémentaire de la séquence cible qui peut être structurellement identifiée sur un chromosome ou dans un noyau interphasique. La FISH quantitative (Q-FISH) télomérique permet l'acquisition d'informations quantitatives sur des séquences télomériques grâce aux valeurs cumulatives d'intensité de fluorescence de chaque sonde hybridée sur les télomères. La Q-FISH permet la mesure de la longueur des télomères dans une cellule ou sur un bras chromosomique (63). Lorsque cette Q-FISH est appliquée sur des cellules interphasiques dont les noyaux gardent leur structure 3D, on l'appelle la technique 3D-Q-FISH (55,64).

3.10.2 But

La télométrie cellulaire permet de déterminer le nombre des télomères, de quantifier l'intensité des signaux télomériques qui correspondent à la longueur des télomères, de préciser la position et la distribution des télomères dans une structure nucléaire en 3D, d'identifier des agrégats télomériques, et enfin d'évaluer le volume nucléaire (65–67).

3.10.3 Principe

La technique 3D-Q-FISH est basée sur les propriétés de dissociation et de réassociation spécifiques aux acides nucléiques. L'ADN télomérique est dénaturé et hybridé à une sonde télomérique, couplée à un fluorochrome. L'hybridation se fait grâce à la complémentarité entre les bases nucléotidiques de la sonde et celles de la séquence télomérique. Les hybrides infidèles et les molécules de sonde non hybridées sont éliminés par des lavages successifs. Il est impératif de faire des prétraitements cellulaires avant, pendant et après la technique FISH pour que la structure 3D nucléaire soit préservée. Ensuite, l'acquisition des images nucléaires et télomériques se fait par la microscopie en 3D. Enfin, l'analyse des images nucléaires et télomériques est faite avec l'aide du logiciel, TeloView™ (TeloGenomics, Canada), ou tout autre logiciel permettant de mesurer les paramètres de la télométrie cellulaire (65–67).

3.10.4 Avantages et limites

La télométrie cellulaire permet de recueillir des informations sur la longueur des télomères, l'état d'aneuploïdie de la cellule, le grade nucléaire et l'indice de prolifération des cellules cancéreuses, inflammatoires ou normales. L'acquisition simultanée de ces informations génomiques dans une même cellule permet de mieux définir les caractéristiques des cellules surtout celles qui sont cancéreuses. En connaissant davantage ces caractéristiques cellulaires, on pourra ainsi mieux les évaluer en tant que biomarqueurs dans le cancer (5,59). Additionnellement, on peut évaluer l'hétérogénéité cellulaire permettant ainsi de déterminer la clonalité des cellules cancéreuses et la dynamique évolutive de l'instabilité génomique. Un autre avantage de la télométrie cellulaire est la possibilité d'acquérir des données

moléculaires qui peuvent être superposables et complémentaires à celles de la pathologie classique.

L'accessibilité à la technologie est la limite majeure de la télégénomique cellulaire. En effet, le microscope à 3D avec différents modules de traitement d'image est dispendieux, et le logiciel TeloViewTM est sous la licence d'une compagnie de biotechnologie (TeloGenomics, Canada) dont l'autorisation est nécessaire pour son utilisation.

3.10.5 Étapes

3.10.5.1 Échantillons

La télégénomique cellulaire peut être effectuée sur des préparations cytologiques et histologiques provenant de tout échantillon d'origine humaine. Les cellules interphasiques obtenues à partir d'une fixation au méthanol et à l'acide acétique ou d'une coupe tissulaire (tissus frais ou enrobé à la paraffine) sont les préparations les plus utilisées (5,6,59).

3.10.5.2 FISH 3D télomères

➤ Prétraitement de l'échantillon

Cette étape permet une meilleure pénétration de la sonde dans le noyau tout en gardant la structure 3D nucléaire. Une digestion protéolytique à base de pepsine est nécessaire pour mieux perméabiliser la cellule, le noyau, et la chromatine afin qu'ils soient plus accessibles à la sonde télomérique. Cependant, il faut s'assurer que le prétraitement soit le moins agressif que possible pour mieux préserver la structure 3D des noyaux. Le traitement au glycérol et à l'azote liquide permettent de maintenir la structure nucléaire surtout si on utilise des préparations cytologiques (6,59).

➤ Sondes télomériques

Les sondes télomériques sont généralement constituées d'acide nucléique peptidique (PNA) et constituent un des éléments essentiels de la technique 3D- QFISH. Les sondes PNA sont des molécules qui ressemblent aux molécules d'ADN et la différence entre les deux est la

présence d'une chaîne pseudo peptidique qui remplace le squelette phosphatidique. Par conséquent, les bases puriques et pyrimidiques sont fixées sur cette chaîne pseudo peptidique par des liaisons carboxyliques (68). Les sondes PNA sont en général des oligonucléotides monocaténares de petite taille. La charge neutre des sondes PNA leur procure une température de dissociation (T_m) très élevée d'où leur spécificité plus grande que les sondes à ADN. Par conséquent, le ratio signal/bruit de fond est très élevé pour les sondes PNA, ce qui est une caractéristique très importante dans la quantification précise de la fluorescence parce que le bruit de fond important peut entraîner un biais dans la quantification de la fluorescence (59). Un autre avantage de l'utilisation des sondes PNA est leur stabilité rendant ainsi l'hybridation encore plus efficace et stable. La petite taille des sondes PNA leur assure une meilleure pénétration cellulaire et nucléaire sans recourir aux prétraitements cellulaires agressifs qui peuvent changer la structure 3D des noyaux. En outre, la petite taille des sondes PNA assure une hybridation plus rapide en réduisant ainsi la possibilité de diminution de l'intensité de fluorescence au cours de l'expérimentation. Les sondes PNA télomériques sont des oligonucléotides monocaténares composés de 18 nucléotides, et la séquence télomérique (5'-CCCTAA-3')₃ associées au fluorochrome cyanine-3 (Cy3) est généralement la sonde télomérique la plus utilisée pour la technique 3D-QFISH (68–70).

➤ **Dénaturation de la séquence télomérique**

Cette étape consiste à séparer par la chaleur les deux brins d'ADN télomérique par rupture des liaisons hydrogènes. Une température à 80°C est généralement utilisée et elle a l'avantage d'être au-dessus de la température de fusion de l'ADN et empêche aussi la formation de structure secondaire de l'ADN télomérique monocaténaire (ADN dénaturé) et de la sonde télomérique (59).

➤ **Hybridation**

À cette étape, la sonde télomérique s'hybride à son brin complémentaire des télomères. Cette étape est faite dans un environnement humide à 30°C et l'abri de la lumière. Elle dure 2 heures et ce temps d'hybridation est plus court que celui utilisé pour la technique FISH standard (these Sam).

➤ **Lavage**

Cette étape consiste à éliminer les hybrides infidèles et les sondes non hybridées pour réduire autant que possible le bruit de fond. Elle se fait avec une solution saline associée à un détergent. La température de lavage avec la saline est au-dessus de la température d'hybridation et en deçà de la température de dénaturation. En plus, une solution de formamide tamponnée avec une solution saline est utilisée pour réduire la présence d'hybrides infidèles (66).

➤ **Contre-coloration**

La solution de contre-coloration est composée du DAPI (4', 6-diamidino-2-phénylindole) associée à une solution qui permet de diminuer la vitesse de photoblanchissement du fluorochrome Cy3 (71). La contre coloration permet de colorer le noyau en bleu, et ainsi on peut visualiser simultanément le noyau (coloration bleue) et les télomères associés au fluorochrome Cy3 (coloration rouge).

➤ **Stockage**

Les lames hybridées peuvent être stockées dans un congélateur à -20°C jusqu'au moment de l'observation microscopique. La fluorescence est plus stable à une température basse. Aussi, les lames doivent être aussi protégées de la lumière. Une température élevée et la lumière diminuent l'intensité du signal de la sonde (59,71).

Rétrouvez ci-dessous un schéma illustratif de la technique FISH.

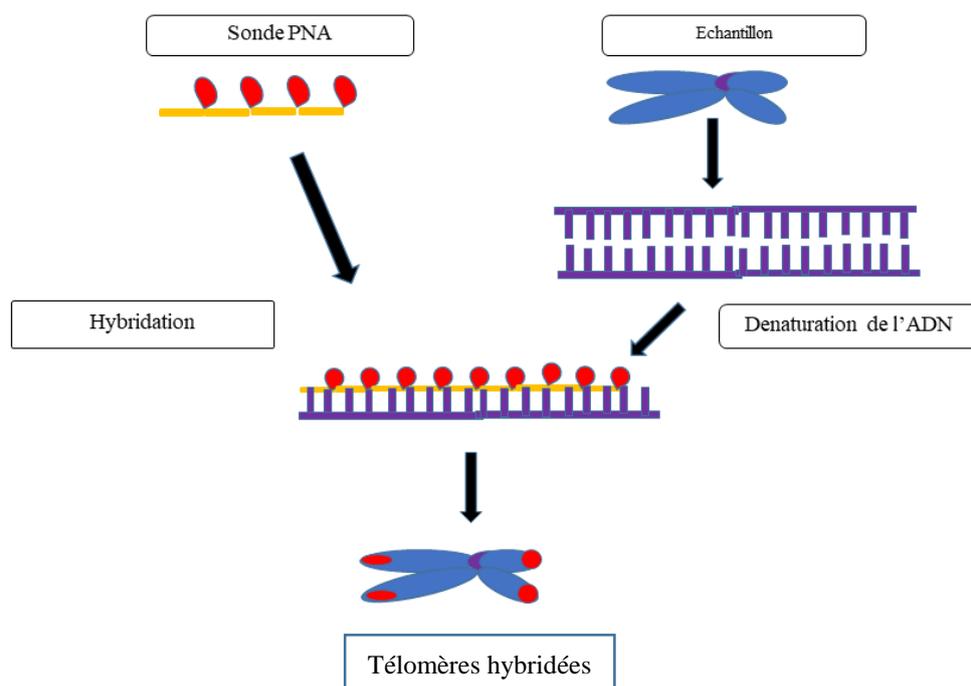


Figure 7 : Image d'illustration de la technique FISH télomérique

3.10.5.3 Microscopie en 3D

Le système d'acquisition d'image est basé sur l'utilisation d'un microscope à épifluorescence muni d'une caméra avec une bonne résolution, de filtres à fluorescence qui permettent la visualisation du Cy3 et du DAPI et d'un système de prise d'images en 3D. Ce système permet ainsi d'acquérir différents plans focaux d'une même image. La distance entre deux plans focaux successifs est de 200 nm et 81 plans focaux pour les noyaux entiers et 61 pour les coupes tissulaires de 5µm d'épaisseur (Figure 8). Il est aussi essentiel que le système microscopique ait la capacité d'acquérir des images automatiquement selon le plan xy pour permettre l'acquisition de plusieurs champs d'images. Le système d'imagerie automatisé *Imager* de Zeiss associé au logiciel Zenpro (Zeiss, Canada) permet l'acquisition automatique des images cellulaires selon les axes xyz. L'objectif optique 63x ou 40x avec une grande ouverture numérique est utilisé pour l'acquisition des images nucléaires ou télomériques. Il est à noter que l'objectif 10x ou 20x peut être utilisé pour créer une image d'aperçus qui permet de

sélectionner les cellules cibles tout en permettant d'avoir une vue d'ensemble du contexte cellulaire ou tissulaire de l'échantillon.

Après la capture des images, on sélectionne les noyaux cibles (noyaux des cellules cancéreuses ou de cellules normales) à partir des images capturées par l'objectif 63x ou 40x. Ensuite, ces images sélectionnées sont traitées d'abord avec le module de déconvolution de ZenPro, un algorithme mathématique, qui réduit la quantité de contamination de la lumière provenant en dehors du foyer d'acquisition. En effet, la prise successive de plans focaux d'une image entraîne une déformation de l'image et crée un flou autour d'elle. Ce flou conduit à une perte d'information lors de la quantification des pixels provenant de l'image. Pour remédier à cette déformation et restaurer l'image d'origine, l'algorithme itératif de déconvolution est utilisé (72).

L'image déconvolue est aussi traitée en la transformant en image TIFF de 16 bits sans compression. Ainsi chaque image nucléaire en 3D génère 122 images TIFF (61 images pour le noyau et 61 images pour les télomères) correspondant aux 61 plans focaux pris pour les deux canaux de filtres (bleu pour le noyau et rouge pour les télomères) (figure 8).

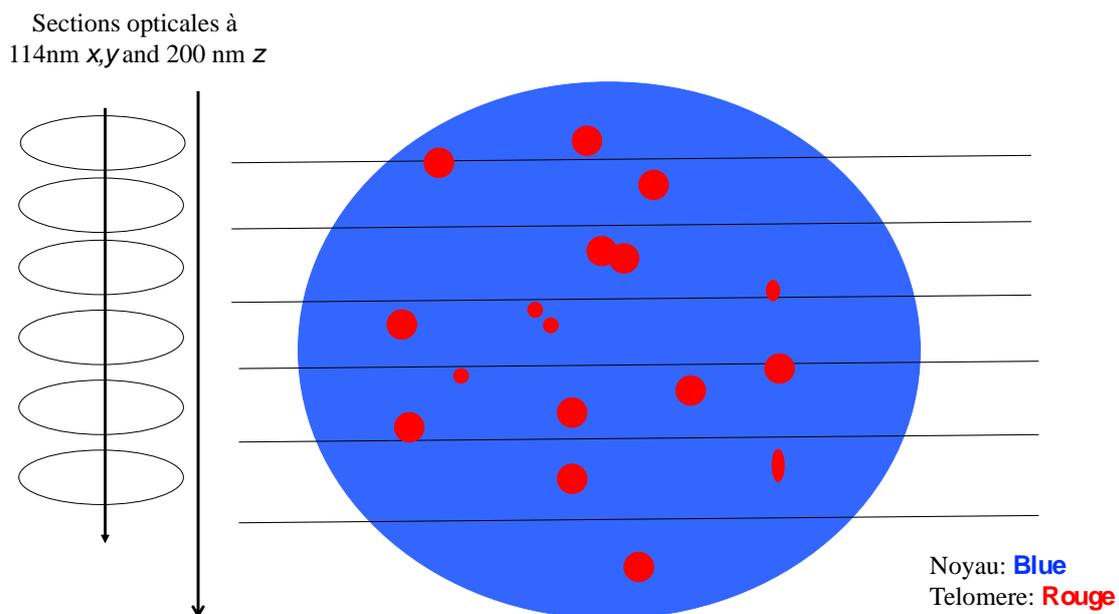


Figure 8: Représentation schématique du principe de la microscopie 3D des télomères

3.10.5.4 Analyse d'image

Les images TIFF sont téléversées dans le logiciel TeloView™ qui est un logiciel conçu pour analyser de l'organisation nucléaire des télomères. La description mathématique de l'algorithme TeloView™ a été faite dans d'autres études (54,55). Brièvement, TeloView™ permet de détecter des signaux télomériques en fonction de l'intensité des signaux émise par la fluorescence Cy3, ensuite ces signaux sont localisés en fonction du plan de l'image et du plan défini par la structure 3D nucléaire (l'intensité de signaux émis par le DAPI). Ainsi la position des télomères et leur distribution sont déterminées par rapport au centre nucléaire. Subséquemment, TeloView™ mesure le nombre des télomères, l'intensité des télomères, le nombre d'agrégats télomériques, le volume nucléaire, indice de distribution télomérique, et la position des télomères en fonction du centre nucléaire.

3.10.5 Paramètres de la télégénomique cellulaire

La télégénomique cellulaire est définie par six paramètres qui sont mesurés par TeloView™

3.10.5.1 Le nombre de signaux télomériques (NST)

La cellule humaine étant diploïde, elle contient 46 chromosomes et chaque chromosome a deux extrémités (télomères). Donc au total une cellule normale diploïde comporte 92 télomères. Dans les cellules cancéreuses, il existe un nombre anormal de chromosomes appelé aneuploïdie qui peut conduire à une variation du nombre total de télomères dans la cellule. Il est à noter que le nombre des télomères détectés par TeloView™ varie en fonction de plusieurs facteurs tels que le type de cellule, l'état de densité de la chromatine ou la taille des télomères. Par exemple, les sondes télomériques s'hybrident plus facilement sur des télomères des cellules ayant une chromatine plus relâche que celles présentant une chromatine plus dense. Par conséquent, on peut retrouver des cellules normales ayant en moyenne 40-50 télomères (73,74). Dans les cellules cancéreuses, le nombre des télomères est un indicateur de l'état d'aneuploïdie

et une augmentation considérable du nombre des télomères a été associée à des polyploïdies et un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (5,59).

3.10.5.2 L'intensité des signaux télomères (IST)

Il existe une relation entre la longueur des télomères et l'intensité de la fluorescence du signal télomérique. La sonde PNA utilisée est constituée de 18 oligonucléotides - 3X(CCCAAT)-, et à son extrémité 3' est fixée une molécule de fluorochrome Cy3. Chaque séquence de sonde télomérique hybridée correspond à une molécule de Cy3 qui émet une intensité donnée de fluorescence. Après hybridation de la sonde avec l'ADN télomérique, plus les télomères sont longs plus l'intensité du signal est forte, d'où la proportionnalité entre la taille et l'intensité du signal. L'intensité télomérique est plus élevée dans les cellules normales que dans les cellules cancéreuses à cause du raccourcissement accru des télomères dans les cellules néoplasiques (63). La prolifération cellulaire élevée des cellules tumorales entraîne un raccourcissement des télomères et peut induire l'instabilité génomique (59).

3.10.5.3 Le nombre d'agrégats télomériques (NAT)

Les agrégats télomériques représentent des signaux de fusions télomériques ou lorsque les télomères sont très proches rendant leur individualisation difficile par un microscope ayant une résolution limite de 200 nm (55,75). Le nombre d'agrégats télomériques est plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans celles normales. Un nombre plus élevé d'AT est un indicateur d'instabilité génomique car les AT ont été rapportés comme étant un des premiers signes de l'instabilité génomique à travers des cycles de cassure-pont fusion chromosomique (56). Le nombre d'agrégats télomériques est plus élevé dans les cellules cancéreuses que dans celles normales et leur nombre est indépendant de la longueur des télomères et de l'activité de la télomérase (76). Le nombre élevé d'agrégats télomériques a été associé comme un facteur de mauvais pronostic dans plusieurs pathologies cancéreuses (6,7).

3.10.5.4 Indice de distribution nucléaire des télomères (IDNT)

Les télomères occupent tout le territoire nucléaire (figure 9) et la forme qu'ils prennent au cours de cette occupation définit la distribution nucléaire télomérique. Cette distribution des télomères est cycle cellulaire dépendant dans les cellules normales et a été associée une prolifération accrue de certaines cellules cancéreuses (54,77).

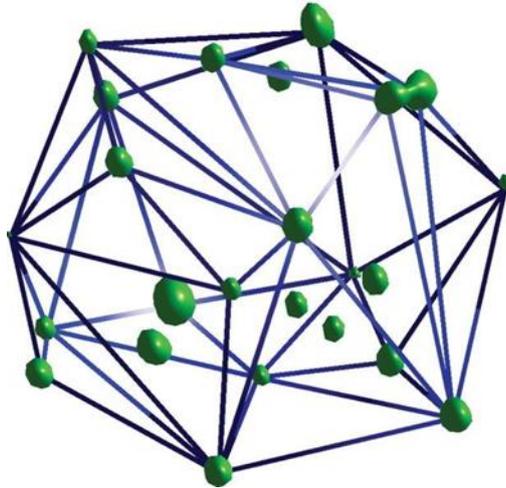


Figure 9: Illustration du territoire télomériques

La distribution des télomères dans le volume du noyau est trouvée en ajustant un ensemble convexe de polygones qui contient tous les télomères. Ce volume ressemble généralement à une sphère ou à un disque et peut être décrit comme un ellipsoïde (55).

3.10.5.5 La position des télomères / distance télomérique normalisée (DTN)

La position absolue des télomères est déterminée par rapport au centre ou de la périphérie (bordure) nucléaire. En pratique, on utilise plus la position relative qui le rapport entre la position absolue et le volume nucléaire. L'utilisation de la position relative est souvent plus précise que celle absolue parce la taille du noyau peut influencer sur la distance qui sépare un télomère du centre nucléaire. Dans une cellule normale, la distance moyenne des télomères par rapport au centre du noyau est en général similaire entre les cellules d'un même type histologique. Par contre, la distance moyenne des télomères des cellules provenant d'une même tumeur peut être différente d'un groupe de cellules à un autre (74,75). Certaines études

suggèrent que le positionnement des télomères est l'un des facteurs déterminants du territoire chromosomique, dont la perturbation peut affecter l'expression génique, générer des anomalies chromosomiques perturber la fonction cellulaire (59).

3.10.5.6 Le volume nucléaire (VN)

Le volume nucléaire est l'ensemble des voxels que constituent l'image nucléaire et son unité est le mm^3 . L'unité représentative d'une image en 3D est le voxel alors qu'elle est le pixel pour celle en 2D. Par exemple, le pixel d'une image capturée par le microscope utilisé dans cette étude génère un pixel avec un axe $X=114 \text{ nm}$ et un axe $Y=114 \text{ nm}$. La superposition de 2 pixels donne un voxel qui prendra en compte un troisième paramètre qui est la hauteur ou la distance qui sépare les 2 pixels le $Z = 200 \text{ nm}$. Ainsi le volume d'un voxel un $X \times Y \times Z$ ($114 \text{ nm} \times 114 \text{ nm} \times 200 \text{ nm}$).

L'augmentation du volume nucléaire au cours de l'oncogenèse est associée à l'instabilité génomique, au remodelage de la chromatine, à un grade nucléaire élevé, et à un mauvais pronostic dans plusieurs cancers (75,77).

La figure 10 représente les 6 paramètres de l'organisation nucléaire des télomères.

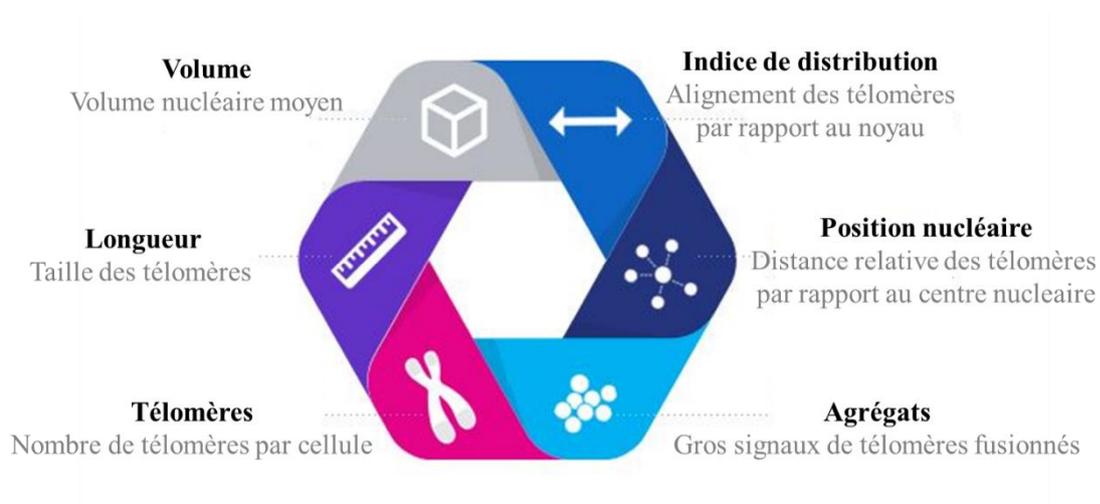


Figure 10: Paramètres de l'organisation nucléaire des télomères

<https://www.telodx.com/technology/teloview/> (70)

4. METHODOLOGIE

Le but de cette étude est de développer une méthodologie qui permettra d'étudier l'hétérogénéité tumorale et l'instabilité génomique dans le cancer du sein.

4.1. Cadre et lieu d'étude

Le recrutement des échantillons et les examens histopathologiques, immunohistochimique, et FISH-HER2 ont été effectués au sein du service de pathologie de l'hôpital Saint Sacrement de Québec, (Québec, Canada). L'étude de la télégénomique cellulaire s'est déroulée dans le laboratoire de Neurosciences de la Faculté de Médecine et d'Odontostomatologie (Université des Sciences, Techniques et Technologiques de Bamako).

4.2 Type et période et durée étude

Il s'agissait d'une étude descriptive et rétro prospective. Le recrutement et les examens histopathologiques, immunohistochimiques, et FISH-HER2 ont été réalisés entre 2014 et 2015. L'étude télégénomique s'est déroulée de Novembre 2020 à Mai 2022 soit une période de 18 mois.

4.3 Population d'étude

4.3.1 Critères d'inclusion

Nous avons inclus dans cette étude les patientes présentant un diagnostic HER2 équivoque à la FISH soit sur la biopsie ou l'exérèse chirurgicale (mastectomie). Le diagnostic HER2 équivoque par FISH devait être confirmé sur au moins un des blocs tissulaires de la patiente et selon les critères de « American College of Pathology » (CAP) et de « American Society of Clinical Oncology (ASCO) » qui étaient en vigueur en 2015 (78).

4.3.2 Critères de non inclusion :

Étaient exclues de l'étude, les patientes qui n'avaient pas assez de matériel pathologique restant pour réaliser la technique 3D-QISH. Étant donné que l'approche méthodologique utilisée pour effectuer les travaux présentés dans cette thèse est une première et qu'elle est

chronophage dans son exécution, nous avons aléatoirement choisi les échantillons de 5 patientes parmi les 114 qui répondaient aux critères d'inclusion et de non inclusion.

4.4 Collecte des données

4.4.1 Données pathologiques

Les données pathologiques des patientes provenaient des différents rapports pathologiques : macroscopie, microscopie, immunohistochimie, FISH et autres. Les lames colorées à l'hématoxyline et l'éosine ont été scannées à 10x par ZenPro 2 au laboratoire de Neurosciences de la FMOS.

4.4.2 Données télégénomiques

4.4.2.1 Traitement des tissus

Les sections de tissus ont été fixées par le formaldéhyde et enrobées dans la paraffine suivant les protocoles en vigueur à l'hôpital Saint Sacrement du Québec, Canada. Une coupe de tissu tumoral de 5 µm a été réalisée sur chaque lame, et cinq coupes en séries ont été faites pour chaque patiente. Les lames ont été gardées à 20-25°C jusqu'à la réalisation de la technique 3D-FISH.

4.4.2.2 Protocole de la technique 3D-FISH télomère

Nous avons suivi le protocole suivant pour réaliser la technique 3D-FISH télomère. Ce protocole a été mis au point dans le cadre de cette thèse. À notre connaissance et selon la littérature, cette étude est une des premières à faire la technique 3D-FISH sur des coupes tissulaires du cancer du sein enrobées dans la paraffine. Pour la mise au point, nous nous sommes référés sur le protocole de 3D-FISH développé pour coupes de tissus dans le lymphome de Hodgkin (6). Les échantillons utilisés dans cette étude présentaient des similarités avec ceux de notre étude car ils étaient aussi enrobés dans la paraffine.

4.4.2.3 Réactifs nécessaires

- Sonde PNA télomère du Kit/Cy3 (Agilent, Canada)

- Solution de prétraitement 2000X (Agilent, Canada) conserver à 4°C
- Solution d'antigène retrieval 10X (Agilent, Canada) conserver à 4°C
- Solution de TBS 1X (un sachet de poudre dans 1 ml d'eau distillée) conserver à température ambiante
- Solution de Formamide pure (Sigma Aldreich, Angleterre) à 20-25°C
- Rinse solution 50 X (Agilent, Canada) conserver à -4°C
- Wash solution 50 X (Agilent, Canada) conserver à -4°C
- Xylène (VWR Chemicals, Angleterre) conserver à température ambiante
- Éthanol (100%) conserver à température ambiante
- Acide chlorhydrique (HCl) concentré (12N) : conserver à température ambiante
- Eau distillée, conserver à température ambiante
- Solution de montage : DAPI avec du Vectashield (Vectolabs, Canada)

4.4.2.4 Préparation des solutions

- **150 mL de Solution d'antigène retrieval 1X**
 - 15 mL d'antigène retrieval 10X
 - 135 mL d'eau distillée
- **150 ml d'éthanol 100%**
 - 150 ml d'éthanol pris dans la solution de stock
- **150 ml d'éthanol 85%**
 - 127.5 ml d'éthanol 100%
 - 22.5 ml d'eau distillée
- **150 ml d'éthanol 70%**
 - 105 ml d'éthanol 100%
 - 45 ml d'eau distillée
- **150 mL de HCl 0.2N**

- 6.3 mL de HCl 12N
- 143,7 mL d'eau distillée
- **100 mL de solution saline tamponnée au Tris (TBS) 10X**
 - 1 sachet de poudre de TBS
 - 100 mL d'eau distillée
- **50 ml de Formamide 70%/TBS 1X**
 - 35 mL de Formamide pure
 - 5 mL de TBS 10X
 - 10 mL d'eau distillée
- **10 mL de solution de prétraitement 1X**
 - 5 µL de solution de prétraitement 2000X
 - 10 mL de la solution 1X Tris (TBS)
- **150 mL de solution Wash 1X**
 - 3 mL de solution Wash 50X
 - 147 mL d'eau distillée
- **150 mL de solution Rinse 1X**
 - 3 mL de solution Rinse 50X
 - 147 mL d'eau distillée

4.4.2.5 Procédure

A- Prétraitement des lames

1. Préchauffer la solution de pré-traitement dans le bain marie à 90°C.
2. Immerger les lames dans le xylène à 20-25°C pendant 10 minutes. Répétez l'opération une fois avec un autre bain de xylène .
3. Déshydrater les lames dans l'éthanol 100% à 20-25°C pendant 5 minutes. Répétez une fois avec un autre bain d'éthanol 100% .

4. Immerger les lames dans l'eau distillée à 20-25°C pendant 2 minutes.
5. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 5 minutes.
6. Immerger les lames dans une solution de HCl 0.2N à 20-25°C pendant 20 minutes.
7. Immerger les lames dans l'eau distillée à 20-25°C pendant 1 minute.
8. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 3 minutes
9. Immerger les lames dans la solution d'antigène retrieval 1X préchauffée à 90°C pendant 30 minutes à 90°C. Ensuite, enlever du bain marie la solution d'antigène retrieval 1X avec les lames et mettre les 20-25°C pendant 20 min.
10. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 3 minutes
11. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 3 minutes
12. Déposer sur les lames 200 µl à 1 ml de la solution de prétraitement à sur la plaque chauffante à 37°C pendant 20 minutes.
13. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 3 minutes.
14. Immerger les lames dans une solution de TBS 1X à 20-25°C pendant 3 minutes.

B- Déshydratation des lames

1. Immerger les lames dans l'éthanol 70% pendant 3 minutes.
2. Immerger les lames dans l'éthanol 90% pendant 3 minutes.
3. Immerger les lames dans l'éthanol 100% pendant 3 minutes.
4. Laisser sécher les lames à l'air pendant 1 minute.

C- Préparation de la sonde

1. Préchauffer la sonde et les lames séparément à 85°C pendant 10 minutes.
2. Centrifuger la sonde au mini centrifugeuse pendant 15 secondes.

D- Dénaturation et hybridation

1. Appliquer 9.5 µl de sonde sur chaque zone d'hybridation et recouvrir d'une lamelle de 22 mm x 22 mm.

2. Placer les lames dans l'hybrideur, Thermobridge™ (Abbott, MA, USA) humidifiée en imbibant deux papiers buvards d'eau et placer les dans la machine.
3. Suivre le programme adéquat : Q-FISH : dénaturer les lames avec la sonde à 85°C pendant 10 minutes et hybrider à 30°C pendant 2 heures.

E- Lavage post-hybridation

2. Immerger les lames dans la solution de lavage post-hybridation solution Rinse à 20-25°C pour desserrer les lamelles. Remuer doucement pour retirer les lamelles.
3. Immerger les lames dans la solution de 70% Formamide/1 X TBS pendant 15 min.
4. Immerger les lames dans une nouvelle solution de 70% Formamide/1 X TBS pendant 15 min.
5. Immerger les lames dans la solution de lavage post-hybridation, solution Rinse, préchauffée à 55°C pendant 5 minutes.
6. Immerger les lames dans la solution de lavage post-hybridation, solution Wash, pendant 5 minutes.
7. Immerger les lames dans la solution de lavage post-hybridation, solution Wash, pendant 5 minutes.

F- Déshydratation des lames

1. Immerger les lames dans l'éthanol 70% pendant 2 minutes.
2. Immerger les lames dans l'éthanol 90% pendant 2 minutes.
3. Immerger les lames dans l'éthanol 100% pendant 2 minutes.
4. Laisser sécher les lames à l'air à l'abri de la lumière.

G- Montage sur lamelles

1. Appliquer la contre-coloration DAPI 20µl et recouvrez les lames de lamelles 24X60 mm.
2. Les lames peuvent être conserver à -20°C.
3. Examiner les lames sous un microscope à fluorescence réglé sur les bons filtres.

4.4.2.6 Microscopie en 3D

Nous avons utilisé le système microscopique Axio Imager 2 de Zeiss, muni du logiciel ZenPro (Zeiss, Canada) et associé à une caméra AxioCam 506 mono (Zeiss, Canada).

Les lames ont été d'abord scannées à l'objectif 10X au DAPI pour créer une image d'aperçus de l'échantillon. À partir de cette image, nous avons sélectionné des régions en fonction de l'architecture tissulaire et morphologique vue l'image H/E du même échantillon. Cette image H/E est superposable à celle DAPI car elles proviennent des coupes consécutives du même échantillon. Les régions présélectionnées couvraient l'entièreté de l'échantillon. Subséquemment, nous avons fait des séries de capture d'image des régions présélectionnées avec un objectif 40X ayant une ouverture numérique de 1.4. Pour chaque image prise à 40X, 61 plans focaux ont été réalisés pour chacun des filtres (le DAPI et le Cy3). Les temps d'exposition étaient de 250 millisecondes pour le Cy3 et variable pour le DAPI. La distance qui séparait deux plans focaux étaient de 200 µm et la distance axiale xy était de 114 µm.

4.4.2.7 Selection des cellules

Pour chaque patient, nous avons choisi 20 à 25 des régions sélectionnées à 40x parmi 60-110 (dépendamment des échantillons). Ces régions ont été sélectionnées avec l'aide d'un pathologiste moléculaire. Elles étaient représentatives sur le plan de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire de l'échantillon. Pour chaque région nous avons sélectionné 15-20 cellules en fonction de la densité cellulaire pour obtenir un total de 420 cellules sélectionnées par échantillon. Les zones pathologiques ont été déterminées en fonction de la ressemblance histologique entre les différentes régions sélectionnées. Toutes les cellules sélectionnées ont été vérifiées par un spécialiste en pathologie moléculaire.

4.4.2.8 Traitement d'images

Les images sélectionnées ont été traitées par le module de déconvolution itérative de ZenPro (Zeiss, Canada). Ensuite, les images déconvolues ont été transformées en images TIFF

de 16 bits sans compression. La transformation des images en TIFF est obligatoire parce que le logiciel TeloView™ ne reconnaît que ce format d'image.

4.4.2.9 Analyse par TeloView™

Les images TIFF ont été téléversées dans le logiciel TeloView™. Parmi les 420 cellules de chaque échantillon, nous en avons choisi 400. Le logiciel TeloView™ permet de mieux apprécier la structure 3D des noyaux, de l'état de la chromatine et de la qualité de l'hybridation. Cette deuxième sélection à partir du logiciel TeloView™ permet d'être plus strict et précis dans la sélection des cellules. Par conséquent, les paramètres de l'organisation nucléaire des télomères ont été générés dans un fichier Excel pour chacune des 400 cellules d'un échantillon donné. Il est important de mentionner que dans les études antérieures sur l'organisation nucléaire des télomères à partir des coupes de tissus, on avait analysé entre 60 et 100 cellules (79,79). Un des objectifs de notre étude est de déterminer l'hétérogénéité cellulaire et l'instabilité génomique dans le cancer du sein. Il était donc essentiel d'inclure le maximum de cellules analysables afin de pouvoir déterminer un seuil minimal de cellules à analyser sur des bases statistiques même si cela a entraîné une augmentation considérable du temps de travail et la durée de cette thèse.

4.4.2.10 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide des logiciels SPSS Statistics 25 (IBM, USA), Excel (Microsoft, USA) et Python (Python Software Foundation, USA).

Pour définir l'index d'hétérogénéité cellulaire d'un échantillon en fonction de l'intensité des télomères et de leur nombre, nous avons utilisé la mesure de similarité en calculant la distance Euclidienne entre les cellules de l'échantillon. Les cellules ont été définies selon deux paramètres de la télégénomique cellulaire : l'intensité des télomères et de leur nombre. Nous avons utilisé la méthodologie qui a été développée dans une étude récente (5).

Nous avons utilisé la moyenne lorsque la distribution était normale et la médiane lorsqu'elle ne l'était pas. Par conséquent, les tests statistiques ont été faits en fonction de cette distribution. Nous avons utilisé **test t** pour la comparaison des moyennes et le test non paramétrique de **Mann -Whitney** pour celle des médianes. Le test a été considéré statistiquement significatif lorsque le $p < 0.05$.

5. RESULTATS

5.1 Age

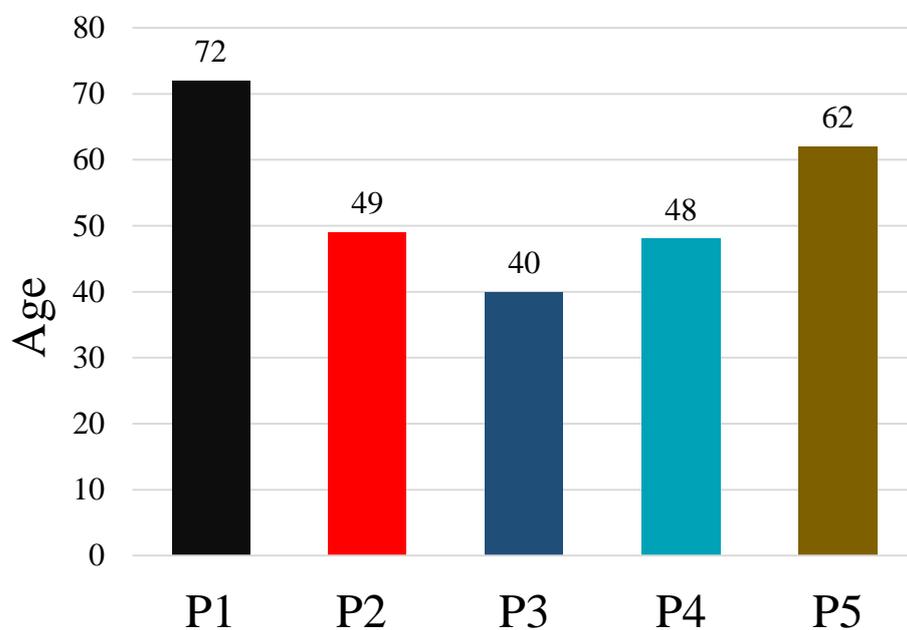


Figure 11: Répartition des patientes selon l'âge en année.

L'âge moyen était de 54,2 ans avec des âges extrêmes de 40 et 72 ans.

5.2 Données pathologiques

5.2.1 Données histologiques

5.2.1.1 Aspects macroscopiques

Tableau III : Caractéristiques macroscopiques des échantillons

Patientes	Échantillons	Taille (cm)	Poids (g)	Ganglions sentinelles
P1	Biopsie	-	-	-
P2	Mastectomie sein droit	ASI :11,5 AT : 9,5 AAP :3,0	177,8	3
P3	Mastectomie sein gauche	ASI : 6 AT : 3 AAP :5.5	36,5	4
P4	Mastectomie du sein gauche (récidive)	ASI :20 AT : 24 AAP :4,5	629,5	-
P5	Mastectomie du sein droit	ASI : 6,5 AT : 5 AAP : 2	44,8	3

ASI : Axe supéro-inferieur

AT : Axe transversal

AAP : Axe antéro-postérieur

Les échantillons provenaient plus souvent d'une mastectomie et pesaient en moyenne 222,15 g. Chez trois des quatre patientes, une résection ganglionnaire a été faite.

5.2.1.2 Aspects microscopiques

Tableau IV : Caractéristiques microscopiques des échantillons

Patientes	Taille (cm)	Type	Grades de Nottingham				Ganglions positifs	Envahissement vasculaire
			T	N	M	GC		
P1	N/A	CCI	3	2	1	II/III	N/A	N/A
P2	2.5	CCI	2/3	2	1	I/II	-	+
	0.7	CCI	1	2	1	I	-	-
P3	2,2	CCI	2	3	2	II/III	+ (1)	-
P4	0,8	CCI	3	2/3	2	II/III	-	-
P5	1.5	CCI	3	2	1	II/III	-	+

- : Absent

+ : Présent

CCI : Carcinome canalaire infiltrant

GC : Grade combiné

T : Grade tubulaire

N: Grade nucléaire

M: Grade mitotique

N/A : Non applicable

La taille moyenne de la tumeur était de 1,75 cm (0,8-2,5 cm), et tous les échantillons étaient du type carcinome canalaire infiltrant. Quatre des cinq échantillons présentaient le grade combiné II/III de Nottingham. Une patiente sur quatre avait un ganglion positif, et l'envahissement vasculaire était présent chez deux patientes.

5.2.2 Données immunohistochimiques

Tableau V: Immunohistochimie des récepteurs d'œstrogène

Patientes	Échantillons	Récepteurs œstrogène	Intensité	Cellules positives
P1	Biopsie	Positif	+++	>90%
	Métastase	Positif	+++	>90%
P2	Biopsie	Positif	+++	>90%
	Mastectomie	Positif	++	>90%
P3	Biopsie	Positif	+++	>90%
P4	Biopsie	Positif	+++	>90%
P5	Biopsie	Positif	+++	>90%

+ : Intensité faible

++ : Intensité moyenne

+++ : Intensité Forte

Plus de 90% des cellules présentaient une positivité forte aux récepteurs d'œstrogène chez l'ensemble des 5 patientes.

Tableau VI: Immunohistochimie des récepteurs de progestérone

Patientes	Échantillons	Récepteurs progesterone	Intensité	Cellules positives
P1	Biopsie	Positif	++	75-90%
	Métastase	Positif	+++	90%
P2	Biopsie	Positif	+	20-30%
	Mastectomie	Positif	+++	90%
P3	Biopsie	Positif	+	1-5%
P4	Biopsie	Négatif	+	<1%
P5	Biopsie	Positif	++	90%

+ : Intensité faible

++ : Intensité moyenne

+++ : Intensité forte

Quatre des cinq patientes présentaient des échantillons positifs aux récepteurs de progestérone avec une intensité et positivité cellulaire variables.

Tableau VII: Immunohistochimie du récepteur d'HER2

Patientes	Échantillons	Cellules positives	Positivité membranaire : complète/incomplète	Scores	Récepteurs d'HER2
P1	NA	NA	NA	NA	NA
P2	Mastectomie	> 10%	+/+	2+	Équivoque
	Mastectomie	>10%	-/+	1+	Négatif
P3	Mastectomie	>10%	+/+	2+	Équivoque
	Ganglion	> 10%	+/-	3+	Positif
P4	Mastectomie	> 10%	+/+	2+	Équivoque
P5	Mastectomie	> 10%	+/+	2+	Équivoque

+ : Présente

- : Absente

Quatre des cinq échantillons ayant été testé au récepteur d'HER2 présentait un résultat équivoque sur au moins un des blocs. Un des blocs de la mastectomie de **P2** était négatif alors que le bloc ganglionnaire de **P3** était positif au récepteur d'HER2.

5.2.3 Données de FISH HER2

Tableau VIII: Caractéristiques du statut d'HER2 à la FISH

Patients	Échantillons	Nombre de cellules	Signaux HER2/cellule	Signaux CEP/cellule	Ratio HER2/CEP17	Résultats
P1	Biopsie	120	4,94	3,28	1,51	Équivoque
	Métastase	45	4,02	2,76	1,46	Équivoque
P2	Biopsie	136	4,1	3,44	1,19	Équivoque
	Mastectomie	63	3,48	2,52	1,38	Négatif
	Mastectomie	60	2,47	1,93	1,28	Négatif
P3	Biopsie	62	3,32	2,84	1,17	Négatif
	Ganglion	120	5,5	3,76	1,46	Équivoque
	Mastectomie	121	4,21	2,86	1,47	Équivoque
P4	Biopsie	60	4,4	3,72	1,18	Équivoque
	Mastectomie	120	6,58	4,3	1,53	Positif
P5	Biopsie	120	3,46	2,8	1,24	Négatif
	Mastectomie	120	5,12	3,52	1,45	Équivoque
	Mastectomie	121	5,01	2,88	1,74	Équivoque

Sur les blocs testés pour chaque échantillon, au moins un d'entre eux présentait un statut équivoque. Le nombre de copies de *HER2* variait de 4,02 à 5,12/ cellule. Nous avons remarqué une discordance du statut de HER2 entre la biopsie et la mastectomie chez l'ensemble des patientes qui avaient bénéficié d'une évaluation des échantillons provenant de leur biopsie ou de leur mastectomie.

Tableau IX: Résultats récapitulatifs du statut final de HER2

Patients	HER2-immuno	HER2-FISH	Statut final HER2
P1	N/A	Équivoque	Équivoque
P2	Équivoque	Négatif	Négatif
P3	Positif	Équivoque	Positif
P4	Équivoque	Positif	Positif
P5	Équivoque	Équivoque	Équivoque

L'analyse des différents blocs de tissus en immunohistochimie et en FISH a permis de catégoriser les échantillons en négatif (**P2**), équivoque (**P1** et **P5**) et positif (**P3** et **P4**).

5.2.4 Données moléculaires

Tableau X: Test Oncotype Dx

Patiente	Risque faible Score : 7% IC :4-10%	Risque intermédiaire score 14% IC :8-20%	Risque élevé/score 31% /IC :24-37%
P2	+	-	-

IC : intervalle de confiance à 95%.

Le test Oncotype DX a été développé pour prédire le bénéfice de la chimiothérapie. Le test Oncotype DX quantifie l'expression de 21 gènes dans des tissus tumoraux fixés et inclus en paraffine, en utilisant une réaction en chaîne par transcription inverse en temps réel. Sur la base des niveaux d'expression des 21 gènes, un score de récurrence est calculé pour chaque échantillon de tumeur (80).

L'échantillon **P2** était le seul à bénéficier du test Oncotype Dx à cause de son changement de statut de HER2 d'équivoque en négatif. La patiente P2 présentait un faible risque (7% 95 IC :4-9%) de rechute sur une période de 10 ans. Par conséquent, la chimiothérapie n'était pas nécessaire dans la prise en charge de la patiente P2.

5.3 Données télégénomiques cellulaires

5.3.1 Images télégénomiques cellulaires

5.3.1.1 Patiente P1

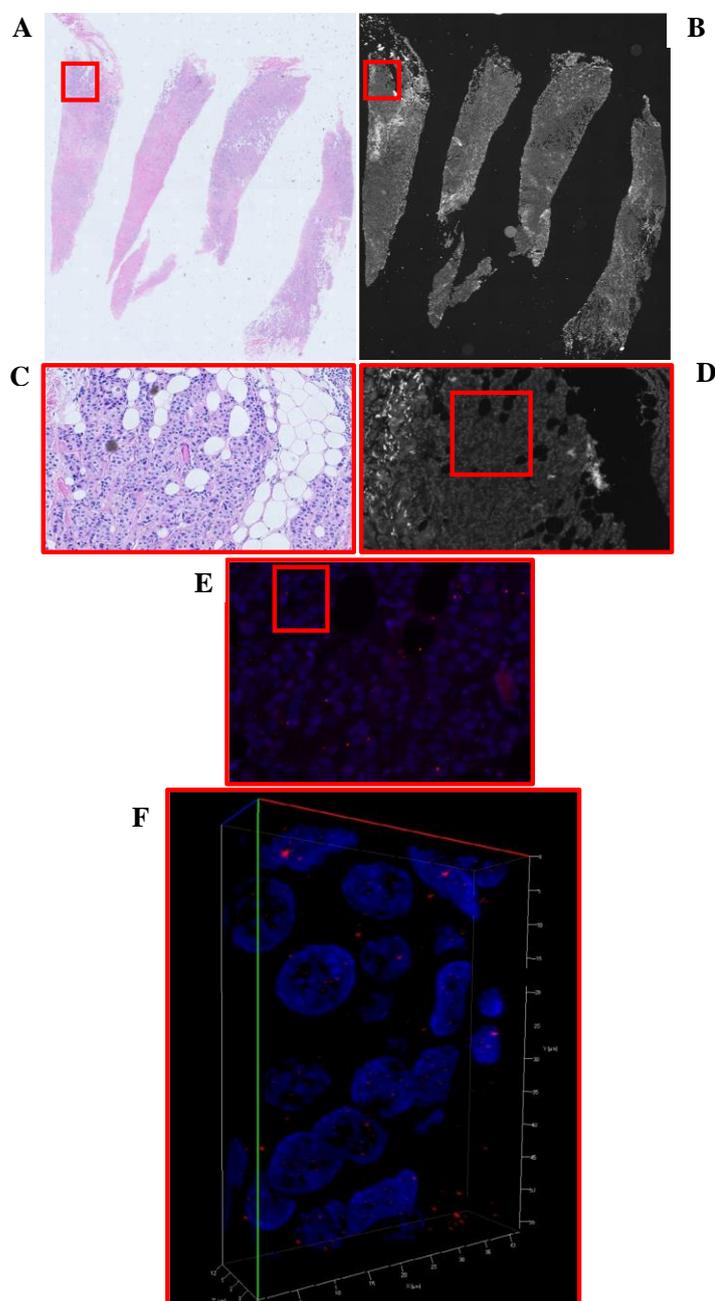


Figure 12: Images télégénomiques cellulaires de **P1**

Les images A (HE) et B (DAPI) correspondent à un aperçu d'ensemble de l'échantillon **P1**. Les images C et D et E sont des grossissements des régions encadrées en A, B et D, respectivement. L'image F est une représentation en 3D de la région encadrée en E ; les noyaux sont en bleu et les télomères en rouges.

5.3.1.2 Patiente P2

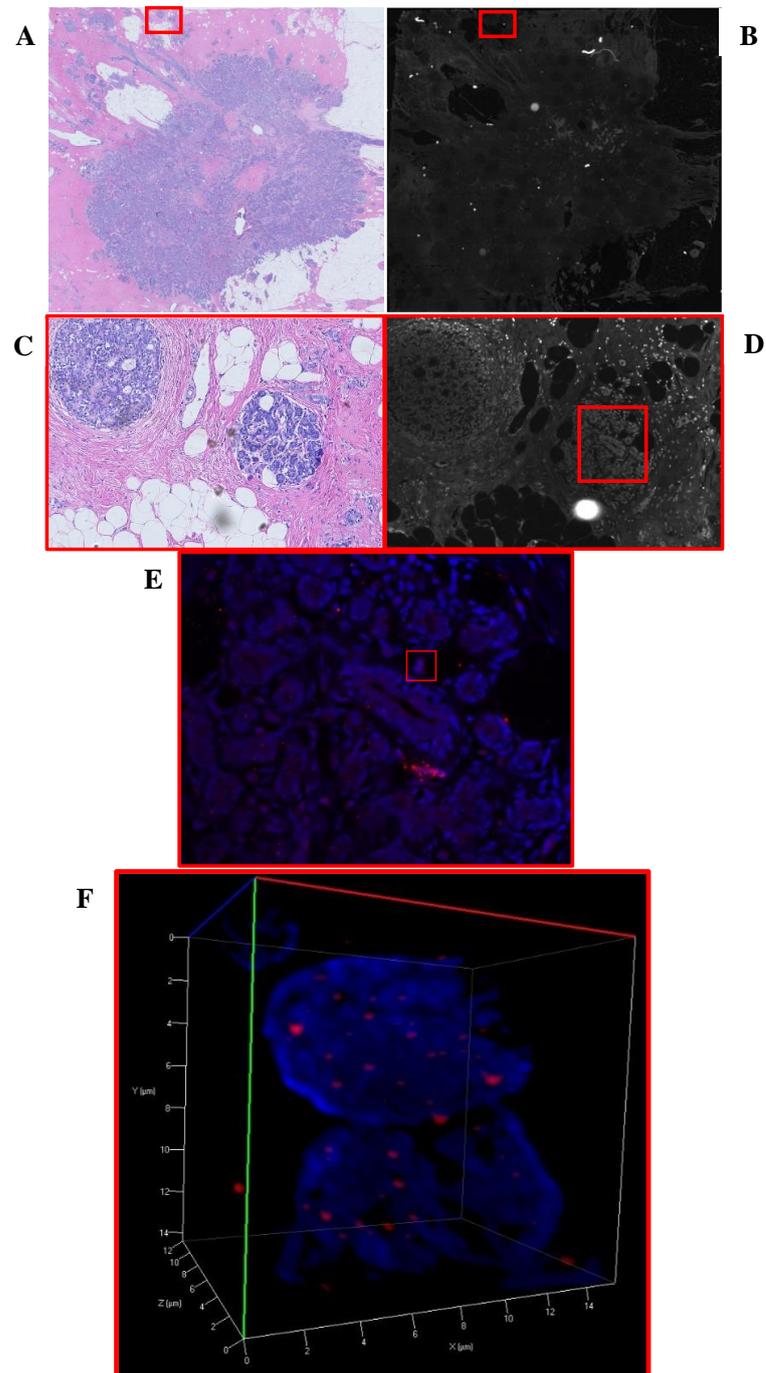


Figure 13: Images télégénomiques cellulaires de **P2**

Les images A (HE) et B (DAPI) correspondent à un aperçu d'ensemble de l'échantillon **P2**. Les images C et D et E sont des grossissements des régions encadrées en A, B et D, respectivement. L'image F est une représentation en 3D de la région encadrée en E ; les noyaux sont en bleu et les télomères en rouges

5.3.1.3 Patiente P3

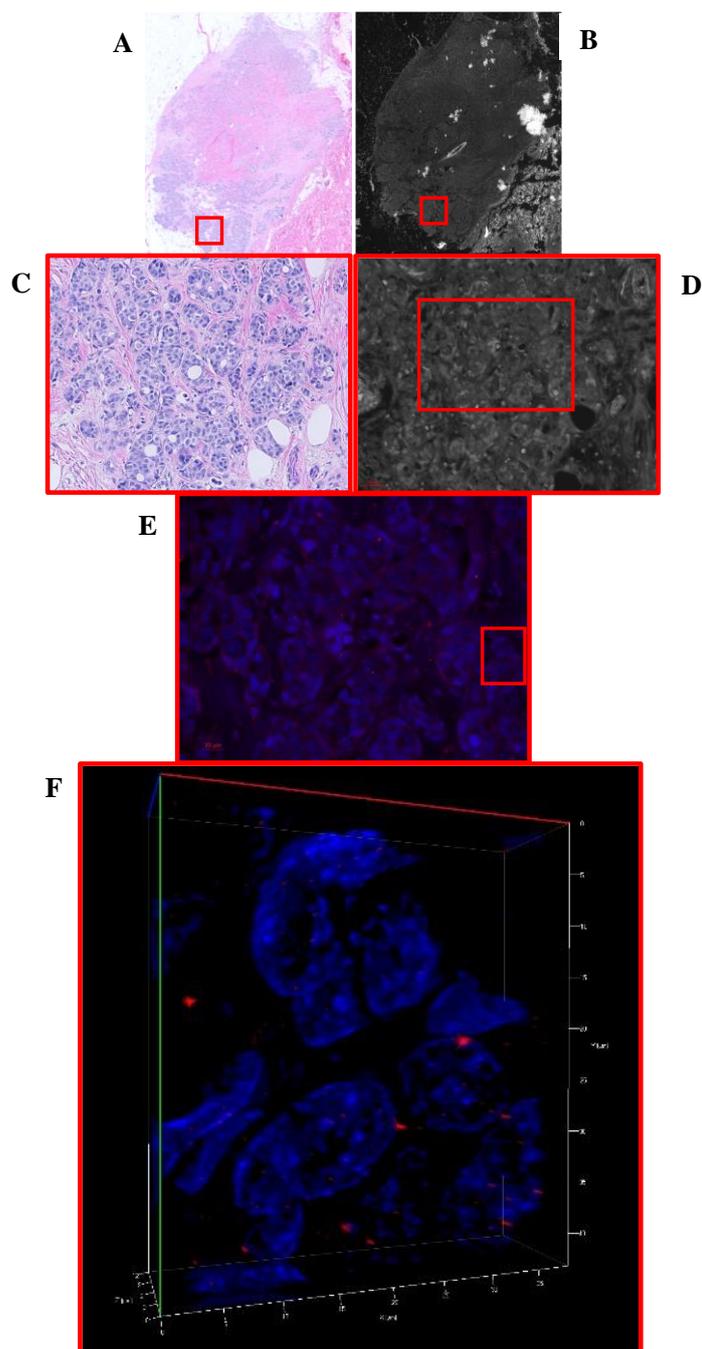


Figure 14: Images télégénomiques cellulaires de **P3**

Les images A (HE) et B (DAPI) correspondent à un aperçu d'ensemble de l'échantillon **P3**. Les images C et D et E sont des grossissements des régions encadrées en A, B et D, respectivement. L'image F est une représentation en 3D de la région encadrée en E ; les noyaux sont en bleu et les télomères en rouges

5.3.1.4 Patiente P4

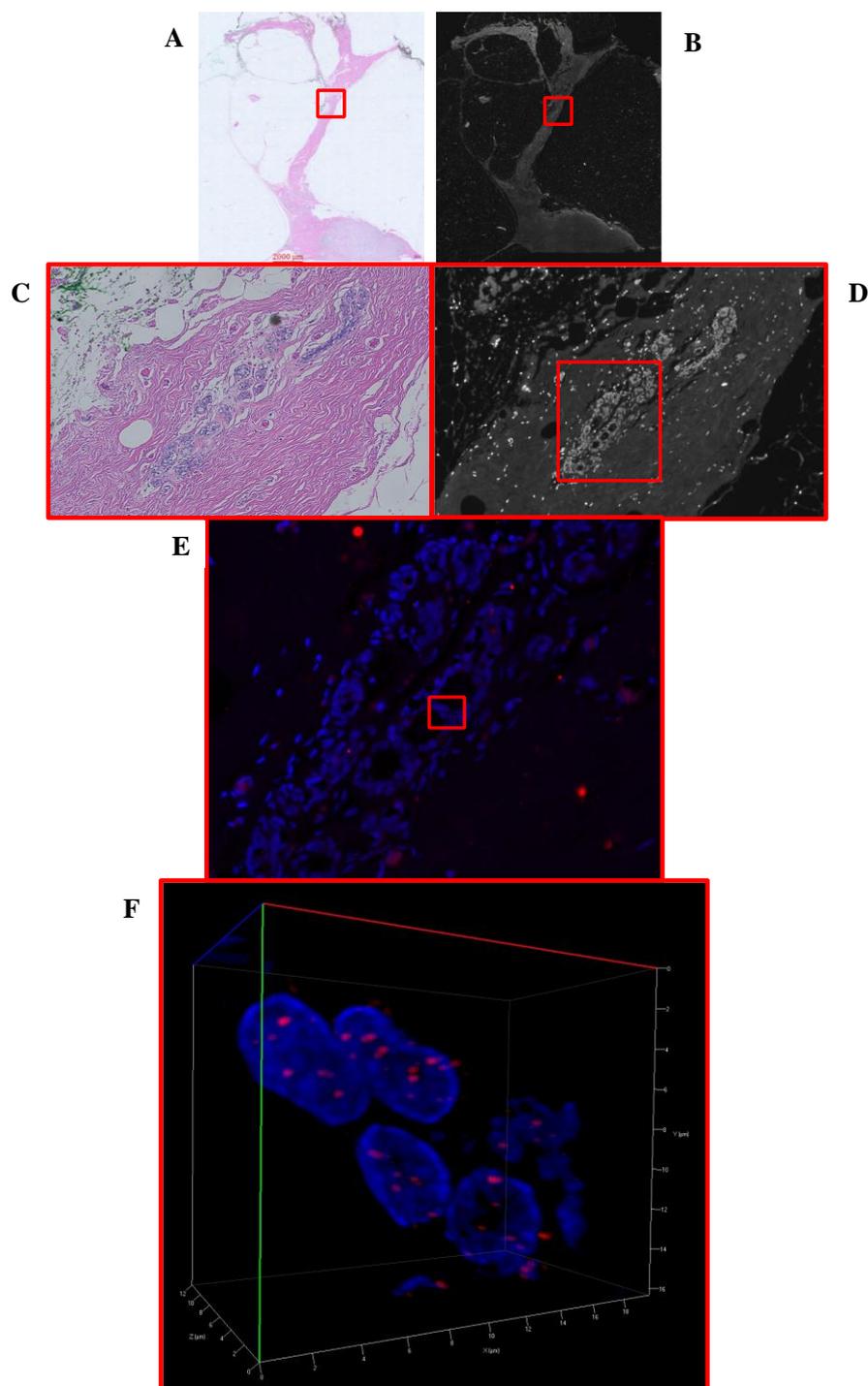


Figure 15: Images télégénomiques cellulaires de **P4**

Les images A (HE) et B (DAPI) correspondent à un aperçu d'ensemble de l'échantillon **P4**. Les images C et D et E sont des grossissements des régions encadrées en A, B et D, respectivement. L'image F est une représentation en 3D de la région encadrée en E ; les noyaux sont en bleu et les télomères en rouges

5.3.1.5 Patiente P5

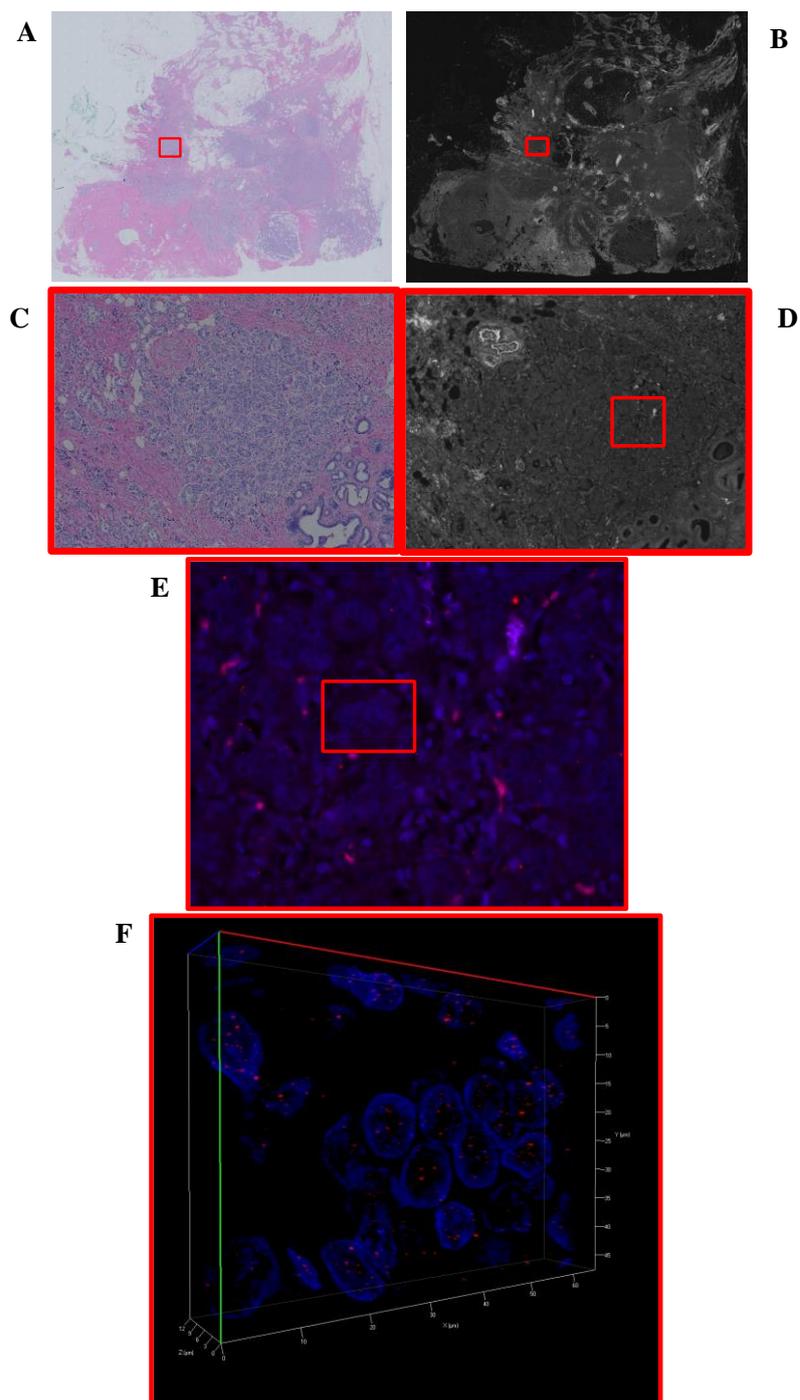


Figure 16: Images télégénomiques cellulaires de **P5**

Les images A (HE) et B (DAPI) correspondent à un aperçu d'ensemble de l'échantillon **P4**. Les images C et D et E sont des grossissements des régions encadrées en A, B et D, respectivement. L'image F est une représentation en 3D de la région encadrée en E ; les noyaux sont en bleu et les télomères en rouges.

5.3.2 Paramètres télégénomiques cellulaires

5.3.2.1 Nombre de signaux télomérique

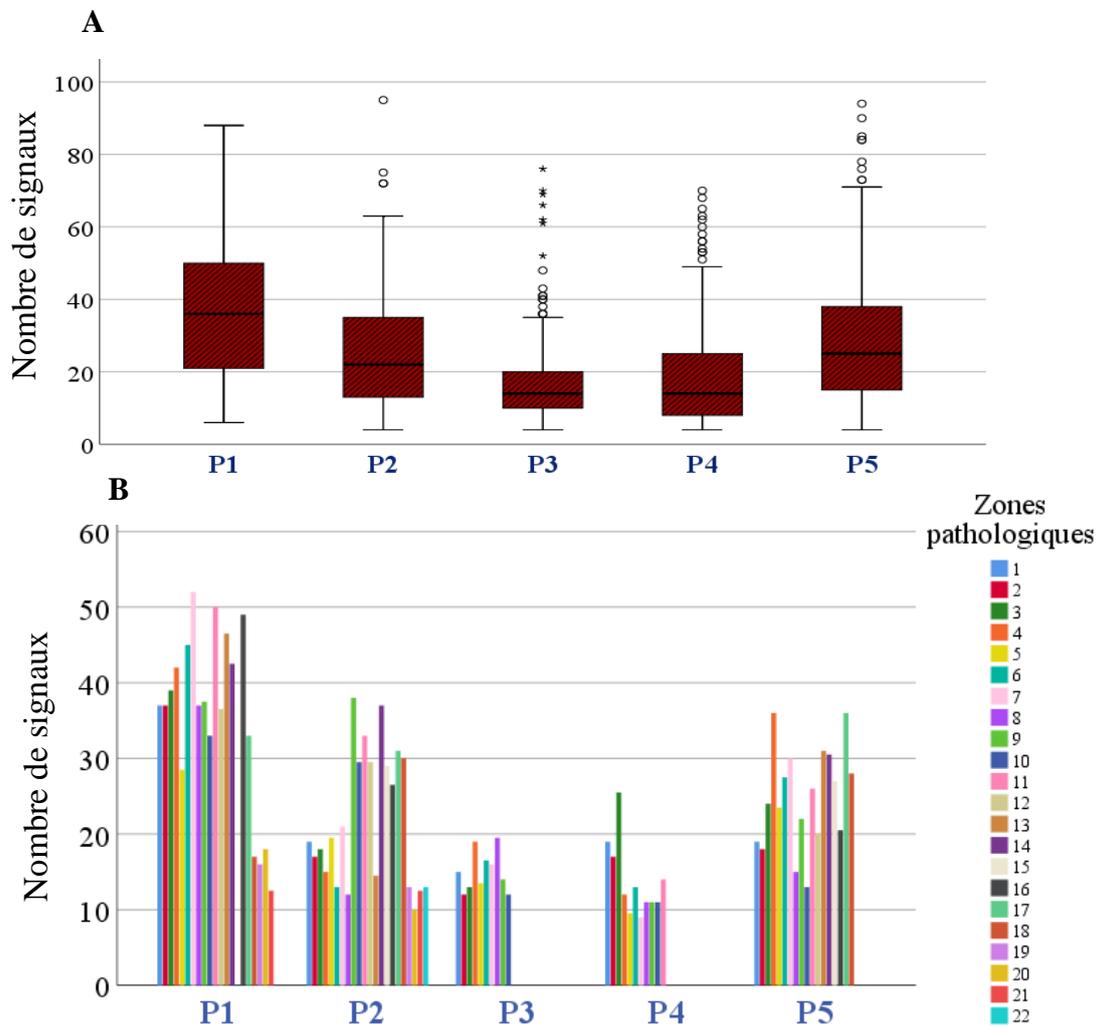


Figure 17: Représentations graphiques du nombre des signaux télomériques

La figure 17.A est la représentation du nombre des signaux télomériques de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme à moustache. La figure 17.B représente la médiane du nombre de signaux télomériques des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton.

Le nombre de signaux télomériques par cellule de la patiente **P1** est plus élevé que ceux des autres patientes. En outre, la médiane du nombre des télomères par cellule est plus de 30 dans 15 des 22 zones pathologiques de **P1**.

5.3.2.2 Intensités des signaux télomériques

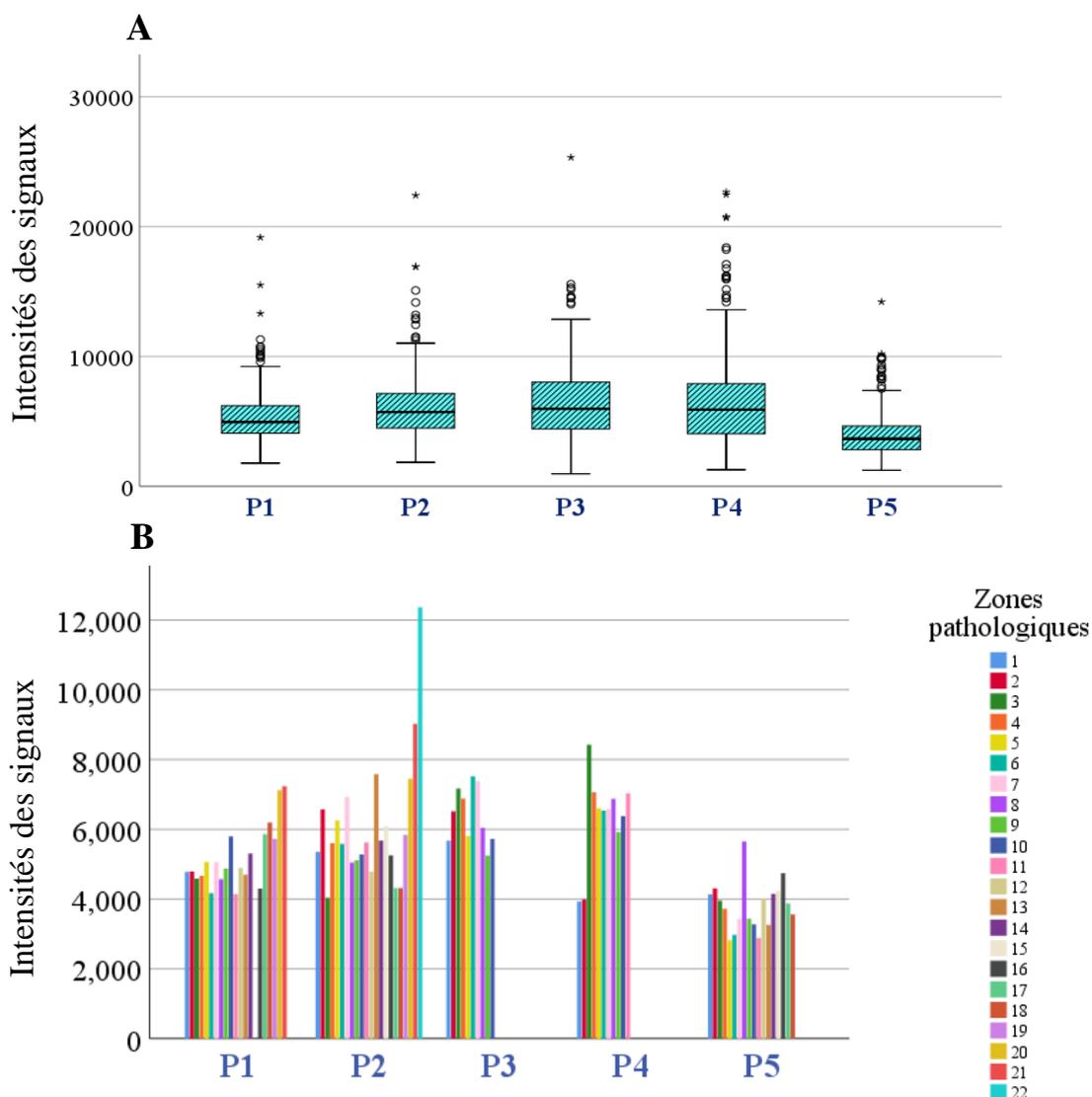


Figure 18: Représentations graphiques des intensités des signaux télomériques

La figure 18.A est la représentation des intensités des signaux télomériques de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme à moustache. La figure 18.B représente la médiane des intensités des signaux télomériques des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton. L'intensité des signaux télomérique est plus élevée dans les cellules de P3 et P4 que dans celles des autres échantillons. Les télomères de P5 sont les télomères les moins intenses et ses zones pathologiques présentent des télomères plus homogènes.

5.3.2.3. Agrégats télomériques

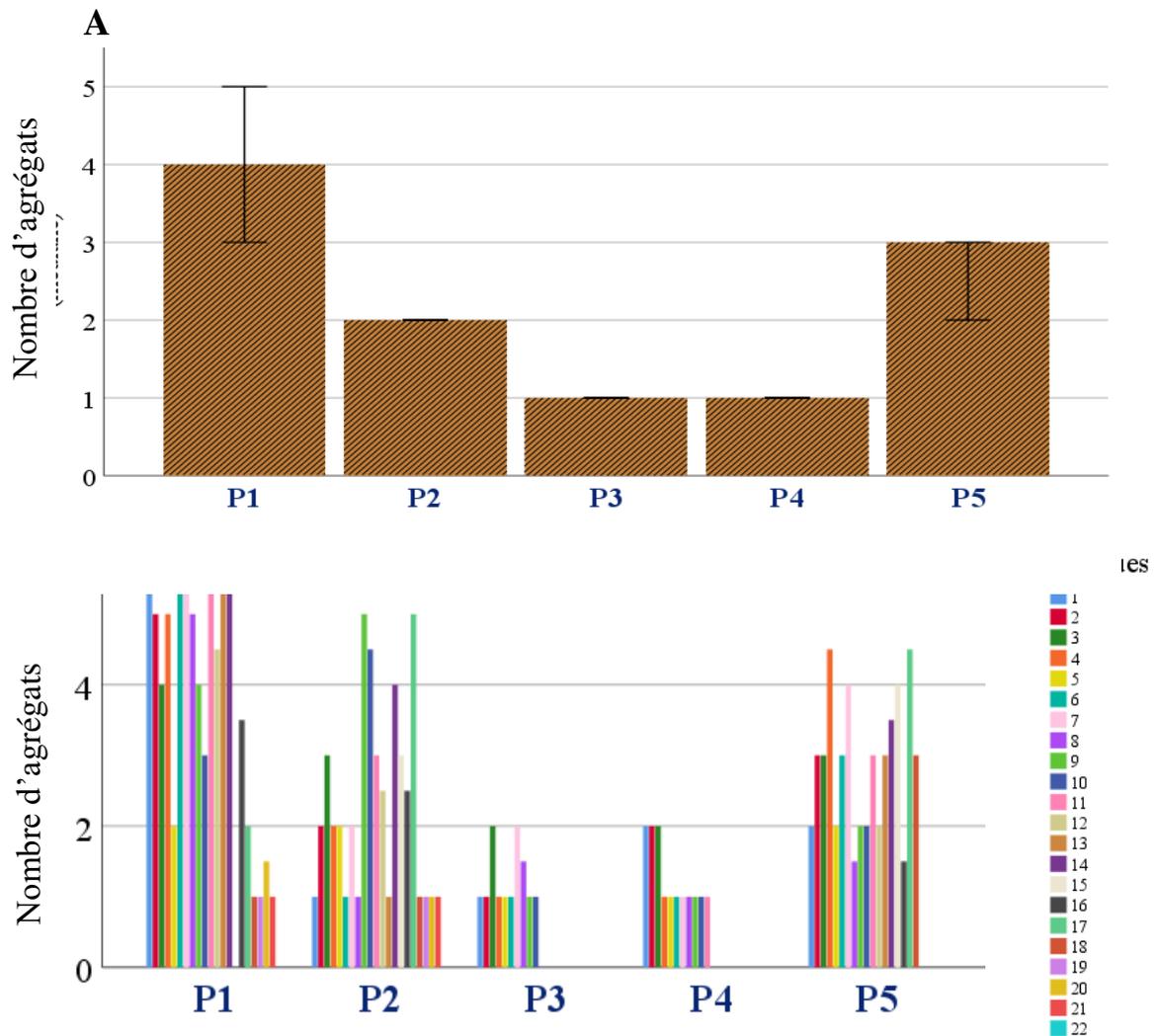


Figure 19: Représentations graphiques du nombre d'agrégats télomériques

La figure **19.A** est la représentation du nombre d'agrégats télomériques de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme à bâton. La figure **19.B** représente la médiane nombre des agrégats télomériques des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton. Les cellules de **P1** présentaient des agrégats télomériques (médiane à 4) plus élevés que ceux des autres échantillons. En plus, certaines zones pathologiques de **P1** avaient 6 ou plus d'agrégats télomériques par cellule alors que les zones pathologiques des autres échantillons n'atteignaient pas ces chiffres.

5.3.2.4. Indice de distribution nucléaire des télomères

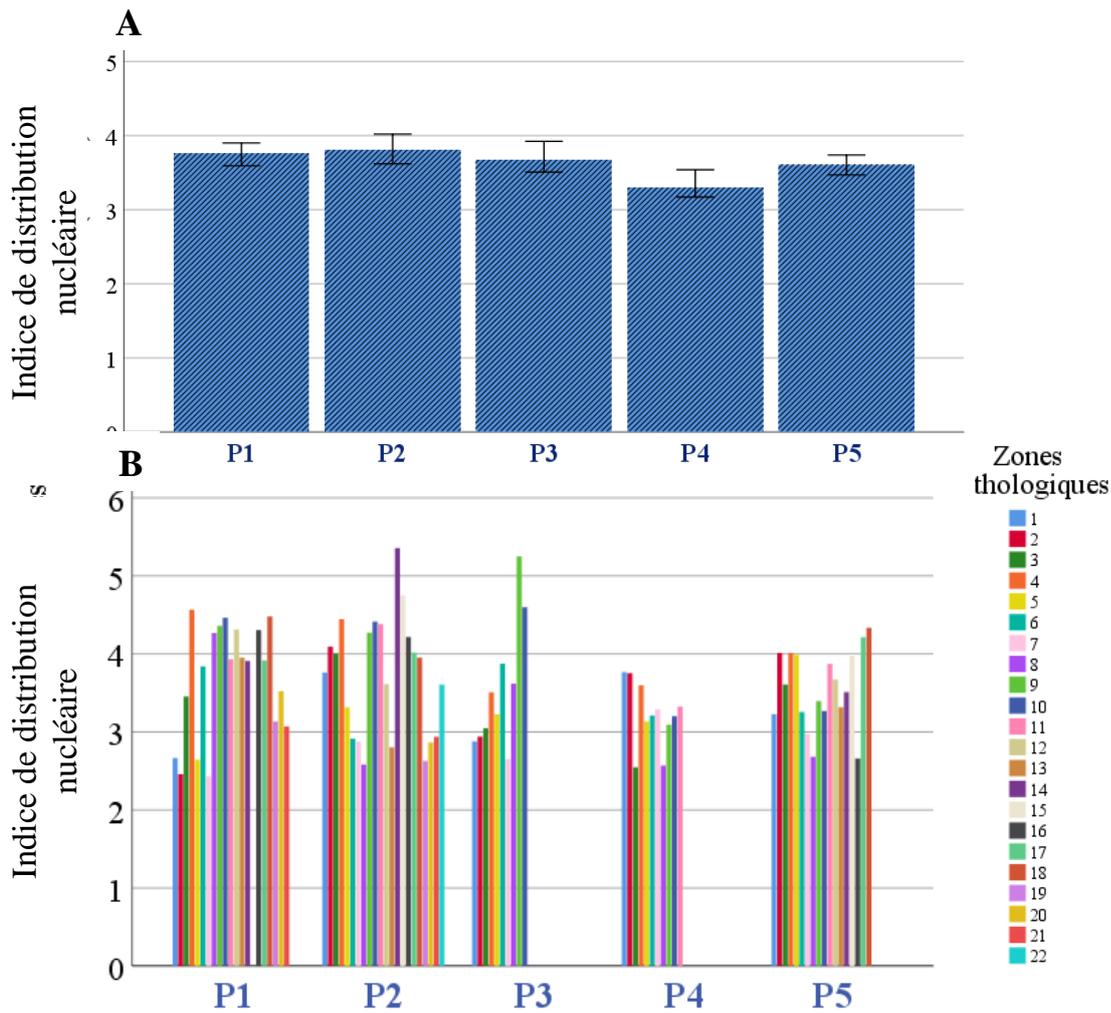


Figure 20: Représentations graphiques de l'indice de distribution nucléaire des télomères

La figure 20.A est la représentation de l'indice de distribution nucléaire des télomères de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme en bâton. La figure 20.B représente la médiane de l'indice de distribution nucléaire des télomères des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton. La distribution nucléaire des télomères de **P1**, **P2**, **P3** et **P5** étaient similaires et légèrement supérieures à celle de **P4**. Par contre, l'indice de distribution des télomères présente une hétérogénéité parmi les zones pathologiques d'un même échantillon.

5.3.2.5. Volume nucléaire

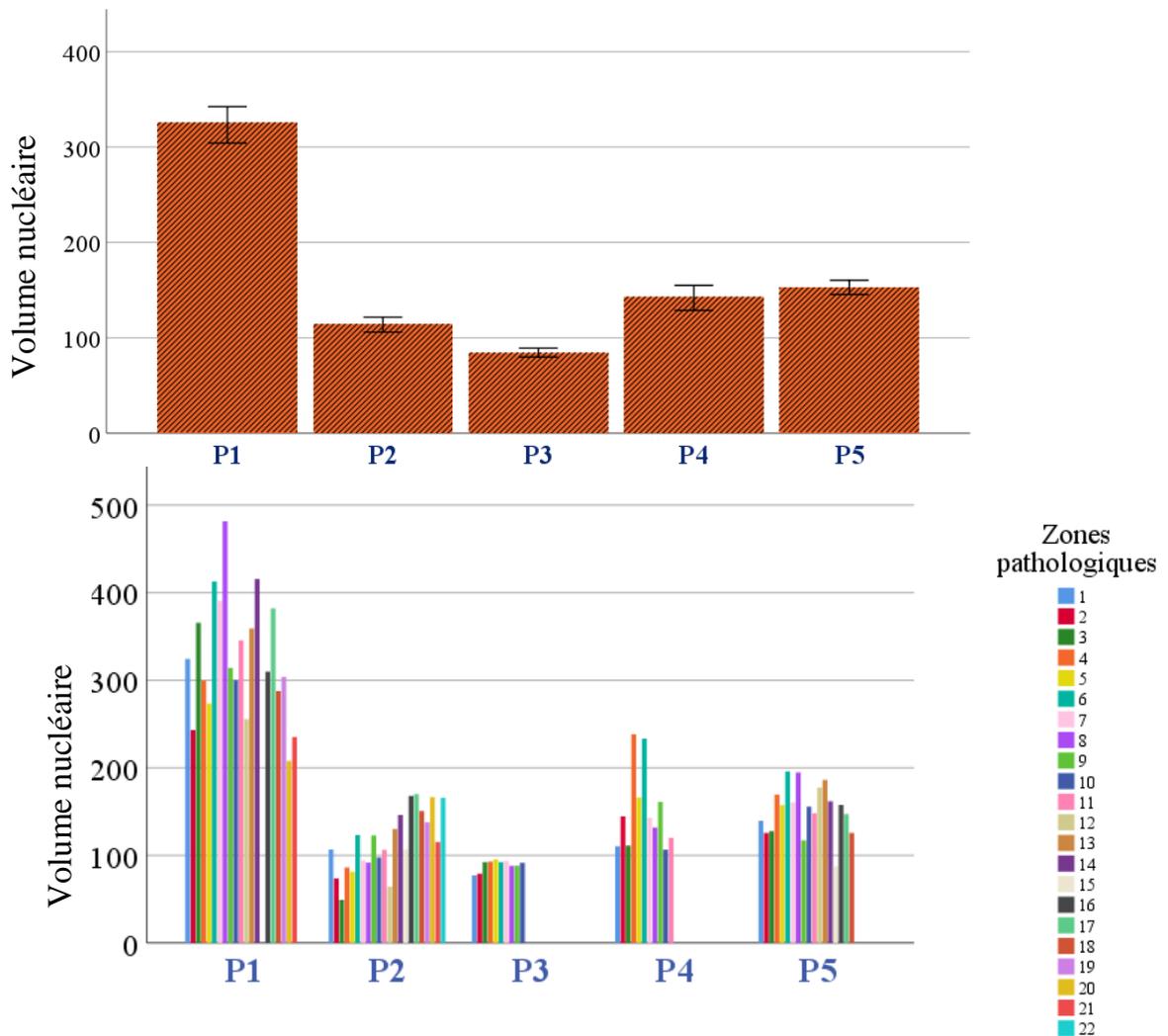


Figure 21: Représentations graphiques du volume nucléaire des télomères

La figure **21.A** est la représentation du volume nucléaire des télomères de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme en bâton. La figure **21.B** représente la médiane du volume nucléaire des télomères des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton. Les cellules de **P1** avaient des noyaux plus volumineux (le double ou plus) que ceux des autres échantillons. L'analyse de la figure **21.B** montrait qu'à l'exception de deux zones pathologiques, toutes les autres zones pathologiques avaient des médianes de volume nucléaire plus élevées que les zones pathologiques de l'ensemble des quatre autres échantillons.

5.3.2.6. Distance télomérique

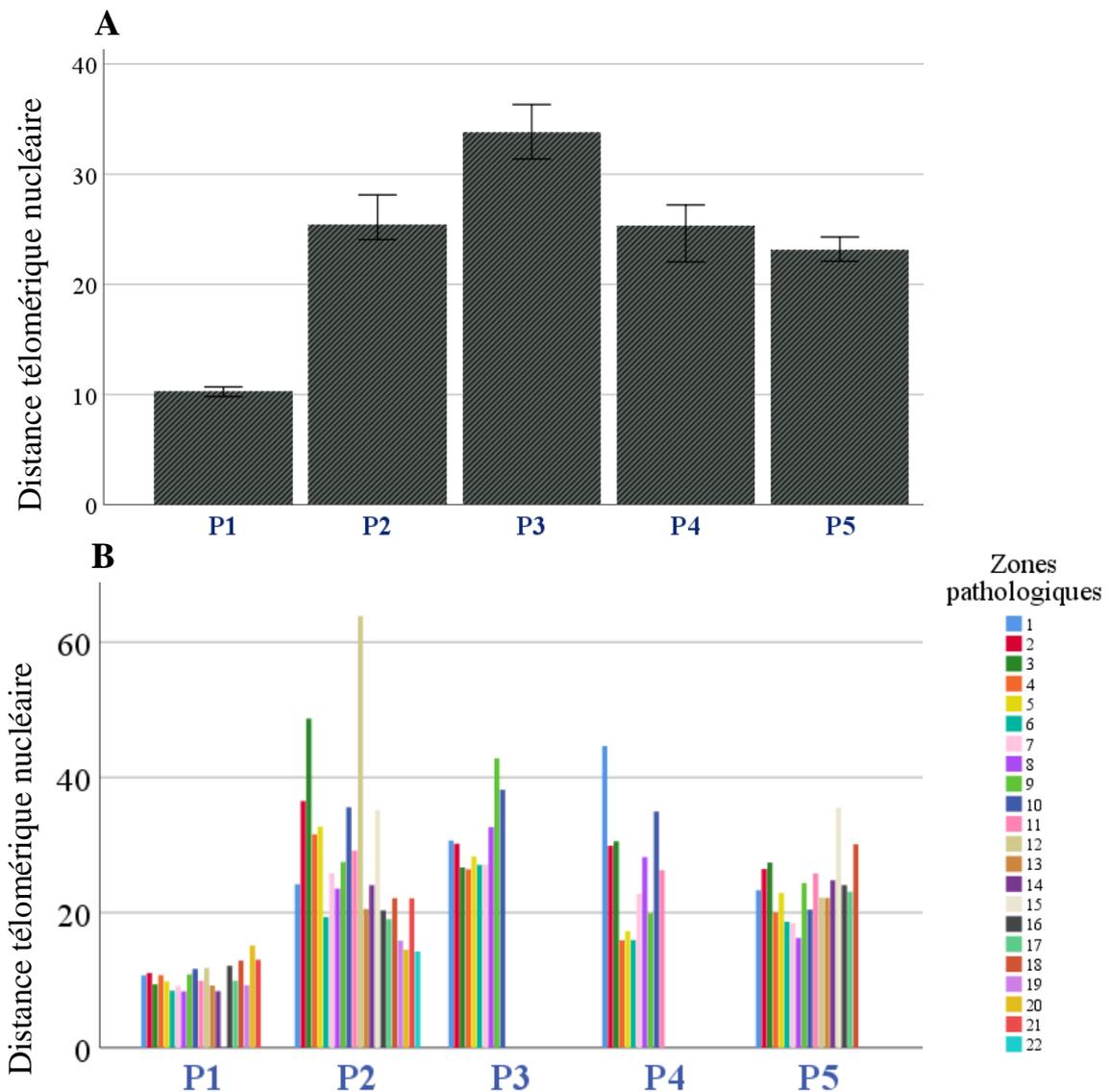


Figure 22: Représentations graphiques de la distance télomérique du centre nucléaire

La figure **22.A** est la représentation de la distance télomérique du centre nucléaire de l'ensemble des cellules analysées en fonction des patientes par un diagramme en bâton. La figure **22.B** représente la médiane de la distance télomérique du centre nucléaire des zones pathologiques en fonction des patientes par un diagramme en bâton. Les télomères des cellules de **P1** avaient une localisation nucléaire plus centrale que celles des autres échantillons, mais ceux de **P3** avaient plus une localisation nucléaire plus périphérique et présentaient des valeurs triplant celles de **P1** (figure 22A). En plus, la médiane de distance nucléaire télomérique de chaque zone pathologique de **P3** était plus élevée que celles des zones pathologiques de **P1**.

5.3.2.7 Hétérogénéité des paramètres de la télégénomique cellulaire

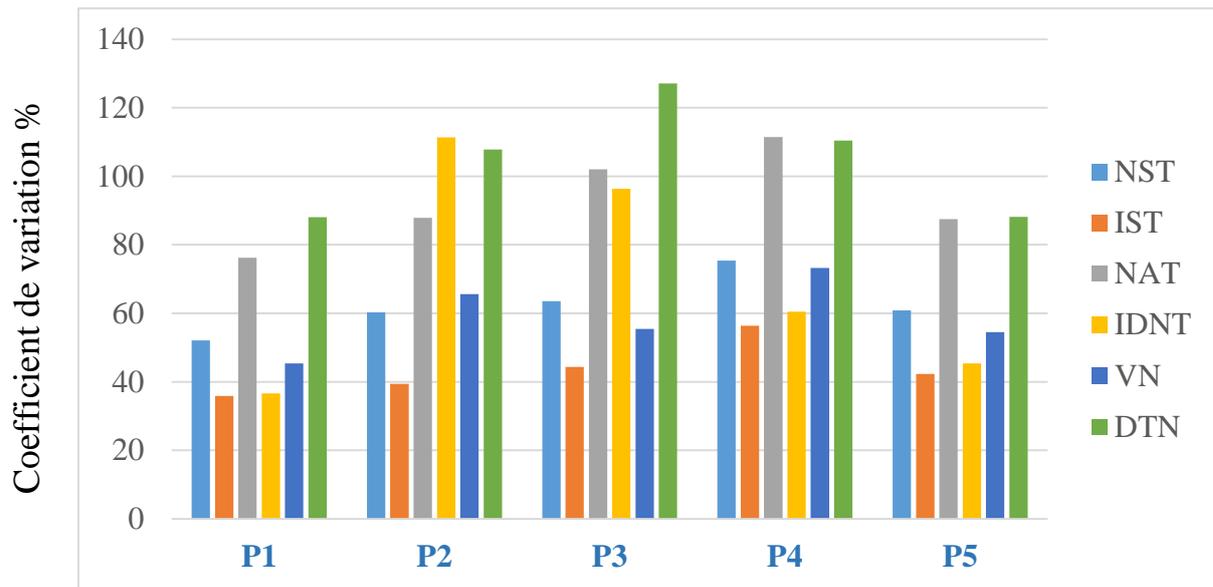


Figure 23: coefficient de variation (cellulaire/échantillon)

Le coefficient de variation de chaque paramètre de la télégénomique cellulaire a été calculé en fonction de l'ensemble des cellules analysées d'un échantillon donné.

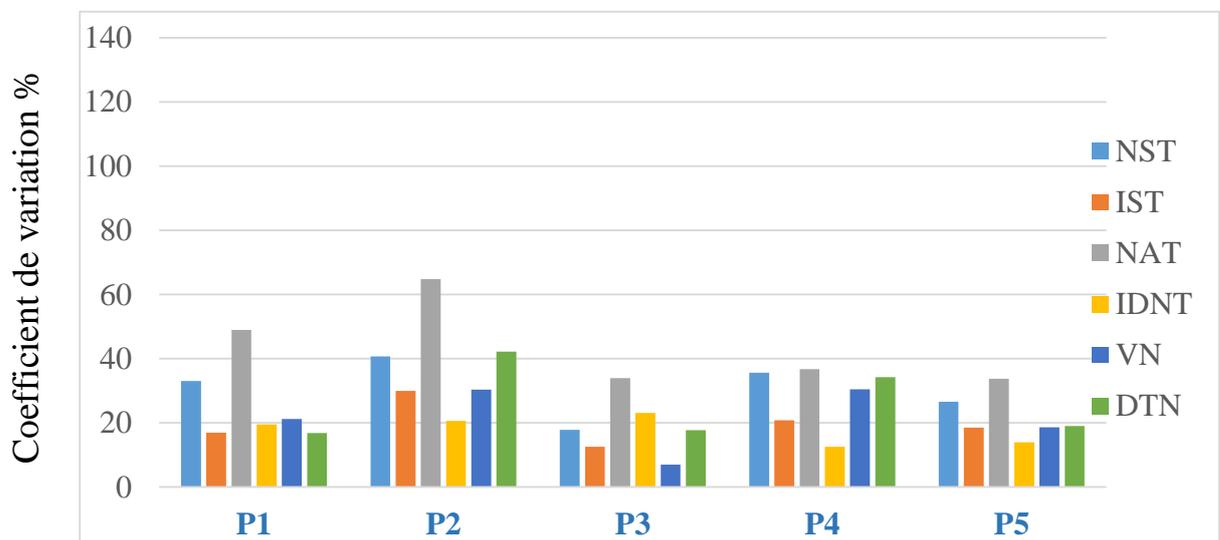


Figure 24: coefficient de variation (cellulaire/zonal)

Le coefficient de variation des paramètres de la télégénomique cellulaire a été calculé en fonction des médianes des zones pathologique d'un échantillon donné. **P2** (228,72%) était l'échantillon qui présentait le coefficient de variation le plus élevé de l'ensemble des six

paramètres alors que **P5** (130,60%) avait celui du plus bas. Les agrégats télomériques (218,22%) étaient le paramètre qui présentait plus de variabilité et l'indice de distribution nucléaire des télomères (89,79%) était celui qui avait le coefficient de variation le plus bas.

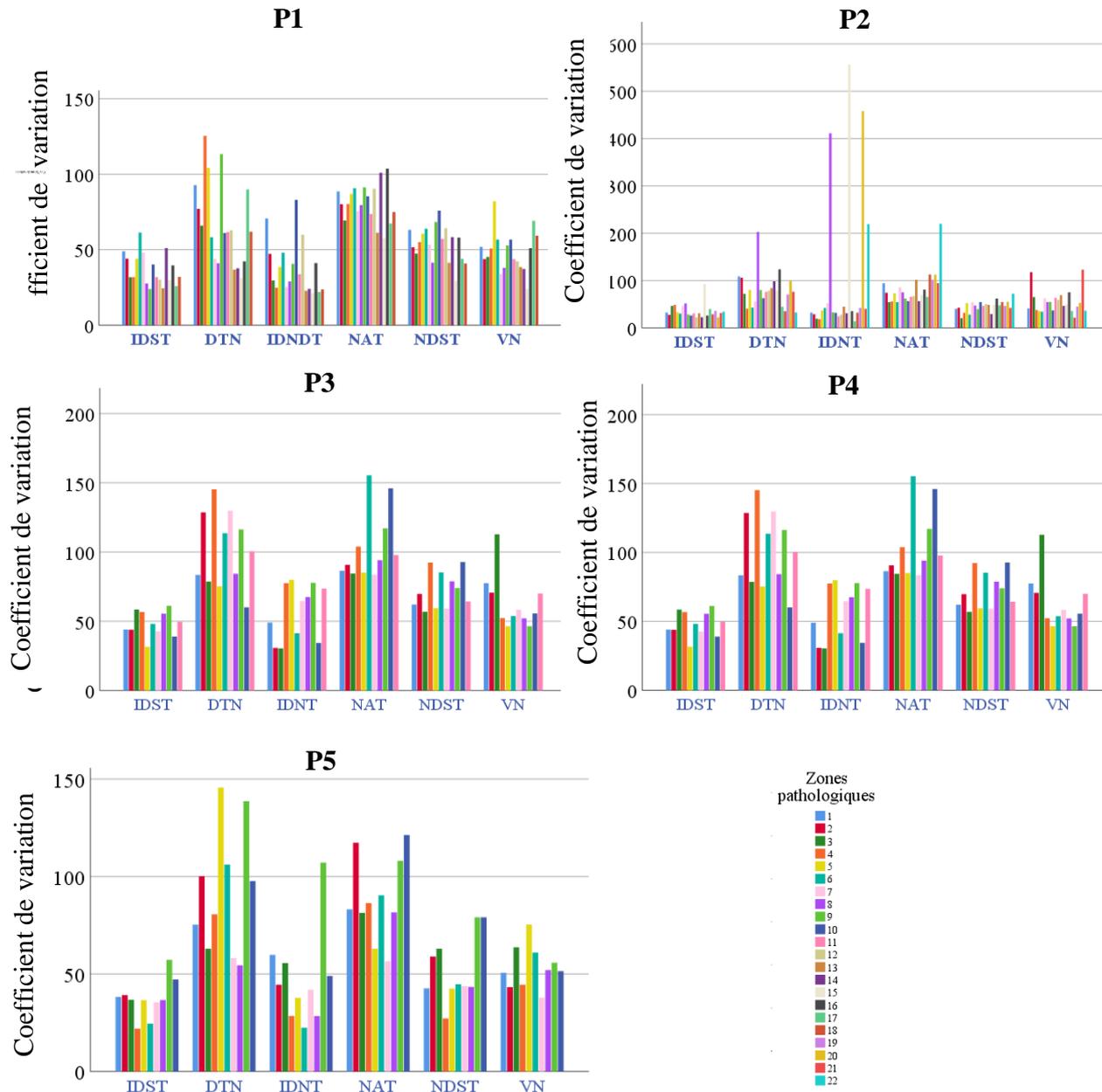


Figure 25: Coefficient de variation des paramètres télégénomiques cellulaire en fonction des zones pathologiques

5.3.2.8 Hétérogénéité des paramètres de la télégénomique cellulaire

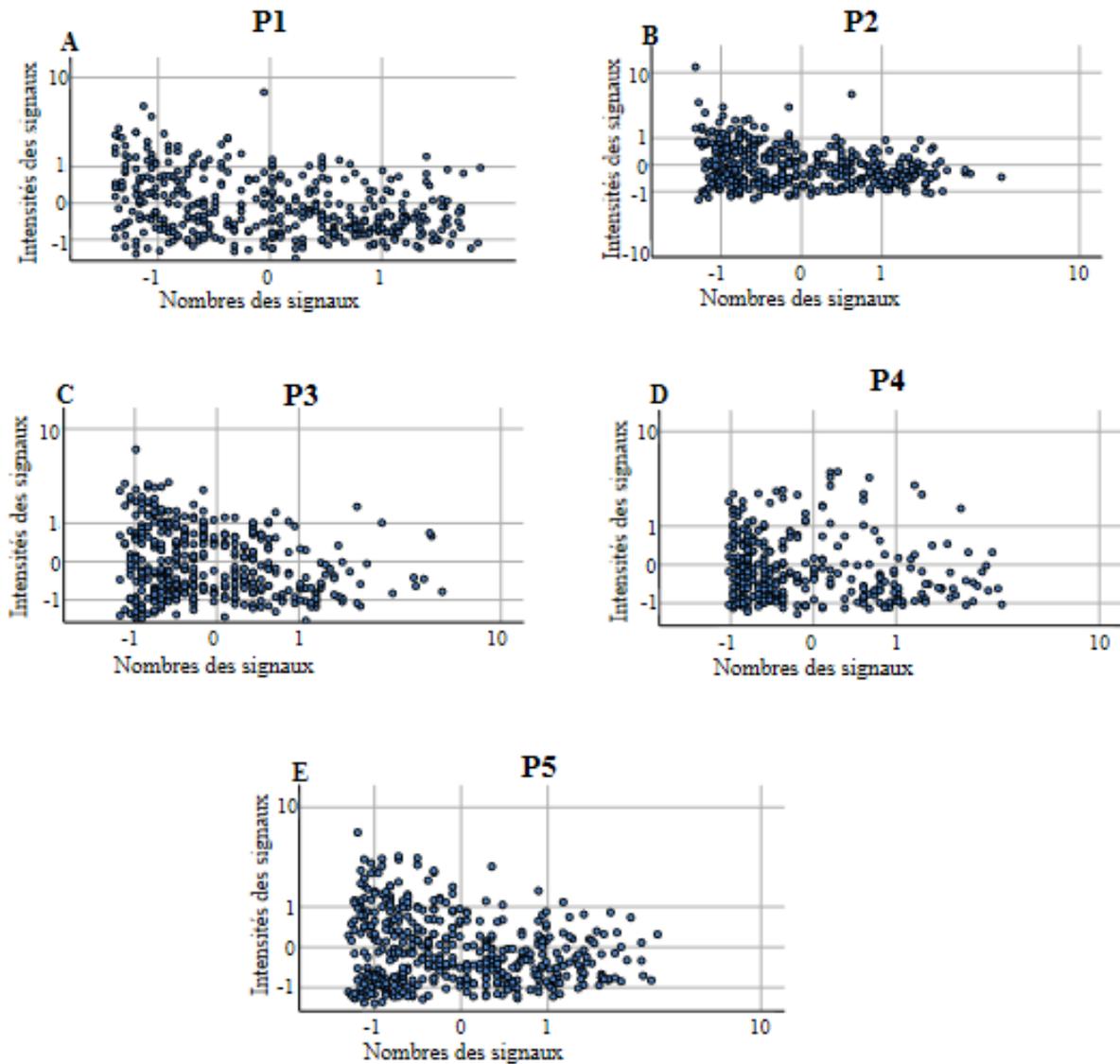


Figure 26: Représentation graphique de l'hétérogénéité cellulaire en fonction de l'intensité et du nombre des télomères.

Les figures A, B, C, D, et E représentent l'hétérogénéité cellulaire des patientes P1, P2, P3, P4, et P5, respectivement.

Nous avons calculé l'index d'hétérogénéité cellulaire en fonction de la longueur et du nombre des télomère chez chaque patiente. Cet index est la valeur moyenne de l'ensemble des distances qui sépare chaque cellule entre elles d'un échantillon donné. Plus cet index est grand, plus il y a une hétérogénéité cellulaire. L'index d'hétérogénéité était de : 1,70 (P1) ; 1,60 (P2) ; 1,64 (P3) ; 1,66 (P4) ; 1,70 (P4). Nous avons trouvé que les échantillons P1 et P5 présentaient statistiquement ($p < 0,000001$) plus d'hétérogénéité cellulaire que les autres échantillons.

5.4 Intégration des données histologiques et télégénomiques cellulaires

5.4.1 Patiente P1

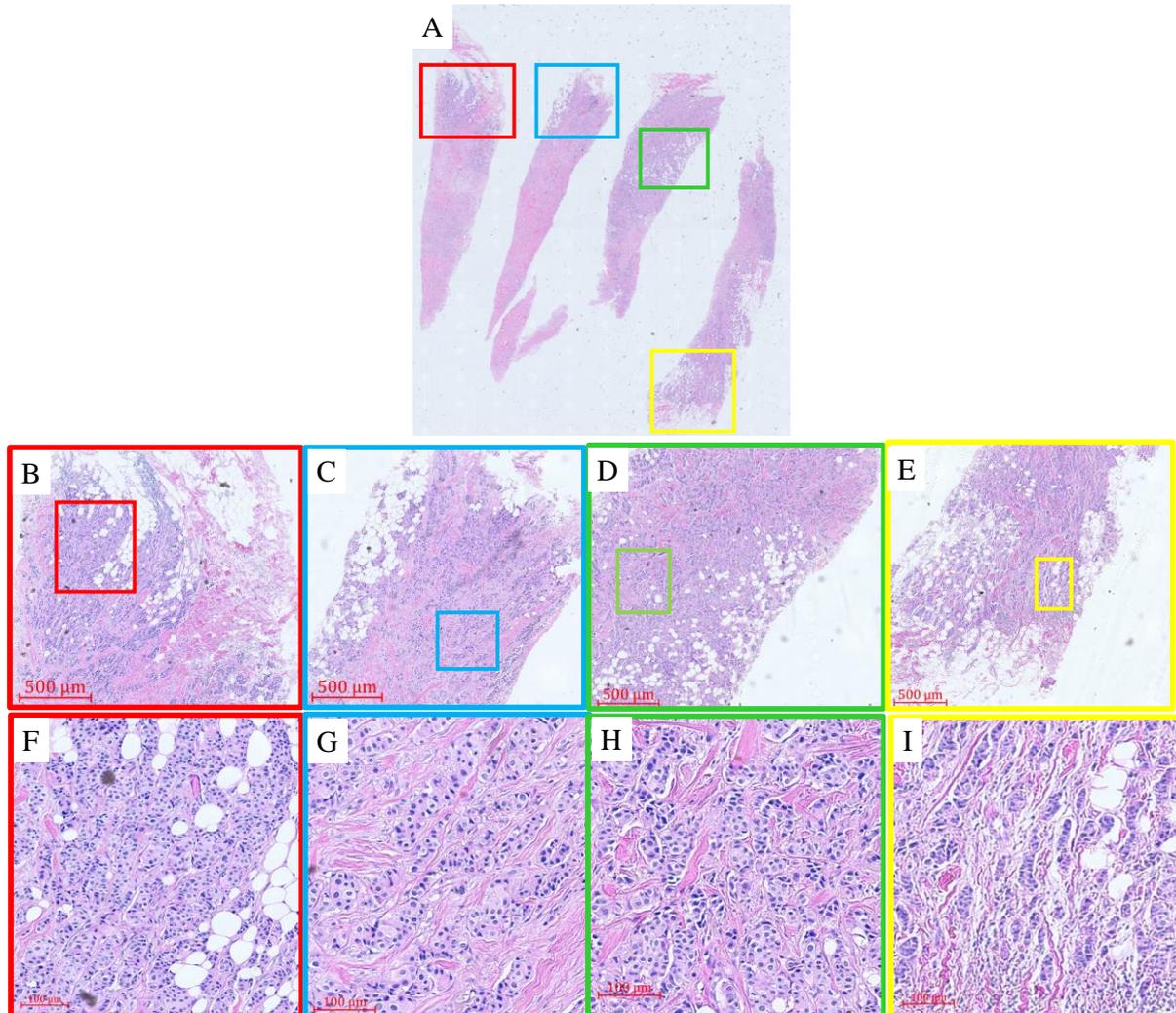


Figure 27 Caractéristiques histologiques des fragments de biopsie de **P1**.

L'image A représente le bloc de l'échantillon **P1** utilisé pour l'analyse histologique, FISH-HER2 et télégénomique cellulaire. Les images B, C, D et E représentent, respectivement, les fragments 1, 2, 3 et 4 constituant le bloc (Image A). Les images F, G, H et I sont des agrandissements respectifs des images B, C, D et E. Bien vrai que les fragments 1, 2, 3 et 4 présentaient une architecture histologique semblable, certaines régions au sein de ces fragments présentent une morphologie tissulaire et nucléaire différente. L'image I présentait des structures tubulaires et nucléaires différentes de celles F, G et H.

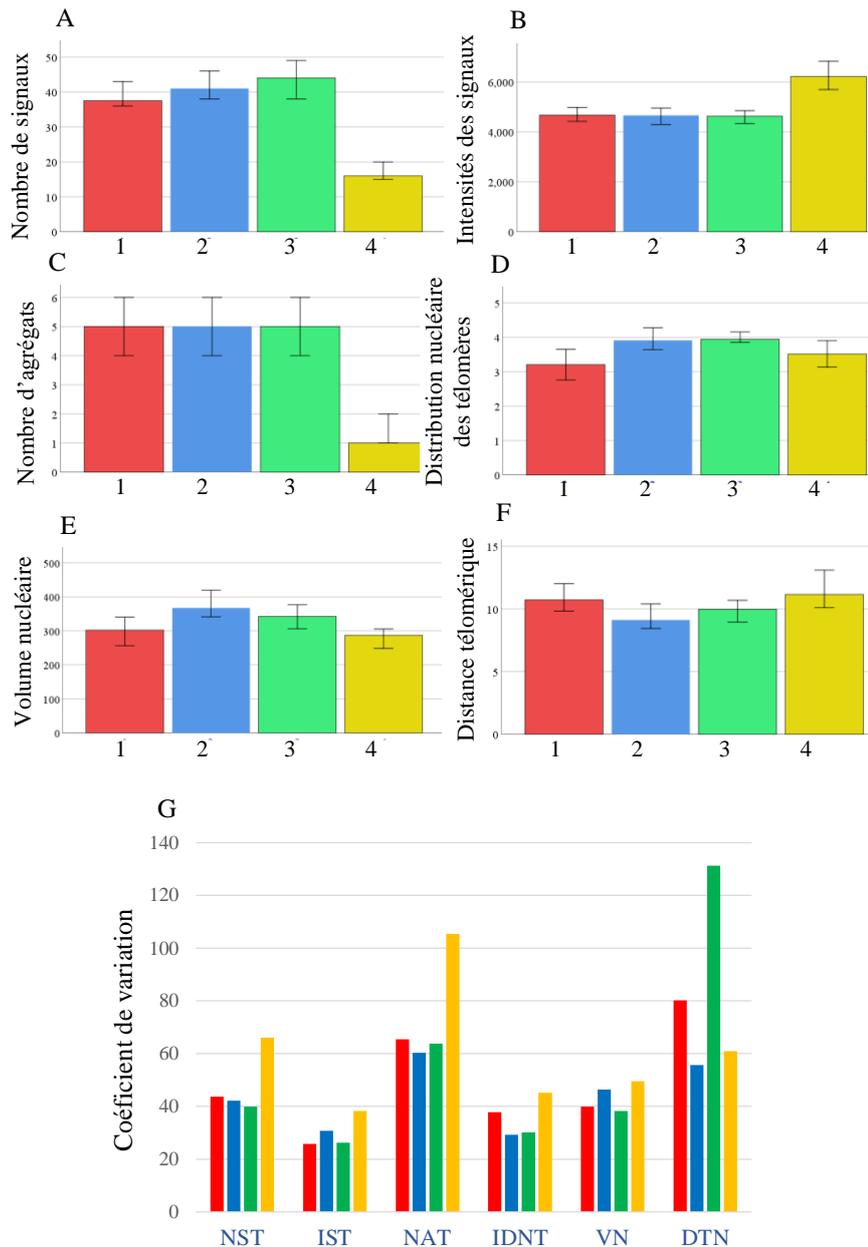


Figure 28: Paramètres télégénomiques cellulaires des fragments de biopsie de **P1**

Nous avons calculé les médianes des 6 paramètres télomériques et leur coefficient de variation des quatre fragments indiqués sur la **figure 27**. Les fragments 1, 2 et 3 présentaient une similarité entre leurs paramètres de la télégénomique cellulaire. Les télomères du fragment 4 étaient plus courts et moins intenses que ceux des fragments 1, 2 et 3. En outre, le fragment 4 présentait plus d'hétérogénéité au sein des paramètres de la télégénomique cellulaire (cinq des six paramètres) que les autres fragments.

Malgré une ressemblance morphologique entre les quatre fragments, nous avons observé une différence remarquable entre le fragment 4 et les autres par rapport à certaines caractéristiques de la télégénomique cellulaire.

5.4.2 Patiente P2

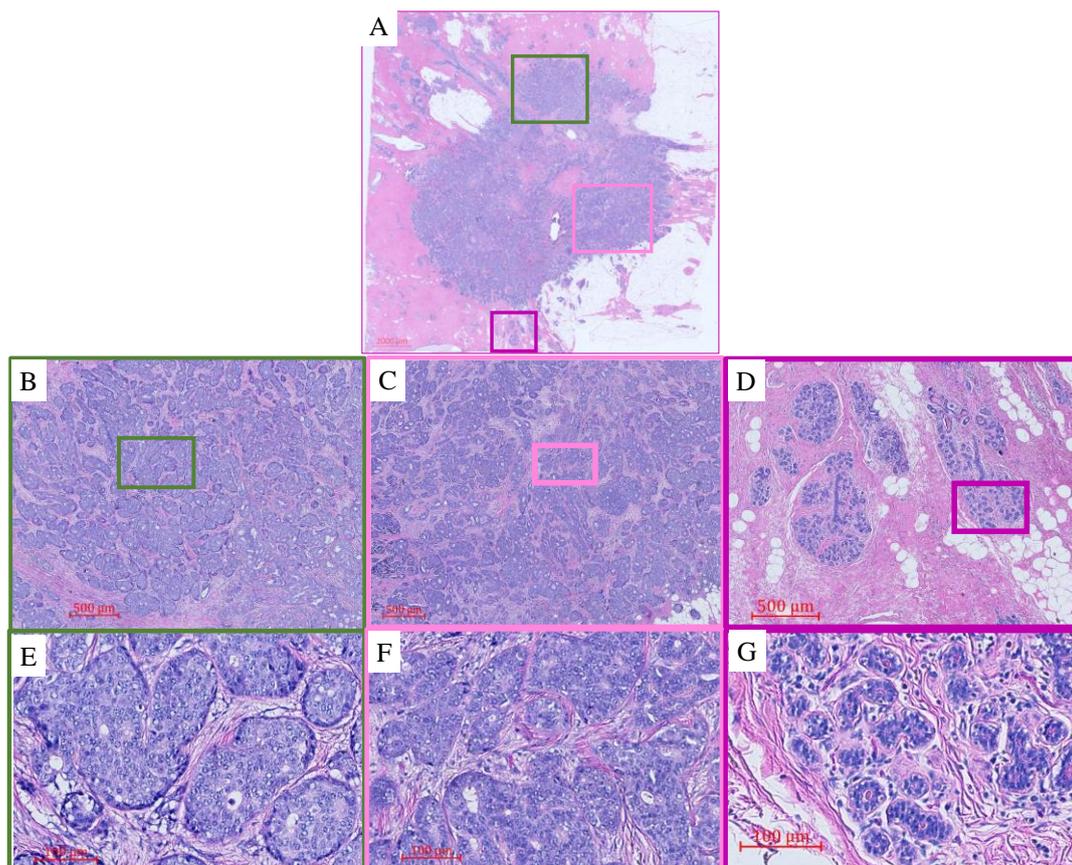


Figure 29:Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de P2.

L'image A représente le bloc de l'échantillon P2 utilisé pour l'analyse histologique, FISH-HER2 et télégénomique cellulaire. Les images B, C et D représentent, respectivement, les zones pathologiques 9, 11 et 19, et leurs agrandissements respectifs sont les images E, F et G. Les zones pathologique 9 (E) et 11 (F) étaient formées de noyaux de taille moyenne avec une densité chromatiniennne moindre que de la zone pathologique 19 (G). En outre, les zones 9 et 11 présentaient une désorganisation tubulaire plus marquée que la zone pathologique 19.

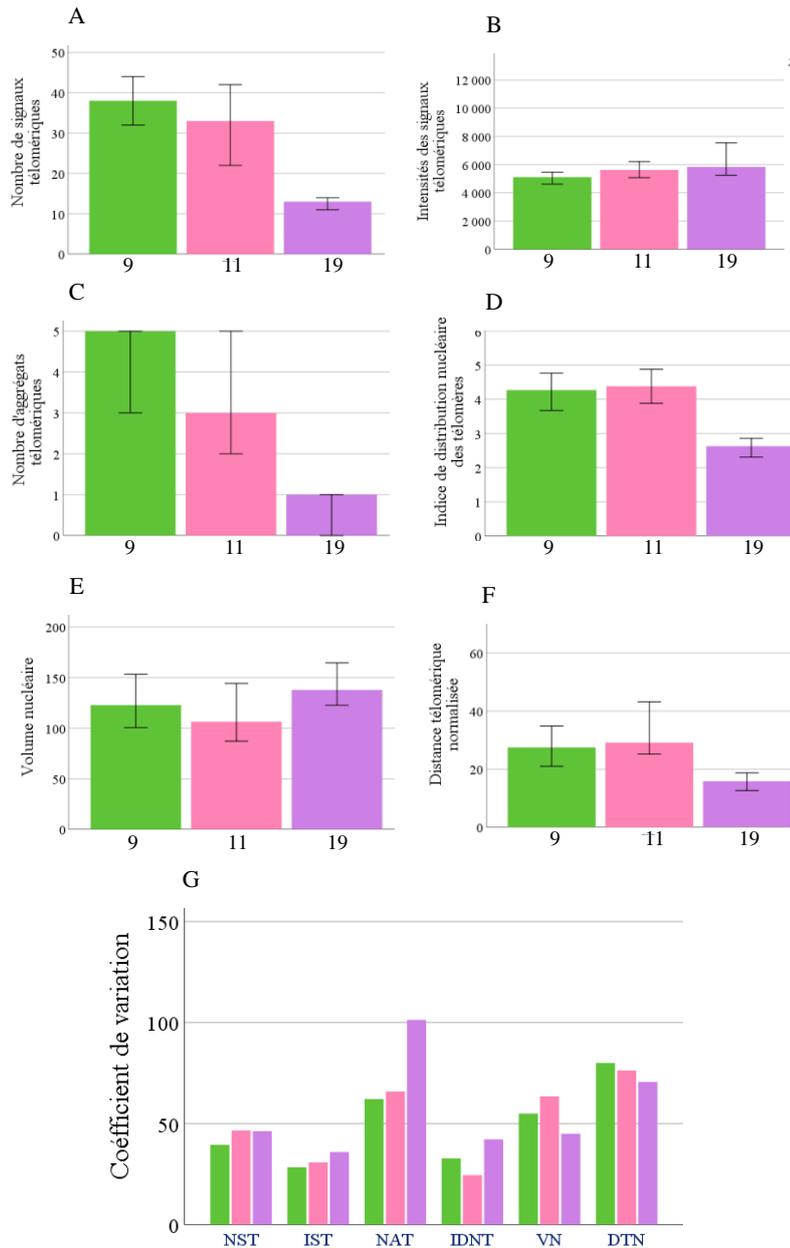


Figure 30 Paramètres télométrie cellulaire de P2

Nous avons calculé les médianes des 6 paramètres télométrie et le coefficient de variation des trois zones pathologiques indiquées sur la **figure 29**. Les zones pathologiques 9 et 11 présentaient plus de télomères et d'agrégats télométrie, un index de distribution télométrie plus élevé (prolifération cellulaire) et des télomères plus raccourcis que la zone pathologique 19. Le volume nucléaire des cellules de la zone 19 étaient légèrement plus élevées que ceux de 9 et 11.

En résumé, en fonction des paramètres télégénomiques cellulaires, les zones pathologiques 9 et 11 présentaient plus d'instabilité génomique que la zone 9, et cette instabilité génomique concordait avec les données histologiques de ces zones. .

5.4.3 Patiente P3

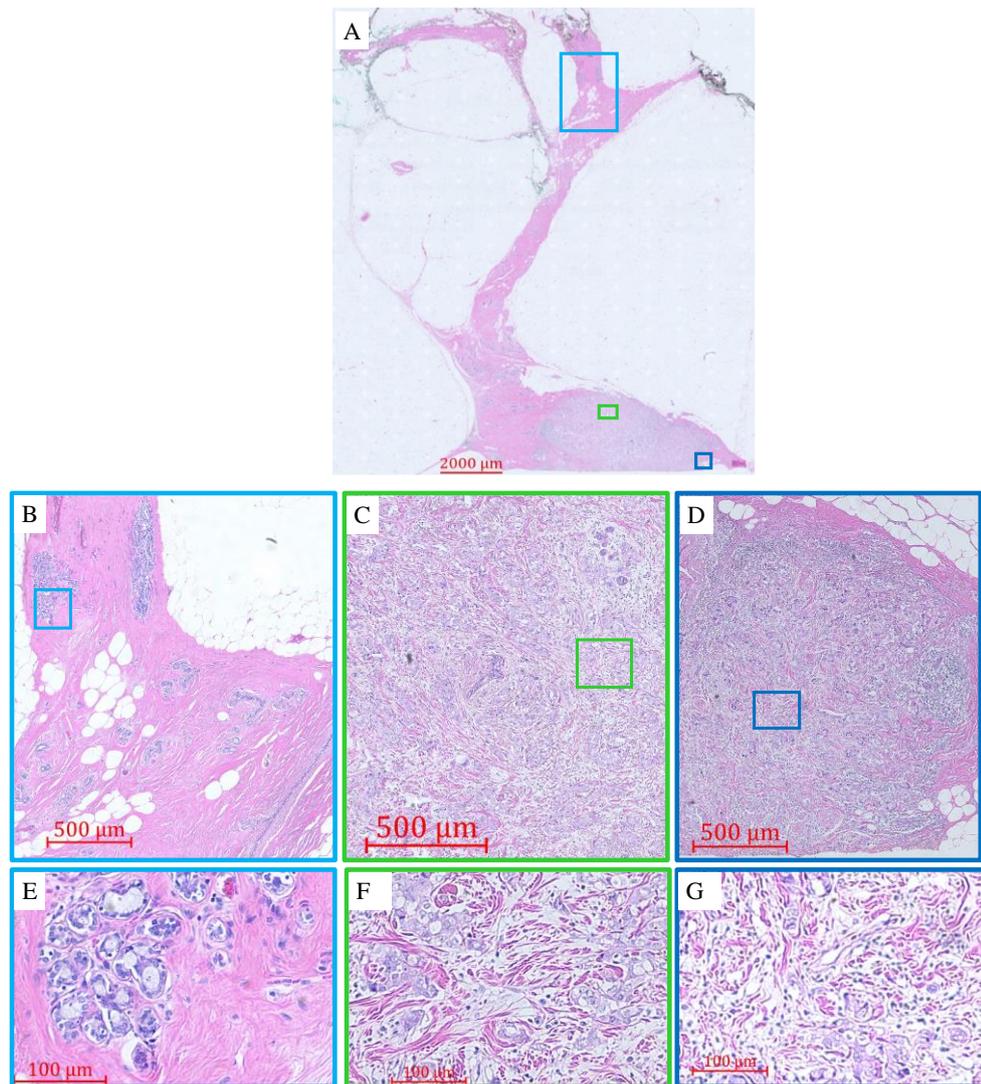


Figure 31:Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de **P3**.

L'image A représente le bloc de l'échantillon P3 utilisé pour l'analyse histologique, FISH-HER2 et télégénomique cellulaire. Les images B, C et D représentent, respectivement, les zones pathologiques 1, 9 et 10, et leurs agrandissements respectifs sont les images E, F et G. La zone pathologique 1 (E) était formée de noyaux de taille moyenne hyperchromatinienne

avec une structure tubulaire conservée, alors que les zones pathologiques 9 (F) et 10 (G) ont des noyaux plus gros avec une densité chromatienne moindre et une désorganisation tubulaire. La zone pathologique 10 (image G) présentait plus d'infiltrats lymphocytaires que celle 9 (image F). Les zones pathologiques 9 et 10 ont un grade pathologique plus élevé que celui de la zone 1.

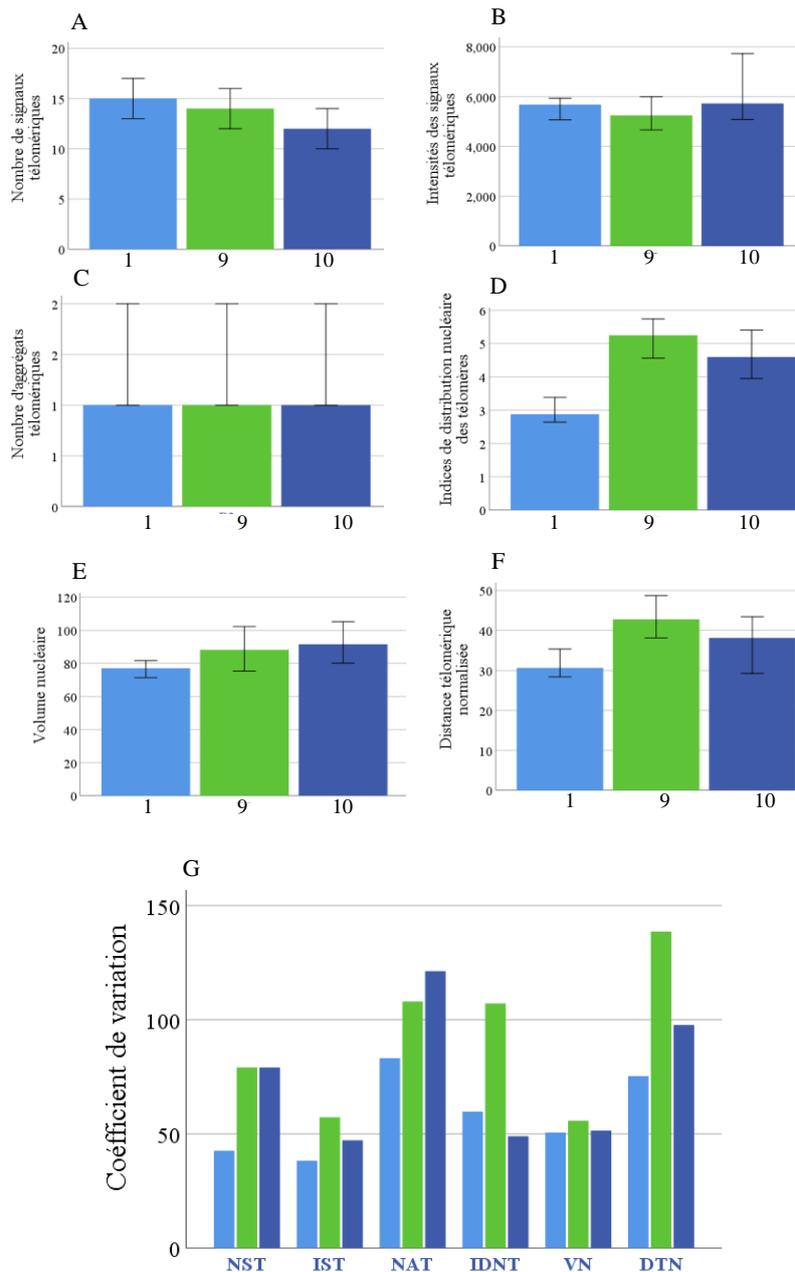


Figure 32: Paramètres télégénomiques cellulaires de P3

Nous avons calculé les médianes des 6 paramètres télomériques et leur coefficient de variation des trois zones pathologiques indiquées sur la **figure 31**. La zone pathologique 10 présentait moins de télomères que les zones 1 et 9. Par contre, l'index de distribution nucléaire des télomères qui représente l'index de prolifération cellulaire était le plus élevé dans les zones 9 et 10. Les noyaux des cellules des 9 et 10 étaient plus volumineux que ceux des cellules de la zone 1. Les cellules des zones 9 et 10 présentaient l'hétérogénéité de leurs paramètres télométrie cellulaire que la zone 1. En résumé, la télométrie cellulaire montrait une hétérogénéité des zones 9 et 10 alors que celles-ci présentaient une architecture tissulaire et une morphologie cellulaire homogène en leur sein.

5.4.4 Patient P4

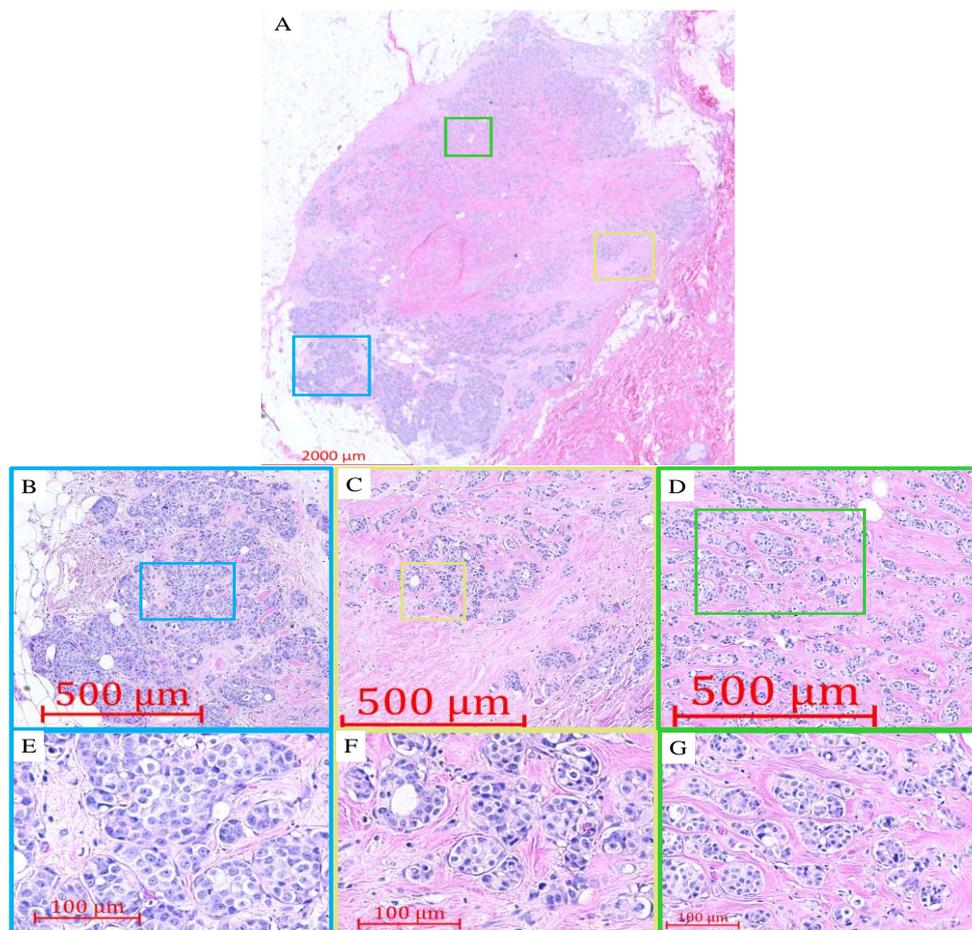


Figure 33:Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de **P4**.

L'image A représente le bloc de l'échantillon P4 utilisé pour l'analyse histologique, FISH-HER2 et télégénomique cellulaire. Les images B, C et D représentent, respectivement, les zones pathologiques 1, 5 et 9, et leurs agrandissements respectifs sont les images E, F et G. La zone pathologique 1 (E) présentait une densité cellulaire et une désorganisation tubulaire plus élevées que celles des zones 5 (F) et 9 (G). Par contre le grade nucléaire des différentes zones était semblable.

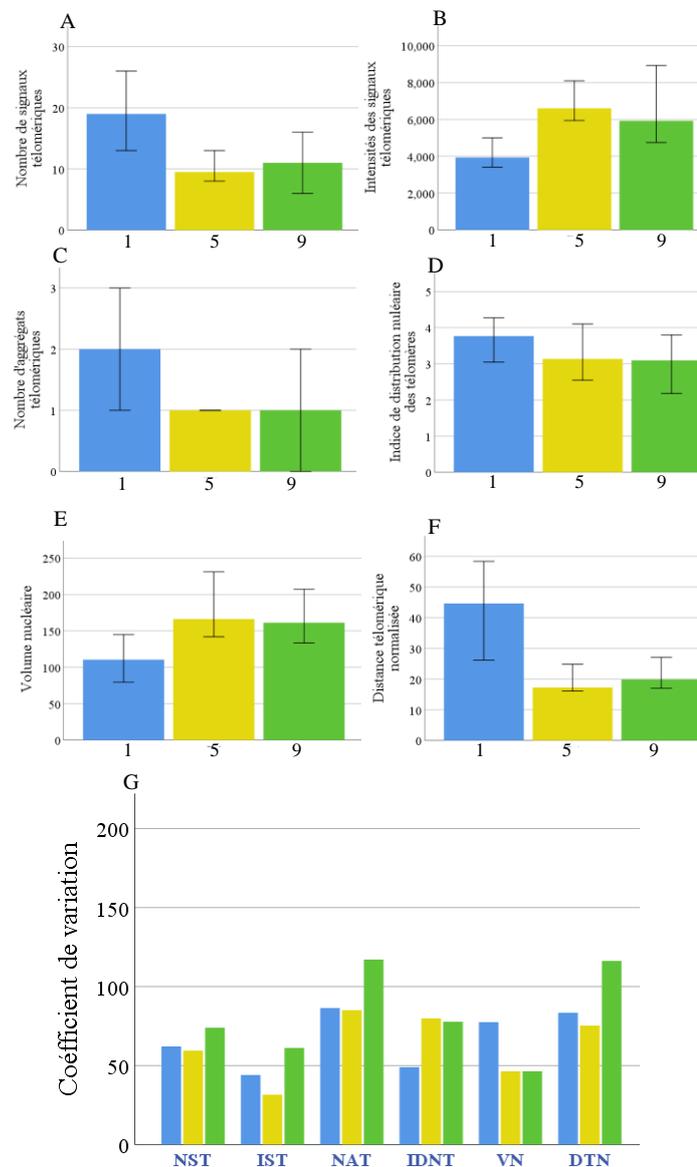


Figure 34: Paramètres télégénomiques cellulaires de P4

Nous avons calculé les médianes des 6 paramètres télomériques et le coefficient de variation des trois zones pathologiques indiquées sur la **figure 33**. La zone pathologique 1

présentait plus de télomères et d'agrégats télomériques et moins d'intensités télomériques que les zones 5 et 9. Bien vrai que le volume nucléaire des cellules de la zone 1 était moindre que ceux des autres, leurs télomères avaient une localisation nucléaire plus périphérique que les zones 5 et 9. La similarité histologique des zones 5 et 9 a été confirmée par Les données télométries cellulaires (pas de différence entre les deux zones par rapport aux différents paramètres de la télométrie cellulaire).

En conclusion, la présence d'une densité cellulaire plus élevée dans la zone 1 associée à des télomères courts, une augmentation de leur nombre et des agrégats télomériques, et une prolifération cellulaire élevée évoquent une instabilité génomique plus élevée de cette zone comparée aux autres zones.

5.4.5 Patiente P5

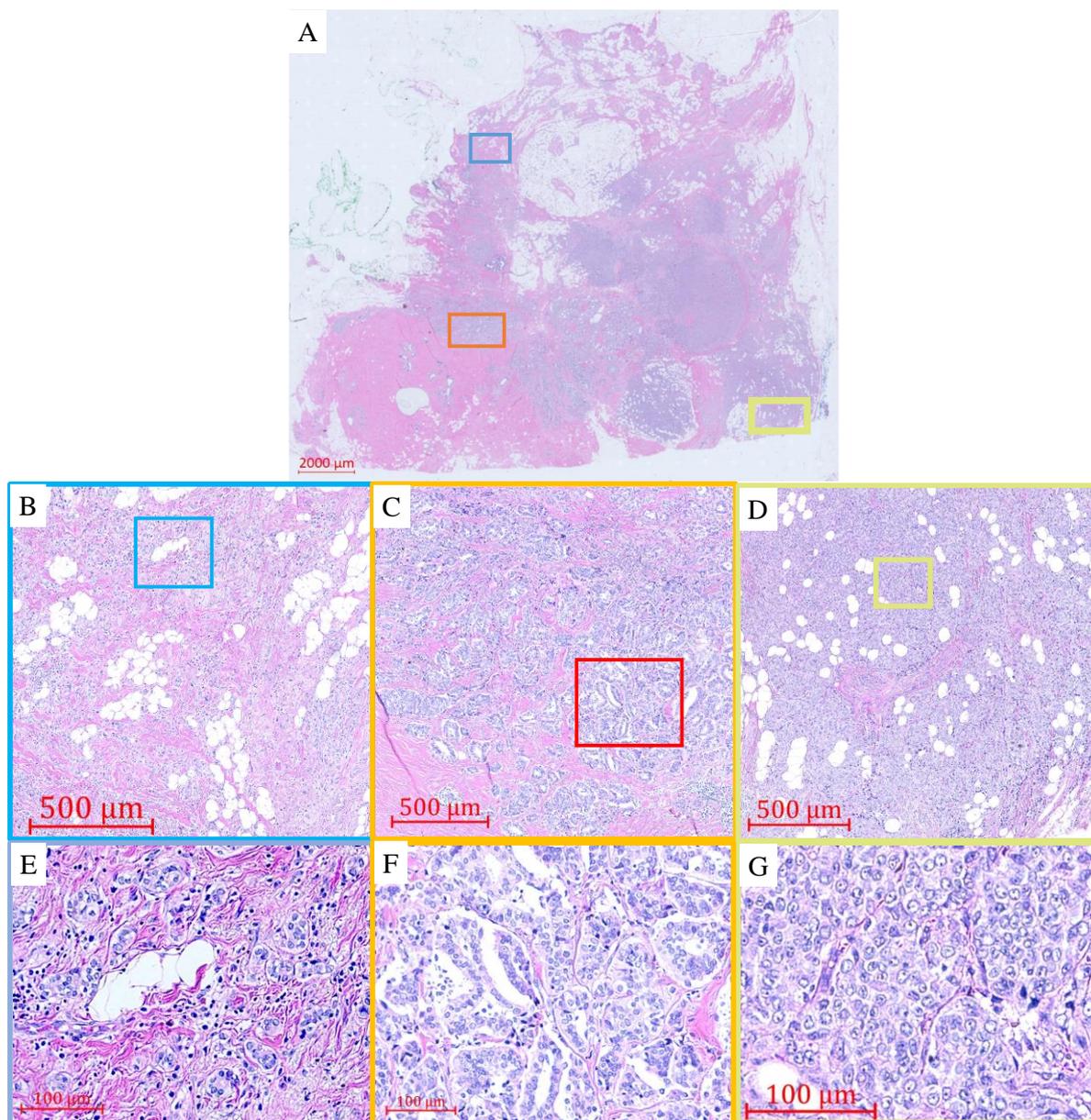


Figure 35 Caractéristiques histologiques de trois zones pathologiques de **P5**.

L'image A représente le bloc de l'échantillon P5 utilisé pour l'analyse histologique, FISH-HER2 et télégénomique cellulaire. Les images B, C et D représentent, respectivement, les zones pathologiques 1 (E), 4 (F) et 12 (G), et leurs agrandissements respectifs sont les images E, F et G. La zone pathologique 1 (E) présentait plus de désorganisation tubulaire et avait des noyaux moins volumineux avec une chromatine plus dense que les deux zones 4 et 12.

L'architecture de la zone 4 était micropapillaire. Les zones 4 et 12 présentaient un grade nucléaire plus élevé que la zone 1.

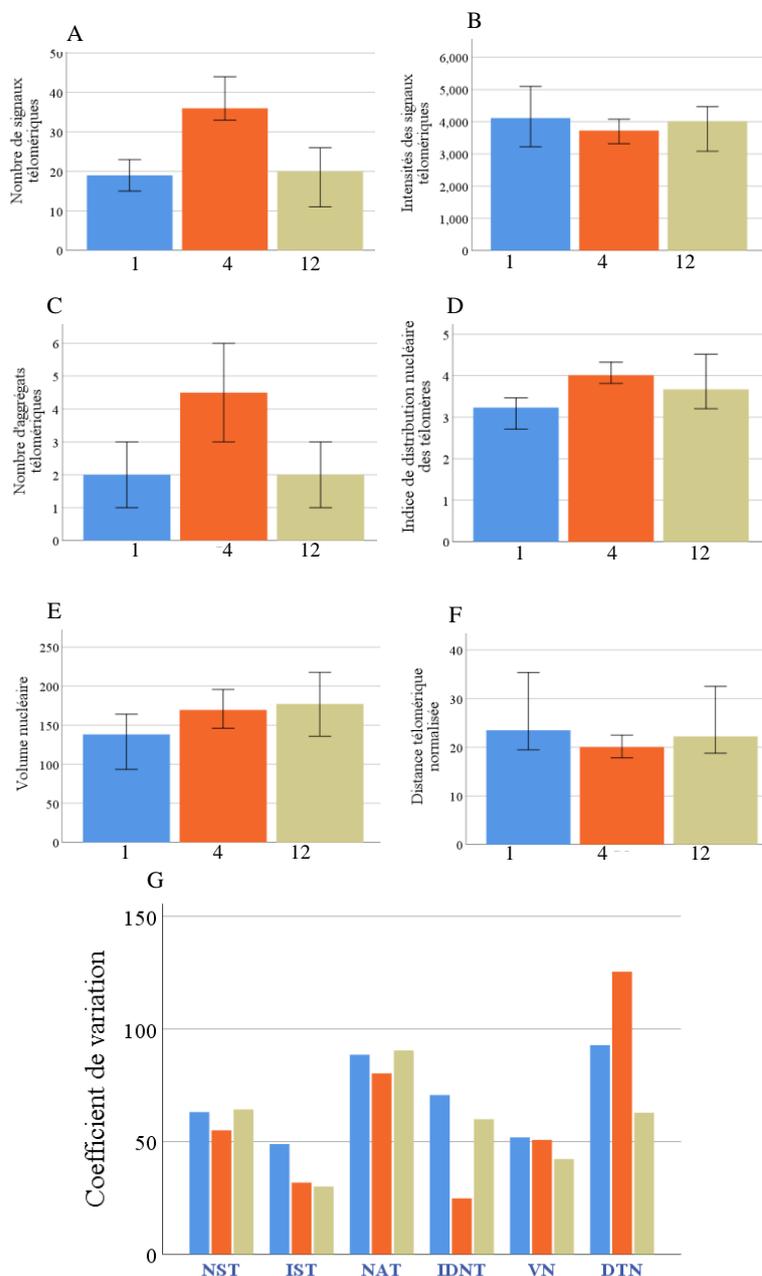


Figure 36: Paramètres télométrie cellulaires de P5

Nous avons calculé les médianes des 6 paramètres télomériques et le coefficient de variation des trois zones pathologiques indiquées sur la figure 35. La zone pathologique 4 présentait plus de télomères et d'agrégats télomériques que les zones 1 et 12. L'index de distribution nucléaire des télomères et le volume nucléaire étaient plus élevés dans les zones 4

et 12 que dans la zone 1. En outre, les zones 4 et 12 étaient télégénomiquement hétérogènes alors qu'en leur sein les cellules présentaient une morphologie plus homogène. En somme, la zone 4 présentait plus de signes d'instabilité génomique (plus de télomères, d'agrégats télomériques, d'index de prolifération et de volume nucléaire) et cette instabilité concordait avec l'aspect histologique (l'aspect micropapillaire)

6. COMMENTAIRES ET DISCUSSION

L'hétérogénéité tumorale est une des caractéristiques du cancer du sein tant sur le plan génomique que transcriptomique et protéomique (81,82). Son évaluation permet de comprendre l'instabilité génomique, l'évolution tumorale et la détermination de clones responsables de métastases et de résistance thérapeutique. Par conséquent, l'hétérogénéité tumorale dans le cancer du sein pourrait être utilisée comme biomarqueur de diagnostic, pronostic et thérapeutique (83,84). Cependant, l'étude de l'hétérogénéité tumorale et l'instabilité génomique dans un contexte cellulaire dans le cancer du sein se heurte à la rareté de méthodologie qui permet d'intégrer les données génomiques à celles cellulaires tout en tenant compte du contexte de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire tumorale. Dans la perspective de développer une telle méthodologie, nous avons initié la présente étude dont l'objectif est d'utiliser la télégénomique cellulaire pour déterminer l'hétérogénéité et l'instabilité génomique dans le cancer du sein.

C'est ainsi que nous avons entamé une étude rétrospective qui s'est déroulée au laboratoire de neuroscience de la FMOS. Nous avons collecté des échantillons et des données pathologiques chez cinq patientes atteintes du cancer du sein, résidant au Québec (Canada), présentant la forme équivoque de HER2 à la technique FISH. Cette forme a servi de modèle d'étude car elle a tendance à être plus hétérogène que les autres formes du cancer du sein (24,85). Nous avons d'abord fait la mise au point de la technique Q-FISH-3D télomère sur des coupes tissulaires du cancer du sein, ensuite nous avons évalué les paramètres définissant l'organisation nucléaire des télomères (la télégénomique cellulaire). Enfin, nous avons déterminé l'hétérogénéité cellulaire et l'instabilité génomique.

Même si l'échantillon d'étude était de petite taille, nous avons jugé important de commenter et discuter certaines données démographiques et pathologiques de cette étude pilote

de preuve de concept. L'âge médian des patientes était de 54 ± 13 et cet âge correspond à celui de diagnostic du cancer du sein au Canada (86). Par contre, cet âge médian est supérieur à celui (46,29 ans) qui a été retrouvé lors du diagnostic du cancer du sein dans certaines études au sein de la population malienne (4,87). Des hypothèses, telles que la fréquence élevée de la forme triple négative au Mali ou la présence de variants génétiques qui favoriseraient la survenue du cancer du sein à un âge plus jeune dans la population malienne que celle Nord-Américaine, ont été déjà évoquées pour expliquer cette différence d'âge (4). La taille moyenne de la tumeur était de 1,75 cm (0,8-2,5 cm) et cette taille est inférieure à celle des cancers du sein au moment du diagnostic au Mali. En effet, une étude récente au Mali a montré que 64,8% et 94,3% des patientes souffrant du cancer du sein présentaient lors du diagnostic des tailles tumorales supérieure à 5 cm et 2 cm, respectivement (4). Cette grande taille des tumeurs est associée plutôt à la découverte tardive du cancer du sein au Mali car il n'existe pas une politique de dépistage systématique comme au Canada (88).

Sur le plan histologique, tous les échantillons étaient du type carcinome canalaire infiltrant. Quatre d'entre eux avaient un grade combiné II/III de Nottingham. Une patiente (**P3**) sur quatre avait des ganglions positifs et l'envahissement vasculaire était présent chez deux des patientes (**P2** et **P5**) (Tableau IV). Ces résultats suggèrent que les patientes **P3** et **P5** présentaient un stade histologique plus avancé que les autres. Plus de 90% des cellules des échantillons analysés présentaient une positivité intense aux récepteurs d'œstrogène (Tableau V). Pour les récepteurs de progestérone, quatre des cinq échantillons étaient positives avec des intensités et pourcentage de cellules variables (Tableau VI). La positivité aux récepteurs d'estrogène de l'ensemble des échantillons est en parfaite ligne avec les données de la littérature car les formes équivoques d'HER2 sont le plus souvent positives aux récepteurs hormonaux dans la population caucasienne (26).

Quatre des cinq échantillons qui avaient bénéficié d'une évaluation HER2 à l'immunohistochimie présentaient tous un statut équivoque sur au moins un des blocs évalués alors qu'à la FISH tous les échantillons étaient équivoques sur au moins un bloc. L'évaluation de plusieurs blocs d'un même échantillon et la combinaison des résultats de l'immunohistochimie à ceux de la FISH ont permis de catégoriser les échantillons en HER2-positif (2/5), HER2-équivoque (2/5) et HER2-négatif (1/5) (Tableau IX). L'analyse approfondie des deux échantillons positifs montre que leur positivité n'est pas associée à une amplification de HER2 mais plutôt à une augmentation du nombre copie du chromosome 17 car le ratio HER2/CEP17 était en dessous de 2. L'augmentation du nombre de copies et la variabilité du statut d'HER2 d'une région tumorale à une autre suggèrent une hétérogénéité tumorale. Le statut équivoque d'un échantillon de la biopsie de **P2** a été réévalué négatif après l'analyse d'autres blocs tissulaires de la mastectomie de **P2** (Tableaux VIII et IX). Cette différence entre les échantillons tissulaires de la biopsie et ceux de la mastectomie est une autre preuve de l'hétérogénéité tumorale des échantillons du cancer du sein étiquetés HER2-équivoques. L'hétérogénéité tumorale dans le cancer sein et surtout des formes HER2-équivoque pose le défi majeur de la prise en charge des patientes car le statut de HER2 est déterminant dans le choix thérapeutique d'autant plus qu'il existe une thérapie efficace pour les patientes positive à HER2 (85).

Les formes équivoques HER2 à la FISH constituent un groupe hétérogène en considérant seulement le profil du nombre de copies de *HER2* et du centromère du chromosome 17. Cette hétérogénéité est plus associée à un changement du nombre de copies du chromosome 17 et d'autres chromosomes. La télégénomique cellulaire est une approche qui permet d'évaluer cette variation chromosomique en plus d'autres indicateurs de l'instabilité génomique (59,64). C'est ainsi que nous avons évalué les paramètres définissant la télégénomique cellulaire et déterminé leurs variations cellulaires afin d'approfondir l'analyse de l'hétérogénéité tumorale

dans le cancer du sein. Il est à rappeler que cette étude est l'une des rares qui a fait l'étude de la télométrie cellulaire dans le cancer du sein et surtout de proposer une méthodologie d'évaluation de l'hétérogénéité génomique et cellulaire.

L'analyse des paramètres télométriques a montré que le nombre des télomères de la patiente **P1** et **P5** était plus élevé que ceux des autres patientes (Figure 17). Le nombre de télomères est corollaire au nombre de chromosomes, et son élévation est un indicateur d'aneuploïdie (89). Le changement du nombre de copies chromosomiques est caractéristique du cancer du sein. En effet, l'augmentation du nombre de copies de certains chromosomes a été associée à l'hétérogénéité tumorale et l'instabilité génomique dans le cancer du sein (69,81).

Ensuite, nous avons observé que l'intensité des télomères, qui est un indicateur de la longueur des télomères, était plus diminuée dans les cellules de **P5** que dans celles des autres échantillons (Figure 18). Le raccourcissement des télomères peut entraîner le cycle de rupture-fusion-pont chromosomique et ce cycle a été associé à l'instabilité génomique (56,64). En outre, le raccourcissement des télomères est une des caractéristiques du cancer du sein et les télomères courts ont été associés à un mauvais pronostic de cette pathologie (61).

Les échantillons **P1** et **P5** avaient plus d'agrégats télomériques que les autres échantillons (Figure 19). Une augmentation du nombre d'agrégats télomériques est un indice d'instabilité génomique, et ils sont le plus souvent la résultante d'une fusion chromosomique pouvant entraîner des réarrangements génomiques (59,64). Nous n'avons pas trouvé de différence entre les échantillons par rapport à l'indice de distribution nucléaire des télomères qui est un indicateur de la prolifération cellulaire (90).

Le cinquième paramètre de télométrie cellulaire que nous avons analysé était le volume nucléaire, et celui des cellules de **P1** était le triple ou plus du double de ceux des cellules des autres échantillons (Figure 21). L'augmentation du volume nucléaire et le pléomorphisme

nucléaire ont été associés au remodelage chromosomique et l'instabilité génomiques dans le cancer (59).

Enfin, nous avons mesuré la distance séparant chaque télomère au centre nucléaire des cellules. Nous avons observé que les télomères de **P1** avaient tendance d'adopter une localisation nucléaire plus centrale que ceux des autres échantillons (Figure 22). Cette localisation nucléaire plus centrale des télomères de **P1** suggérait plus de remodelage nucléaire et des anomalies chromosomiques (41,59).

En résumé, après analyse des données télégénomiques globalement, nous pouvons déduire que l'échantillon **P1** était génomiquement plus instable que les autres à cause du nombre élevé des télomères et des agrégats télomériques, de l'augmentation du volume nucléaire et de la localisation nucléaire plus centrale des télomères. L'échantillon **P5** aussi présentait des caractéristiques d'instabilité génomique : le nombre élevé de télomères et d'agrégats télomériques avec des télomères courts et des noyaux relativement volumineux.

L'étude des caractéristiques télégénomiques des zones pathologiques a laissé entrevoir une hétérogénéité d'une région tumorale à une autre. Pour évaluer davantage cette hétérogénéité, nous avons calculé le coefficient de variation de chaque paramètre télégénomiques cellulaire dans l'ensemble des cellules ou des zones pathologiques d'un échantillon donné. C'est ainsi que nous avons pu déterminer que les échantillons **P3**, **P4** et **P2** présentaient plus de variabilité entre des paramètres télégénomique que les échantillons **P1** et **P5** (Figures 23 et 24) qui avaient des cellules génomiquement plus instables. En outre, l'analyse de l'hétérogénéité cellulaire en fonction de la longueur des télomères et leur nombre a montré que les échantillon P1 et P5 étaient les plus hétérogènes car leur index d'hétérogénéité était très élevé (Figure 26). Ainsi, l'hétérogénéité cellulaire et l'instabilité génomique étaient plus présentes dans les échantillons P1 et P5 que les autres échantillons. De l'analyse de ces données, ils en découlent que l'instabilité génomique et l'hétérogénéité cellulaire étaient plutôt région

cellulaire dépendante et que la variabilité des paramètres de la télégénomique cellulaire serait présente dans des cellules génomiquement moins instables et hétérogènes.

Notre dernière approche analytique a été d'intégrer des caractéristiques histologiques avec celles télégénomiques de certaines zones pathologiques. D'abord, nous avons remarqué que les quatre fragments de l'échantillon **P1** présentaient une similitude au niveau de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire alors que les données télégénomiques cellulaires du fragment 4 étaient différentes de celles des autres (Figures 27 et 28). L'échantillon **P2** présentait une élévation du grade pathologie des zones 9 et 11 et celles-ci montraient aussi des indices d'instabilité génomique (Figures 29 et 30). L'homogénéité cellulaire sur le plan histologique des zones 9 et 10 de l'échantillon **P3** était contrastée par l'hétérogénéité télégénomique cellulaire au sein des deux zones (Figures 31 et 32). La similarité histologique entre les zones 5 et 9 de l'échantillon **P4** a été confirmée par leurs données télégénomiques cellulaires (pas de différences entre les deux zones par rapport aux différents paramètres télégénomiques) (Figures 33 et 34). Enfin, le grade nucléaire élevé de la zone 4 de l'échantillon **P5**, présentant une architecture histologique micro papillaire, est en phase avec les données télégénomiques cellulaires (Figures 35 et 36) qui évoquent une instabilité génomique. En résumé, nous avons remarqué à travers l'analyse intégrée des données histologiques et télégénomiques cellulaires que des zones pathologiquement similaires d'un même échantillon peuvent présenter des profils d'instabilité génomique complètement différents et qu'au sein d'une même zone pathologique les paramètres télégénomiques cellulaires peuvent être hétérogènes. Enfin, nous avons détecté une instabilité génomique accrue dans certaines cellules qui ne présentaient pas d'indices d'agressivité histologique.

Cette étude de preuve de concept ouvre des perspectives énormes dans la compréhension de l'hétérogénéité tumorale et de l'instabilité génomique dans le cancer du sein et d'autres cancers. En effet, nous venons de développer une approche méthodologique qui

permet d'évaluer l'hétérogénéité génomique tumorale et l'instabilité génomique tout en tenant compte de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire. L'adjonction à cette méthodologie des outils d'analyse de la pathologie digitale tels que CellProfiler4 (91) permettra d'extraire plus facilement les caractéristiques de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire. L'intégration et l'analyse des données histologiques à celles télégénomiques cellulaires se fera par des approches bioinformatiques et biostatistiques adaptées. Enfin, la mise en place d'un processus d'automatisation dans le choix des cellules pour l'étude de la télégénomique cellulaire peut être d'un apport inestimable pour l'opérationnalisation de cette méthodologie à une échelle plus grande car le choix manuel des cellules, qui a été fait dans cette étude était fastidieux et chronophage.

7. CONCLUSION

Cette étude de preuve de concept a permis d'établir une méthodologie d'étude de l'hétérogénéité tumorale et de l'instabilité génomique dans le cancer du sein en tenant compte de l'architecture tissulaire et de la morphologie cellulaire. Cette méthodologie doit être validée en effectuant un nombre important d'échantillons du cancer du sein. La validation ne sera possible qu'avec des approches bioinformatiques et biostatistiques appropriées. Ainsi on pourra comprendre davantage le processus d'évolution clonale et d'agressivité tumorale, trouver des biomarqueurs, et baliser des pistes de recherche thérapeutique dans le cancer du sein. Tout ce développement permettra de réduire le taux de mortalité du cancer du sein surtout au Mali où les femmes en payent un lourd tribut.

8. RECOMMANDATIONS

Au terme de cette étude, nous formulerons les recommandations suivantes

Aux autorités politiques et sanitaires

- Financer les études de recherche sur le cancer du sein
- Développer la recherche et l'enseignement de la biologie moléculaire et de la génétique
- Améliorer le plateau technique des structures de recherche clinique et biomédicale
- Développer des stratégies de dépistage et de diagnostic précoce du cancer du sein
- Mettre en place une structure spécialisée et équipée dans la prise en charge des patientes atteintes du cancer du sein
- Faciliter l'accès aux soins en faisant la subvention des médicaments anticancéreux et des examens biologiques spécialisés
- Renforcer la communication et la sensibilisation sur le cancer du sein.

À la communauté scientifique et au personnel de santé

- Explorer davantage la génomique du cancer du sein dans la population malienne
- Être à l'avant-garde de la recherche biomédicale sur le cancer du sein
- Établir des équipes multidisciplinaires de recherche sur le cancer du sein
- Chercher systématiquement des signes du cancer du lors des consultations
- Donner aux patients toute l'attention et l'accompagnement dont ils ont besoin.
- Toujours guider les patients vers des structures spécialisées pour mieux diagnostiquer et faire la prise en charge adéquate
- Sensibiliser la population sur les facteurs de risques

A la population

- Organiser en groupe de pression pour soutenir la recherche sur le cancer du sein
- Faire un dépistage périodique du cancer du sein

- Demander un avis médicale approprié dès les premiers signes fonctionnels du cancer du sein
- Participer aux études de recherche sur le cancer du sein

9. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. M.D RWR. Cancer Biology. Oxford University Press; 2007. 569 p.
2. Breast cancer [Internet]. [cité 19 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/breast-cancer>.
3. 466-mali-fact-sheets.pdf [Internet]. [cité 20 nov 2022]. Disponible sur: <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/466-mali-fact-sheets.pdf>
4. Traore A. Mise en place d'une banque de données cliniques et génomiques du cancer du sein. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2022.
5. Doumbia O. Etude de l'Organisation Nucléaire des Télomères dans les Cellules Circulantes Urinaires du Cancer de la Vessie. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2021.
6. Knecht H, Kongruttanachok N, Sawan B, Brossard J, Prévost S, Turcotte E, et al. Three-dimensional Telomere Signatures of Hodgkin- and Reed-Sternberg Cells at Diagnosis Identify Patients with Poor Response to Conventional Chemotherapy. *Transl Oncol*. 1 août 2012;5(4):269-77.
7. Rangel-Pozzo A, Yu PLI, LaL S, Asbaghi Y, Sisdelli L, Tammur P, et al. Telomere Architecture Correlates with Aggressiveness in Multiple Myeloma. *Cancers*. janv 2021;13(8):1969.
8. Crabbe L, Jauch A, Naeger CM, Holtgreve-Grez H, Karlseder J. Telomere dysfunction as a cause of genomic instability in Werner syndrome. *Proc Natl Acad Sci*. 13 févr 2007;104(7):2205-10.
9. de Oliveira FM, Jamur VR, Merfort LW, Pozzo AR, Mai S. Three-dimensional nuclear telomere architecture and differential expression of aurora kinase genes in chronic myeloid leukemia to measure cell transformation. *BMC Cancer*. 2022 Sep 29;22(1):1024. doi: 10.1186/s12885-022-10094-5. PMID: 36175852; PMCID: PMC9520804.
10. Mallé B. Evaluation des techniques de dépistage et de diagnostic des cancers du sein : mammographie, échographie, cytoponction par rapport à l'histologie au Mali.[Thèse de Médecine]. Bamako (Mali):Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako. 2011
11. Sein : anatomie, examens et maladies [Internet]. [cité 19 juill 2022]. Disponible sur: <https://sante.journaldesfemmes.fr/fiches-anatomie-et-examens/2571039-sein-anatomie-examens-et-maladies/>
12. Diallo K. les tumeurs du sein au service d'anatomie pathologique de l'inrsp : aspects cliniques et diagnostiques. . [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali):Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2011.
13. Bland KI, Copeland EM, Clay MG. Bland, Kirby I & Edward M Copeland. The Breast: Comprehensive Management Of Benign And Malignant Diseases // Review. *Canadian Medical Association Journal*. Ottawa: CMA Impact, Inc; 1991;144(10):1283.

14. Marieb EN, Brady P, Mallatt J. Human anatomy. Ninth edition, global edition. Harlow: Pearson Education Limited; 2020.
15. Traore MST. Cancer du sein au Mali : Anatomie clinique et suivi. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali):Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2008
16. Bouchbika Z, Serhier Z, Sahraoui S, Bennani-Othmani M, Benider A. Stade du cancer du sein lors du diagnostic : impact des campagnes de sensibilisation. *Prat Organ Soins*. 2012;43(4):269-75.
17. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, Published online 4 February 2021; <https://doi.org/10.3322/caac.21660>.
18. Nkondjock A, Ghadirian P. Facteurs de risque du cancer du sein. *médecine/sciences*. févr 2005;21(2):175-80.
19. Sun YS, Zhao Z, Yang ZN, Xu F, Lu HJ, Zhu ZY, et al. Risk Factors and Preventions of Breast Cancer. *Int J Biol Sci*. 2017;13(11):1387-97.
20. Dabbs DJ. Breast pathology. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012.
21. Reinaud DF. Le carcinome canalaire in situ : une forme de cancer du sein [Internet]. Concilio. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.concilio.com/oncologie-carcinome-canalaire-in-situ>
22. Prise en charge thérapeutique du carcinome lobulaire in situ [Internet]. REVUE GENESIS. [cité 23 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.revuegenesis.fr/prise-en-charge-therapeutique-du-carcinome-lobulaire-in-situ/>
23. Furrer, D. , Paquet, C. , Jacob, S. , Diorio, C. . The Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) as a Prognostic and Predictive Biomarker: Molecular Insights into HER2 Activation and Diagnostic Implications. In: Lemamy, G. , editor. Cancer Prognosis [Internet]. London: IntechOpen; 2018 [cited 2023 Jan 17]. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/61662> doi: 10.5772/intechopen.78271.
24. Schettini F, Prat A. Dissecting the biological heterogeneity of HER2-positive breast cancer. *Breast Off J Eur Soc Mastology*. 5 août 2021;59:339-50.
25. Lacroix-Triki DM, Roussy G, Treilleux DI. Cas où le statut HER2 est ambigu. [Internet]. Dijon: 2016;: [cited 2023 Jan 17]. Available from: http://senologie.tv/pdf_2016/582f276576517.pdf.
26. Sebban DE. Les différents stades du cancer du sein : classification et grades [Internet]. Docteur Sebban. 2019 [cité 25 juill 2022]. Disponible sur: <https://www.docteur-eric-sebban.fr/cancer-du-sein/diagnostic-cancer-sein/stades-et-types-de-cancer-du-sein/>
27. Keita ML. Aspects épidémiologique histopathologiques et immunohistochimiques. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali):Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2014

28. Radiothérapie et cancer, comment ça marche ? Quels effets secondaires des rayons ? [Internet]. [cité 5 août 2022]. Disponible sur: <https://curie.fr/dossier-pedagogique/la-radiotherapie-comment-ca-marche>
29. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144(5):646-674. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
30. Lee JK, Choi YL, Kwon M, Park PJ. Mechanisms and Consequences of Cancer Genome Instability: Lessons from Genome Sequencing Studies. *Annu Rev Pathol Mech Dis*. 2016;11(1):283-312.
31. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70. doi:10.1038/nature11412.
32. Gollin SM. Mechanisms leading to chromosomal instability. *Semin Cancer Biol*. févr 2005;15(1):33-42.
33. Laughney AM, Elizalde S, Genovese G, Bakhom SF. Dynamics of Tumor Heterogeneity Derived from Clonal Karyotypic Evolution. *Cell Rep*. août 2015;12(5):809-20.
34. Stephens PJ, McBride DJ, Lin ML, et al. Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature*. 2009;462(7276):1005-1010. doi:10.1038/nature08645.
35. Duijf PHG, Schultz N, Benezra R. Cancer cells preferentially lose small chromosomes. *Int J Cancer J Int Cancer*. 15 mai 2013;132(10):2316-26.
36. Lin CY, Shukla A, Grady JP, Fink JL, Dray E, Duijf PHG. Translocation Breakpoints Preferentially Occur in Euchromatin and Acrocentric Chromosomes. *Cancers*. 8 janv 2018;10(1):13.
37. Andor N, Maley CC, Ji HP. Genomic instability in cancer: Teetering on the limit of tolerance. *Cancer Res*. 1 mai 2017;77(9):2179-85.
38. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: Pathogenesis and clinical implications. *Mol Oncol*. juin 2010;4(3):255-66.
39. Marcand S, Brun B, Ancelin K, Gilson E. Les télomères : du normal au pathologique. *médecine/sciences*. 1997;13(11):1250.
40. Sandin, S., & Rhodes, D. (2014). Telomerase structure. *Current Opinion in Structural Biology*, 25, 104-110. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.02.003>. Gonzalez-Suarez I, Gonzalo S. Crosstalk between chromatin structure, nuclear compartmentalization, and telomere biology. *Cytogenet Genome Res*. 2008;122(3-4):202-10.
42. Cacchione S, Cerone MA, Savino M. In vitro low propensity to form nucleosomes of four telomeric sequences. *FEBS Lett*. 1997;400(1):37-41.
43. Lejnine S, Makarov VL, Langmore JP. Conserved nucleoprotein structure at the ends of vertebrate and invertebrate chromosomes. *Proc Natl Acad Sci*. 14 mars 1995;92(6):2393-7.

44. Pisano S, Marchioni E, Galati A, Mechelli R, Savino M, Cacchione S. Telomeric Nucleosomes Are Intrinsically Mobile. *J Mol Biol.* juin 2007;369(5):1153-62.
45. Carlier F. Fonctions et organisations de l'hétérochromatine au cours du développement sexué chez le champignon filamenteux *Podospira anserina*. :305.
46. Ancelin K, Castellazzi M, Gilson E. Télomères et cancer: les barrières tombent. *médecine/sciences.* 2000;16(4):481.
47. Olovnikov AM. Telomeres, telomerase, and aging: Origin of the theory. *Exp Gerontol.* juill 1996;31(4):443-8.
48. Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell.* déc 1985;43(2):405-13.
49. Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell.* déc 1987;51(6):887-98.
50. Forsyth NR, Wright WE, Shay JW. Telomerase and differentiation in multicellular organisms: Turn it off, turn it on, and turn it off again. *Differentiation.* janv 2002;69(4-5):188-97.
51. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific Association of Human Telomerase Activity with Immortal Cells and Cancer. *Science.* 23 déc 1994;266(5193):2011-5.
52. Lee JJ, Nam CE, Kook H, Maciejewski JP, Kim YK, Chung IJ, et al. Constitution and telomere dynamics of bone marrow stromal cells in patients undergoing allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.* 1 nov 2003;32(9):947-52.
53. Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci.* 11 oct 1994;91(21):9857-60.
54. Chuang TCY, Moshir S, Garini Y, Ya A, Chuang C, Young IT, et al. The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* 2004;8.
55. Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TCY, et al. Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytometry A.* oct 2005;67A(2):144-50.
56. Mai S, Garini Y. The significance of telomeric aggregates in the interphase nuclei of tumor cells. *J Cell Biochem.* 2006;97(5):904-15.
57. Ramírez MJ, Surrallés J. Laser confocal microscopy analysis of human interphase nuclei by three-dimensional FISH reveals dynamic perinucleolar clustering of telomeres. *Cytogenet Genome Res.* 2008;122(3-4):237-42.
58. Okamoto K, Seimiya H. Revisiting Telomere Shortening in Cancer. *Cells.* 31 janv 2019;8(2):107.
59. Samassekou O. Dynamic Length Changes of Telomeres and Their Nuclear Organization in Chronic Myeloid Leukemia. *Cancers.* 22 août 2013;5(4):1086-102.

60. Ennour-Idrissi K, Maunsell E, Diorio C. Telomere Length and Breast Cancer Prognosis: A Systematic Review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1 janv 2017;26(1):3-10.
61. Heaphy CM, Subhawong AP, Gross AL, Konishi Y, Kouprina N, Argani P, et al. Shorter telomeres in luminal B, HER-2 and triple-negative breast cancer subtypes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* févr 2011;24(2):194-200.
62. Rashid-Kolvear F, Pintilie M, Done SJ. Telomere Length on Chromosome 17q Shortens More than Global Telomere Length in the Development of Breast Cancer. *Neoplasia N Y N.* avr 2007;9(4):265-70.
63. Lansdorp P. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet.* 1 mai 1996;5(5):685-91.
64. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztejn Z, et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci.* 5 juill 2005;102(27):9613-8.
65. Louis SF, Vermolen BJ, Garini Y, Young IT, Guffei A, Lichtensztejn Z, et al. c-Myc induces chromosomal rearrangements through telomere and chromosome remodeling in the interphase nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* juill 2005;102(27):9613-8.
66. Chuang TCY, Moshir S, Garini Y, Chuang AYC, Young IT, Vermolen B, et al. The three-dimensional organization of telomeres in the nucleus of mammalian cells. *BMC Biol.* juin 2004;2:12.
67. Vermolen BJ, Garini Y, Mai S, Mougey V, Fest T, Chuang TCY, et al. Characterizing the three-dimensional organization of telomeres. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol.* oct 2005;67(2):144-50.
68. Pellestor F, Paulasova P, Macek M, Hamamah S. Les PNA (peptide nucleic acids) : Des sondes high-tech pour l'analyse génétique et cytogénétique moléculaire. *médecine/sciences.* 1 août 2005;21(8-9):753-8.
69. Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, et al. Heterogeneity in Telomere Length of Human Chromosomes. *Hum Mol Genet.* 1 mai 1996;5(5):685-91.
70. Louis S, Rangel-Pozzo A, Knecht H, Mai S. Three-Dimensional Telomere Analysis Using Teloview® Technology Identifies Smouldering Myeloma Patients with High Risk of Progression to Full Stage Multiple Myeloma in a Proof of Concept Cohort. *Blood.* 5 nov 2020;136(Supplement 1):19-20.
71. Florijn RJ, Slats J, Tanke HJ, Raap AK. Analysis of antifading reagents for fluorescence microscopy. *Cytometry.* 1995;19(2):177-82.
72. Schaefer LH, Schuster D, Herz H. Generalized approach for accelerated maximum likelihood based image restoration applied to three-dimensional fluorescence microscopy. *J Microsc.* nov 2001;204(Pt 2):99-107.

73. Klewes L, Höbsch C, Katzir N, Rourke D, Garini Y, Mai S. Novel automated three-dimensional genome scanning based on the nuclear architecture of telomeres. *Cytometry A*. févr 2011;79A(2):159-66.
74. Samassekou O, Hébert J, Mai S, Yan J. Nuclear remodeling of telomeres in chronic myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. mai 2013;52(5):495-502.
75. Samassekou O. Dynamique des changements de la longueur des télomères individuels et de leur architecture nucléaire dans les cellules néoplasiques. 2013.
76. Amiel A, Fejgin MD, Goldberg-Bittman L, Sharoni R, Hadary R, Kitay-Cohen Y. Telomere aggregates in hepatitis C patients. *Cancer Invest*. 2009;27(6):650-654. doi:10.1080/07357900802350806.
77. Gadji M, Mathur S, Bélanger B, Jangamreddy JR, Lamoureux J, Tsanaclis AMC, et al. Three-Dimensional Nuclear Telomere Profiling as a Biomarker for Recurrence in Oligodendrogliomas: A Pilot Study. *Int J Mol Sci*. 12 nov 2020;21(22):8539.
78. Wolff AC, Hammond MEH, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *Arch Pathol Lab Med*. 1 févr 2014;138(2):241-56.
79. Sunpaweravong S, Sunpaweravong P, Sathitruangsak C, Mai S. Three-dimensional telomere architecture of esophageal squamous cell carcinoma: comparison of tumor and normal epithelial cells: Telomere architecture in esophageal cancer. *Dis Esophagus*. mai 2016;29(4):307-13.
80. Paik S, Kim C, Baehner FL, Park T, Wickerham DL, Wolmark N. A Multigene Assay to Predict Recurrence of Tamoxifen-Treated, Node-Negative Breast Cancer. *N Engl J Med*. 2004;
81. Turner KM, Yeo SK, Holm TM, Shaughnessy E, Guan JL. Heterogeneity within molecular subtypes of breast cancer. *Am J Physiol - Cell Physiol*. 1 août 2021;321(2):C343-54.
82. Polyak K. Heterogeneity in breast cancer. *J Clin Invest*. 3 oct 2011;121(10):3786-8.
83. Barzaman K, Karami J, Zarei Z, Hosseinzadeh A, Kazemi MH, Moradi-Kalbolandi S, et al. Breast cancer: Biology, biomarkers, and treatments. *Int Immunopharmacol*. juill 2020;84:106535.
84. Zeng X, Liu C, Yao J, Wan H, Wan G, Li Y, et al. Breast cancer stem cells, heterogeneity, targeting therapies and therapeutic implications. *Pharmacol Res*. janv 2021;163:105320.
85. Pernas S, Tolaney SM. Targeting HER2 heterogeneity in early-stage breast cancer. *Curr Opin Oncol*. nov 2020;32(6):545-54.
86. Heer E, Ruan Y, Mealey N, Quan ML, Brenner DR. The incidence of breast cancer in Canada 1971–2015: trends in screening-eligible and young-onset age groups. *Can J Public Health Rev Can Santé Publique*. 6 mars 2020;111(5):787-93.

87. Yaya D. Pleurésie, caractéristiques cliniques et étiologiques, facteur pronostic du cancer du sein. [Thèse de Médecine]. Bamako (Mali): Université des Sciences, des Techniques et des Technologies de Bamako; 2022.
88. Chaput G, Del Giudice ME, Kucharski E. Dépistage du cancer au Canada. *Can Fam Physician*. janv 2021;67(1):e12-4.
89. Samassekou O, Bastien N, Lichtensztejn D, Yan J, Mai S, Drouin R. Different TP53 mutations are associated with specific chromosomal rearrangements, telomere length changes, and remodeling of the nuclear architecture of telomeres: TP53 Mutations, Chromosome Instability, and Telomeres. *Genes Chromosomes Cancer*. nov 2014;53(11):934-50.
90. Gadji M, Adebayo Awe J, Rodrigues P, Kumar R, Houston DS, Klewes L, et al. Profiling Three-Dimensional Nuclear Telomeric Architecture of Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemia Defines Patient Subgroups. *Clin Cancer Res*. 15 juin 2012;18(12):3293-304.
91. Stirling DR, Swain-Bowden MJ, Lucas AM, Carpenter AE, Cimini BA, Goodman A. CellProfiler 4: improvements in speed, utility and usability. *BMC Bioinformatics*. 10 sept 2021;22:433.

ANNEXES

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des Pharmaciens, et de mes condisciples : D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement,

D'exercer dans l'intérêt de la Santé Publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement,

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine,

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels,

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses,

Que je sois couvert d'opprobres et méprisé de mes confrères si j'y manque !

Je le jure !