

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
Université des Frères Mentouri Constantine 1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Animale

N° d'ordre : 21/DS/2022

N° de série : 01/BA/2022



Thèse de Doctorat
Pour l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
Domaine : Sciences Biologiques
Option : Biologie et Physiologie Moléculaire
Présentée et soutenu par :
LAHMADI Mohamed

THÈME

Étude du marqueur moléculaire EGFR dans le cancer broncho-pulmonaire

Soutenu le : 11/ 05/ 2022

Membres du jury :

Président :	LALAOUI Korichi	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1
Directrice de thèse :	BEDDAR Leila	Pr. Université de Constantine 3 Salah Boubnider
Co-Directrice de thèse :	SATTA Dalila	Pr. Université des Frères Mentouri Constantine 1
Examineurs :	BENDJEMANA Katia	Pr. Université Abbas Leghrour de Khenchela
	REZGOUNE Mohamed Larbi	MCA. Université des Frères Mentouri Constantine 1
	KETIT Souad	MCA. Université de Constantine 3 Salah Boubnider

Année universitaire 2021/2022

Remerciements

Je voudrais exprimer mes remerciements à tous les membres de mon jury pour avoir accepté d'examiner ma thèse.

*Au professeur **LALAOUI Korichi**, merci de me faire l'honneur de présider ce jury. Veuillez croire à l'expression de ma profonde reconnaissance et de mon grand respect.*

*Au professeur **BENDJEMANA Katia** et aux docteurs **REZGOUNE Mohamed Larbi** et **KETIT Souad** pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail. Recevez l'expression de mes plus sincères remerciements et de mon profond respect.*

*A mes directrices de thèse, le professeur **BEDDAR Leila** et le professeur **SATTA Dalila**, je vous adresse mes remerciements les plus sincères pour avoir accepté d'encadrer ce travail, pour votre aide et vos orientations pour la réalisation de cette thèse. Veuillez accepter toute ma reconnaissance.*

Merci à tous les membres de mon équipe de recherche, de laboratoires d'Histologie & Cytogénétique et de Biologie Moléculaire, au Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt).

Merci à toute l'équipe du service d'Anatomie Pathologique du CHU de Constantine qui m'a énormément aidé dans la collecte des échantillons tissulaires.

J'adresse mes remerciements aussi aux chefs des services et responsables des archives au niveau de services d'Oncologie médicale, Pneumologie et Chirurgie thoracique au CHU de Constantine qui m'ont accueilli et aidé dans la collecte des données des patients.

Un grand merci à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à l'accomplissement de cette thèse.

Dédicace

*Une chance m'a été offerte pour dédier ce travail de recherche aux personnes qui me sont chers
pour leur soutien moral et leurs encouragements permanents :*

A mes chers parents

A ma chère sœur

A mes chers frères

A toute ma famille

A mes amis et collègues de travail

SOMMAIRE

LISTE DES FIGURES

LISTE DES TABLEAUX

ABRÉVIATIONS

RÉSUMÉ

INTRODUCTION 1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Cancer broncho-pulmonaire	3
I.1. Épidémiologie	3
I.1.1. Incidence et mortalité	3
I.1.2. Survie	5
I.1.3. Dépistage	5
I.2. Étiologie et facteurs de risque	5
I.2.1. Tabagisme	5
I.2.2. Autres facteurs de risque	7
I.3. Diagnostic	9
I.3.1. Imagerie	9
I.3.2. Confirmation du diagnostic	10
I.4. Classification	10
I.4.1. Classification histologique	11
I.4.2. Stadification	17
I.5. Prise en charge thérapeutique	20
I.5.1. Thérapies anticancéreuses	20
I.5.2. Stratégies thérapeutiques	21
II. Récepteur de l'EGF dans les CBNPC	
II.1. Carcinogenèse bronchique	23
II.1.1. Caractéristiques de la tumorigenèse	23
II.1.2. Caractéristiques moléculaires du CBP	24
II.2. Récepteur de l'EGF (EGFR)	25
II.2.1. Description structurale de l'EGFR	25
II.2.2. Activation de l'EGFR	27
II.2.3. Voies de signalisations de l'EGFR	28
II.3. Altérations de l'EGFR dans les CBNPC	32
II.3.1. Surexpression de l'EGFR	33

II.3.2. Mutations de l'EGFR	34
II.4. Thérapies ciblées anti-EGFR	35
II.4.1. Inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase (EGFR-TKIs)	37
II.4.2. Anticorps monoclonaux anti-EGFR	40
II.5. Altérations de voies de signalisation de l'EGFR et thérapies ciblées	41
II.5.1. Ciblage de voie RAS	41
II.5.2. Ciblage de voie PI3K	42

CHAPITRE II : MATÉRIELS & MÉTHODES

I. Méthodologie	44
▪ Patients	45
▪ Recueil de données	45
▪ Aspects d'éthique	45
▪ Analyses statistiques	46
II. Méthodes	46
II.1. Étude épidémiologique	46
II.2. Collecte des échantillons tumoraux	46
II.3. Étude histologique	47
II.4. Étude immunohistochimique	49
II.4.1. Description de la technique	49
II.4.2. Technique immunohistochimique	50
II.5. Étude du statut mutationnel de l'EGFR	52
II.5.1. Extraction et quantification de l'ADN génomique	52
II.5.2. Détection des mutations par PCR et séquençage capillaire	55

CHAPITRE III : RÉSULTATS

I. Profil épidémiologie et clinico-pathologique du CBP	63
I.1. Sexe	63
I.2. Âge	64
I.3. Facteurs de risque	64
I.4. Signes cliniques	65
I.5. Type histologique	66
I.6. Stade tumoral	67
I.7. Données thérapeutiques	67
II. Etude du Statut EGFR dans le CBNPC	68
II.1. Caractéristiques des patients	68

II.2. Mutations du gène EGFR	69
▪ Taux de mutations du gène EGFR	69
▪ Types de mutations du gène EGFR	70
II.3. Profil clinico-pathologique des patients présentant une mutation de l'EGFR	71
▪ Histologie	71
▪ Stade tumoral	72
▪ Caractéristiques cliniques des patients	73
▪ Type d'échantillons.....	73
II.4. Statut mutationnel de l'EGFR chez les patients ayant un adénocarcinome	74
II.5. Expression de la protéine l'EGFR	75
II.6. Relations entre les mutations et l'expression de l'EGFR	77

CHAPITRE IV : DISCUSSION

I. Profil épidémiologie et clinico-pathologique du CBP	78
▪ Sexe	78
▪ Âge	79
▪ Facteurs de risque	79
▪ Type histologique	80
▪ Stade tumoral	81
II. Statut EGFR dans les patients algériens atteints de CBNPC	82
▪ Fréquence des mutations de l'EGFR	82
▪ Type des mutations de l'EGFR	84
▪ Profil clinico-pathologiques des patients présentant une mutation de l'EGFR	85
▪ Expression de la protéine EGFR	87
III. Modalités thérapeutiques	88

CONCLUSION ET PERSPECTIVES	89
---	-----------

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	91
--	-----------

ANNEXES	
----------------------	--

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Estimations de l'incidence et de la mortalité des principaux cancers dans le monde.
- Figure 2 : Taux d'incidence des cancers masculins, tous âges, en Algérie.
- Figure 3 : Classification et incidence des types histologiques du cancer broncho-pulmonaire.
- Figure 4 : Localisation et origines cellulaires des tumeurs broncho-pulmonaires.
- Figure 5 : Exemples de types et sous-types histologiques du cancer broncho-pulmonaire.
- Figure 6 : Exemples de marquage immunohistochimique dans le CBNPC.
- Figure 7 : Stadification du cancer broncho-pulmonaire (8^{ème} édition).
- Figure 8 : Caractéristiques biologiques de la cellule cancéreuse.
- Figure 9 : Représentation schématique de la structure du récepteur EGFR et ses domaines.
- Figure 10 : Représentation schématique de mécanisme d'activation de l'EGFR.
- Figure 11 : Principales voies de transduction du signal dépendant de l'EGFR.
- Figure 12 : Voie des MAPK après activation par l'EGFR.
- Figure 13 : Mutations du gène EGFR dans le CBNPC.
- Figure 14 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de l'EGFR.
- Figure 15 : Mutations de l'EGFR dans le CBNPC et ses sensibilités aux EGFR-TKIs.
- Figure 16 : Répartition des sous-types des mutations de KRAS selon le statut tabagique.
- Figure 17 : Schéma représentatif de la méthodologie adoptée pour notre étude.
- Figure 18 : Principe de la détection indirecte dans la technique immunohistochimique basée sur le polymère d'HRP/DAB.
- Figure 19 : Schéma représentatif de la méthodologie adoptée pour l'extraction et quantification d'ADN dans notre étude.
- Figure 20 : Principe du séquençage par la méthode Sanger.
- Figure 21 : Méthodologie du séquençage capillaire directe.
- Figure 22 : Electrophorèse sur gel d'agarose pour la détection des exons 19 et 21 de l'EGFR.
- Figure 23 : Répartition des patients atteints d'un CBP selon le sexe.
- Figure 24 : Distribution de la population étudiée selon l'âge.
- Figure 25 : Distribution de la population étudiée selon le statut tabagique.
- Figure 26 : Fréquence de mutations du gène EGFR dans notre population.
- Figure 27 : Exemples des mutations de l'EGFR identifiées.
- Figure 28 : Exemples de la surexpression de l'EGFR identifiée chez des cas de CBNPC.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Nouvelle classification du CBP selon l’OMS, 2015.

Tableau 2 : Marqueurs cellulaires utilisés dans l’étude immunohistochimique du CBP.

Tableau 3 : Terminologie à employer pour les petits prélèvements des CBNPC.

Tableau 4 : EGFR-TKIs de première génération.

Tableau 5 : Efficacité des EGFR-TKIs de première génération.

Tableau 6 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées.

Tableau 7 : Mélange réactionnel de PCR.

Tableau 8 : Conditions de thermocyclage pour la réaction de PCR.

Tableau 9 : Conditions de thermocyclage pour la réaction de séquençage.

Tableau 10 : Répartition des patients selon les signes cliniques.

Tableau 11 : Répartition des patients selon le type histologique.

Tableau 12 : Répartition des patients selon le stade tumoral.

Tableau 13 : Répartition des patients selon les modalités thérapeutiques.

Tableau 14 : Caractéristiques clinico-pathologiques des patients inclus dans l’étude du statut EGFR.

Tableau 15 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l’EGFR et le type histologique.

Tableau 16 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l’EGFR et le stade tumoral.

Tableau 17 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l’EGFR et les caractéristiques cliniques.

Tableau 18 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l’EGFR et le type de prélèvement.

Tableau 19 : Répartition des patients ayant un adénocarcinome présentant une mutation de l’EGFR selon le sexe et le statut tabagique.

Tableau 20 : Répartition des patients selon l’expression de l’EGFR et le type histologique.

Tableau 21 : Caractéristiques cliniques des patients selon l’expression de l’EGFR.

Tableau 22 : Répartition des patients selon les mutations et l’expression de l’EGFR.

Tableau 23 : Prévalence des mutations de l’EGFR chez les patients atteints de CBNPC dans la région MENA.

LISTE DES ABREVIATIONS

A : Adénine
Ac : Anticorps
ADK : Adénocarcinome
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : ADN complémentaire
ADP : Adénosine di-phosphate
Ag : Antigène
AKT : v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1
ALK : Anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase
AMM : Autorisation de Mise sur le Marché
ARN : Acide ribonucléique
ASCO : American Society for Clinical Oncology
ATCC : American Type Culture Collection
ATP : Adénosine tri-phosphate
BRAF : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
C : Cytosine
CBNPC : Cancer Broncho-pulmonaire Non à Petites Cellules
CBP : Cancer Broncho-Pulmonaire
CBPC : Carcinomes Broncho-pulmonaires à Petites Cellules
CE : Carcinome Epidermoïde
CGC : Carcinome à Grandes Cellules
CK : Cytokératines
CNEGC : Carcinome Neuro-Endocrine à Grandes Cellules
CRBt : Centre de Recherche en Biotechnologie
DAB : Di-Amine-Benzidine
ddNTP : Didésoxyribonucléotide
dNTP : Désoxyribonucléotide
EGF : Epidermal Growth Factor
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
EGFR-TKIs : Tyrosine Kinase Inhibitors anti-EGFR
EML4 : Echinoderm Microtubule Associated Protein Like 4
ErbB-1 : Avian erythroblastic leukemia viral (v-erbB) oncogene homolog 1
ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

ESMO : European Society for Medical Oncology
FDA : Food and Drug Administration
FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded
G : Guanine
GDP/ GTP : Guanosine Di-Phosphate / Guanosine Tri-Phosphate
H&E : Hématoxyline et Eosine
HER2 : Human Epidermol growth factor Receptor 2
IARC : International Agency for Research on Cancer
IASLC : International Association for the Study of Lung Cancer
IHC : Immunohistochimie
INCa : Institut National du Cancer
KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAPK : Mitogen-Activated Protein Kinase
mTOR : Mammalian Target of Rapamycin
N : Nombre
NGS : Next Generation Sequencing
NSCLC : Non-Small Cell Lung Cancer
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
pb : Paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PD1/PDL1 : Programmed Death-1 / Programmed death-ligand 1
PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase
PI3KCA : Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha
PKC : Protéine Kinase C
PLC γ : Phospholipase C Gamma
PTEN : Phosphatase homologue to Tensin
rpm : Rotations par minute
RAF : Rat Fibrosarcoma Virus
SCLC : Small Cell Lung Cancer
T : Thymine
TEP-FDG : Tomographie par Emission de Positrons au Fluoro-Désoxy-Glucose
Tm : Température de fusion
TNM : Tumor, Node, Metastasis
TP53 : Tumor protein 53
TTF1 : Thyroid Transcription Factor 1

RESUME

Le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est le cancer le plus fréquent chez l'homme en Algérie et représente la première cause de mortalité par cancer tous âges confondus. Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer le profil clinico-pathologique des patients atteints de CBP dans l'Est algérien et d'examiner le statut mutationnel de l'EGFR chez les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC).

Notre étude épidémiologique rétrospective a été portée sur 169 patients ayant un CBP au niveau du CHU Benbadis de Constantine, entre juin 2015 et décembre 2020. Les mutations de l'EGFR ont été analysées dans une cohorte de 58 patients atteints d'un CBNPC, en utilisant la technique du séquençage capillaire, l'expression de la protéine EGFR a été évaluée par immunohistochimie.

Notre étude a démontré que le CBP touche principalement les patients âgés de plus de 50 ans (âge médian de 61 ans), avec une prédominance chez les hommes. Le tabagisme reste le principal facteur de risque chez l'homme (78.2%). De plus, l'adénocarcinome représente le type histologique le plus fréquent avec plus de 56% des cas, suivi de carcinome épidermoïde avec 23%, tandis que 5.4% des cas ayant un CBPC. La majorité des patients (77%) ont été diagnostiqués à un stade avancé (stade III ou IV). Les mutations de l'EGFR ont été détectées dans 39.6% des cas, avec une prédominance de la mutation L858R. Ces mutations étaient plus fréquentes chez les patients porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade non métastatique, tandis qu'elles étaient indépendantes de l'âge, du genre et du statut tabagique.

Dans notre population d'étude, la majorité des patients étaient porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade avancé, avec le tabagisme comme le principal facteur de risque chez l'homme. Les patients ayant un CBNPC présentent un taux élevé de mutations de l'EGFR. Une prévention primaire s'appuyant principalement sur l'application des politiques de lutte contre le tabagisme et l'accès aux thérapies ciblées anti-EGFR constituent une meilleure stratégie pour réduire la morbidité et la mortalité du CBP.

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, Profil clinico-pathologique, EGFR, Mutations, Algérie.

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le cancer broncho-pulmonaire est le cancer le plus fréquent dans le monde et la première cause de mortalité liée aux cancers. Environ 80 % des cancers broncho-pulmonaires sont diagnostiqués à un stade localement avancé ou métastatique. Aussi, son pronostic reste sombre avec une survie à cinq ans de 10% à 20%, tous stades confondus. L'Algérie a compté plus de 4700 nouveaux cas du cancer broncho-pulmonaire en 2020. Il reste le cancer le plus prévalent chez l'homme et représente la première cause de mortalité par cancer, tous âges confondus (Globocan, 2020).

La classification des cancers broncho-pulmonaires a été progressivement modifiée. Elle intègre des données génétiques et cliniques pertinentes (OMS, 2015). La prise en charge du cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC) a été révolutionnée ces dernières années par la découverte d'altérations moléculaires potentiellement actionnables par des thérapies ciblées. Ces nouvelles thérapies améliorent significativement la qualité et la durée de survie des patients qui peuvent en bénéficier. Les altérations moléculaires rencontrées le plus souvent dans le CBNPC sont principalement, par rapport à leurs fréquences, les mutations des gènes EGFR et KRAS et les réarrangements chromosomiques de l'ALK (Levy et *al*, 2012).

L'activation de l'EGFR, soit par une mutation et/ou par une surexpression, est présente dans plus de 60% des cas de CBNPC, ce qui a conduit au développement de traitements ciblant ce récepteur. L'émergence des inhibiteurs de l'activité de tyrosine kinase anti-EGFR a constitué un réel progrès thérapeutique chez les patients porteurs d'une mutation activatrice de l'EGFR, pour lesquels ils sont actuellement utilisés en première ligne de traitement (Ruppert et *al*, 2011).

Plusieurs études ont montré que les mutations activatrices de l'EGFR dans le CBNPC sont plus fréquentes chez les patients atteints d'un adénocarcinome, les femmes et les non-fumeurs. De plus, selon les populations étudiées, l'incidence de ces mutations a d'importantes variations suivant les origines géographiques et/ou ethniques. Elles représentent environ 10% à 20% chez les patients Caucasiens et 40% à 50% chez les patients asiatiques. Peu de données sur le statut mutationnel de l'EGFR sont disponibles concernant les populations dans les autres régions, incluant la région de l'Afrique du Nord dont l'Algérie fait partie.

▪ **Objectif principal**

Notre étude vise à étudier le statut mutationnel de l'EGFR chez les patients atteints de CBNPC dans l'Est algérien.

▪ **Objectifs secondaires**

- Décrire les caractéristiques épidémiologiques et clinico-pathologiques de patients atteints de cancer broncho-pulmonaire ;
- Étudier la fréquence et les types de mutations de l'EGFR dans le CBNPC et évaluer l'expression protéique de l'EGFR ;
- Analyser l'association entre la présence des mutations de l'EGFR et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients.

CHAPITRE I
SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I. CANCER BRONCHO-PULMONAIRE

I.1. Épidémiologie

I.1.1. Incidence et mortalité

Selon la base de données Globocan de l'IARC (*International Agency for Research on Cancer*), le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est le cancer le plus répandu chez l'homme de par le monde, avec plus de 2,2 millions de nouveaux cas en 2020, ce que représente environ 11,4% des cas diagnostiqués (Figure 1) dont 1,4 million nouveaux cas chez l'homme et 770 000 nouveaux cas chez la femme.

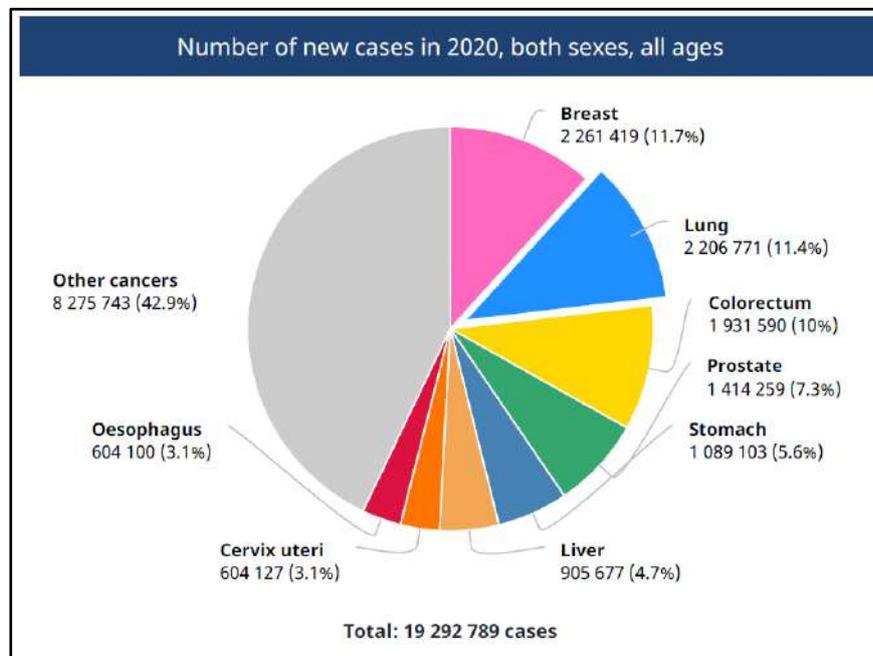


Figure 1 : Estimations de l'incidence des cancers dans le monde (Globocan, 2020).

Il représente la première cause de mortalité par cancer (Figure 2), avec près de 1,8 million de décès, soit environ 18% des cas (Sung et *al.*, 2021).

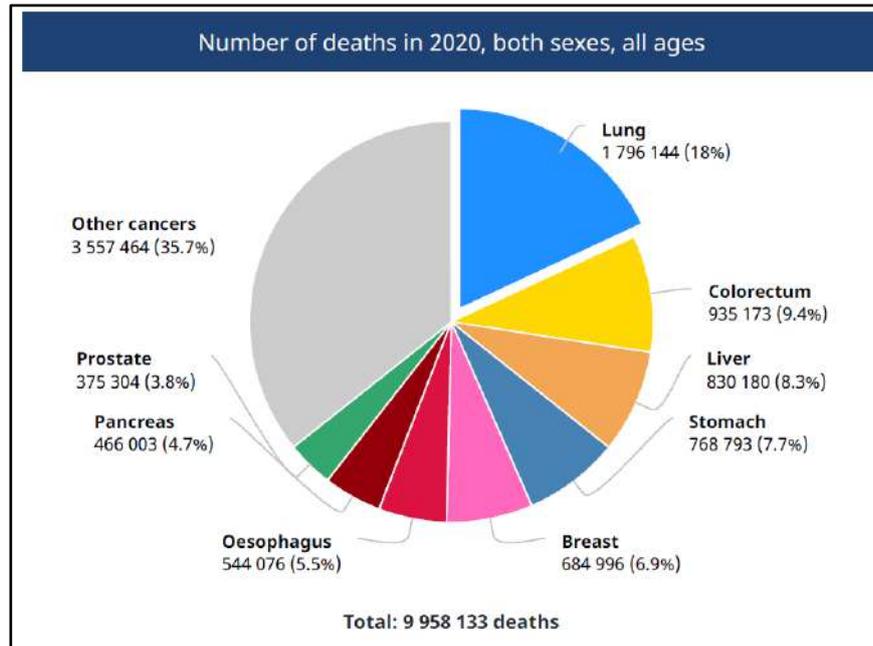


Figure 2 : Estimations de la mortalité des cancers dans le monde (Globocan, 2020).

En Algérie, 4 774 nouveaux cas du CBP ont été enregistrés en 2020, dont 4159 nouveaux cas chez l’homme, soit 87%, et 615 chez la femme, soit 13%. Il reste le cancer le plus fréquent chez l’homme (tous âges), représentant environ 15.2% des cancers masculins (Figure 3). Il représente la première cause de mortalité par cancer, tous âges confondus, avec un taux de mortalité estimé de 13.2% des cas (Globocan, 2020).

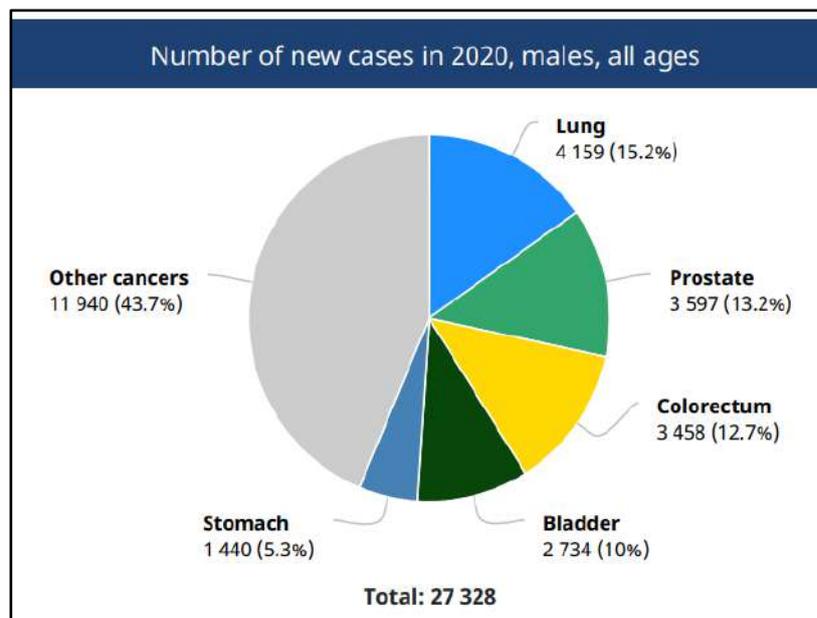


Figure 3 : Taux d'incidence des cancers masculins en Algérie (Globocan, 2020).

I.1.2. Survie

Le taux de survie des patients atteints de cancer broncho-pulmonaire observé reste modeste dans la plupart des pays. La survie à cinq ans, tous stades confondus, varie entre 10% et 20%. Elle est estimée à 25% dans le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules et à 7% dans le cancer broncho-pulmonaire à petites cellules (CBNPC). Cela peut être expliqué par le retard du diagnostic, la majorité des patients ayant au moment du diagnostic une maladie localement avancée (stades IIIA ou IIIB, dans environ 30%) ou métastatique (stade IV, dans environ 40-50%) (ASCO, 2021).

I.1.3. Dépistage

Il n'existe aucune méthode reconnue pour le dépistage du CBP. La radiographie pulmonaire et l'examen cytologique des expectorations ont fait l'objet de nombreuses études dont aucune n'a démontré de réduction de la mortalité spécifique. Néanmoins, des études randomisées ont démontré l'effet significatif du dépistage annuel par scanner faiblement dosé chez les grands fumeurs ou les grands ex-fumeurs, diminuant le taux de mortalité (Denise et *al*, 2019 ; Pastorino et *al*, 2019 ; de Koning et *al*, 2020).

I.2. Étiologie et Facteurs de risque

I.2.1. Tabagisme

- **Tabagisme actif :**

Le lien direct entre le CBP et le tabagisme et a été démontré depuis les années cinquante. Des études britanniques, réalisées dans les années 1950, ont démontré la relation entre le tabagisme et la survenue du CBP (Doll et Hill, 1950). Les fumeurs actifs ont un risque 10 à 15 fois plus élevé de développer un CBP. Il semble que la durée pendant laquelle on fume est plus importante que la quantité de cigarettes fumées (LeFaou, 2005).

Il y a près de 80 produits chimiques identifiés dans la fumée de cigarette sont considérés comme des carcinogènes par l'IARC (Wang, 2015). Parmi ces agents carcinogènes : les hydrocarbures aromatiques polycycliques, les amines aromatiques, des nitrosamines spécifiques du tabac et des carcinogènes volatils tels que le formaldéhyde, l'acétaldéhyde, le 1,3-butadiène et le benzène, ainsi que divers métaux (Sakhri et Bertocchib, 2019).

De multiples publications ont permis de montrer que l'exposition aux carcinogènes de la fumée de cigarette induisait des altérations de l'ADN cellulaire (Greenman et *al*, 2006 ; Ding et *al*, 2008 ; Marchand et *al*, 2008 ; Pleasance et *al*, 2010). Si les adduits à l'ADN produits par les substances cancérigènes de fumée de tabac et leurs métabolites échappent aux systèmes de réparation, ils peuvent causer un mauvais codage lors de la réplication de l'ADN cela peut entraîner une mutation permanente de la séquence d'ADN. Si cette mutation survient dans une section importante d'un oncogène cellulaire tel que KRAS, ou dans un gène suppresseur de tumeur tel que TP53, le résultat peut être une altération des mécanismes de contrôle de la croissance normale. De plus, certains constituants de la fumée du tabac ou leurs métabolites peuvent se lier directement aux récepteurs cellulaires, entraînant l'activation de protéines kinase, de récepteurs de croissance et d'autres voies pouvant contribuer à la carcinogenèse. D'autres substances peuvent induire une inflammation avec une prolifération accrue des pneumocytes, l'activation du NF-kappaB et la promotion des tumeurs (Takahashi et *al*, 2010 ; Chen et *al*, 2011).

En matière d'impact du tabagisme sur l'histologie du CBP, la consommation du tabac est fortement associée avec le carcinome épidermoïde et le carcinome à petites cellules. Cependant, le taux d'incidence de l'adénocarcinome a augmenté lors des dernières décennies, cela pourrait être expliqué par l'évolution de la fabrication des cigarettes manufacturées (cigarettes avec filtre ou légères) qui a été à l'origine d'une augmentation du dépôt des substances carcinogènes dans les régions alvéolaires contribuant à l'augmentation du risque d'adénocarcinome (Sakhri et Bertocchib, 2019).

- **Tabagisme passif :**

Le tabagisme passif est un facteur de risque important du CBP. Il se définit comme l'exposition à la fumée du tabac dégagée par un fumeur ou dans l'environnement. Il est aujourd'hui estimé que le tabagisme passif est responsable d'environ 20% des CBP.

En 1984, le tabagisme environnemental a été classé comme carcinogène par l'EPA (*US Environmental Protection Agency*). Des études épidémiologiques ont noté une élévation significative du risque de mortalité par le CBP lors de l'exposition à la fumée du tabac sur le lieu de travail et/ou au domicile. Une méta-analyse a estimé à 25 % le risque accru de CBP chez les femmes non fumeuses soumises à un tabagisme environnemental (Boffetta, 2002). De même, cette relation a été confirmée par une autre méta-analyse qui a montré

que le tabagisme lié au conjoint augmente le risque de développer un CBP d'environ 20% chez les femmes et 30% chez les hommes (IARC, 2004).

I.2.2. Autres facteurs de risque

▪ **Cannabis** :

La fumée de cannabis contient quatre fois plus de goudrons que celle du tabac et renferme davantage de cancérigènes. De plus, le principe actif du cannabis, le THC (Tétrahydrocannabinol), dilate les bronches, ce qui facilite la pénétration de la fumée et de ses toxiques. (Lemarié, 2011).

▪ **Facteurs environnementaux et professionnels** :

L'IARC a classé un certain nombre de nuisances (substances, mélanges ou circonstances d'exposition) comme des cancérigènes en 3 groupes :

- Le groupe 1 « cancérigènes prédisposant au cancer du poumon » : le radon, l'amiante, l'arsenic, le béryllium, le bis(chlorométhyle), le cadmium, le chrome, le nickel, le chlorure de vinyle et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP).
- Le groupe 2A « cancérigènes probables » : l'acrylonitrile, le formaldéhyde et les gaz d'échappement des moteurs diesel.
- Le groupe 2B « cancérigènes potentiels » : l'acétaldéhyde, la silice et les fumées de soudage.

➤ **Facteurs environnementaux** :

Le radon est le premier carcinogène domestique, à l'origine de pollution intérieure (Gray et al, 2009). Il remonte du sol, dans les maisons, au travers des fondations. Le radon a été classé cancérigène avéré en 1987 et considéré comme la deuxième cause de CBP, responsable d'environ 10% des cas en Europe (IARC, 2018).

La pollution atmosphérique par la présence des carcinogènes est également incriminée en milieu urbain. La relation entre l'urbanisation et la mortalité par CBP a été précisée (Vineis et al, 2004). Ces carcinogènes sont principalement les HPA générés majoritairement de la combustion de fuels fossiles utilisés pour le chauffage et les transports, les métaux tels que le nickel, l'arsenic, le chrome, la fumée toxique dégagée par

les usines, le radon et les produits de combustion de tabac (Pope et *al.* 1995 ; Pope et *al.*, 2002). La pollution atmosphérique est estimée responsable de 4% de l'ensemble des nouveaux cas (Turner et *al.*, 2020).

➤ Facteurs professionnels :

Les cancers d'origine professionnelle sont dus principalement à l'amiante, à l'arsenic, au chrome, au nickel, au diesel, aux dichlorométhyle éthers, aux HAP et à la silice. Plusieurs études de cas-témoins ont montré que 9% à 15 % de CBP sont causés par une exposition professionnelle aux facteurs carcinogènes (Steenland et *al.*, 1996).

L'amiante est un cancérigène bronchique bien connu. On estime que 20% à 40 % des travailleurs dans le monde ont été exposés à des fibres d'amiante dans leur vie professionnelle. La survenue de CBP est caractérisée par une longue période de latence, de l'ordre de 20 ans, corrélée à l'intensité de l'exposition (Lemen et *al.*, 1980). L'exposition à l'amiante et le tabagisme sont deux carcinogènes bronchiques synergiques. La fumée de tabac pourrait augmenter la rétention pulmonaire des fibres d'amiante (Quoix et Lemarié, 2011).

L'arsenic est susceptible de contaminer les eaux souterraines, notamment dans les pays à faible revenu. Il entraîne des désordres cutanés et la survenue différents cancers dont le CBP par l'inhalation de vapeurs d'eau contaminée, mais aussi par l'inhalation de pesticides ou le traitement du bois (Lemarié, 2011). D'autres études ont montré un risque accru de CBP en cas d'exposition à la silice (OR: 1,6 [1.2-2.3]), au nickel (OR: 2,5 [1.3-4.7]), au chrome VI (OR: 2,4 [1.2-4.8]), au cadmium (OR: 4,7 [1.5-14.3]) et aux vapeurs diesel (Beveridge et *al.*, 2010 ; Vida et *al.*, 2010 ; Gamble et *al.*, 2012).

▪ Affection pulmonaire :

Les personnes atteintes ou ayant des antécédents d'une affection respiratoire risquent davantage de développer un CBP (Schabath et Cote, 2019). La plus fréquente est la broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), qui comprend la bronchite chronique et l'emphysème. Cependant, le tabagisme est la cause principale de la BPCO (MacNee, 2005), il est prévu qu'il y a une association positive entre la maladie sous-jacente BPCO et le CBP. Des méta-analyses publiées ont reporté une augmentation significative du risque de CBP (2 à 3 fois) chez les patients ayant des antécédents de

BPCO incluant l'emphysème et bronchite chronique (Brenner et *al*, 2011 ; Wang et *al*, 2012 ; Zhang et *al*, 2017).

Les maladies fibrosantes et les cicatrices pulmonaires exposent le patient aussi à un risque accru de CBP telles que la silicose fibreuse et la béryllose pulmonaires qui sont causées par l'inhalation de poussières de silice et de vapeurs contenant du béryllium, respectivement. De plus, plusieurs études ont révélé l'association entre l'asthme et le CBP. Une méta-analyse portée sur 18 études (16 millions cas) a trouvé une augmentation significative de 44% du risque de CBP (Qu et *al*, 2017). Cela peut être expliqué par le dysfonctionnement mucociliaire entraînant l'accumulation d'agents toxiques, l'inflammation chronique et la lésion de l'ADN par les radicaux libres (Santillan et *al*. 2003).

I.3. Diagnostic

I.3.1. Imagerie

Devant une suspicion clinique de CBP, une imagerie doit être réalisée en première intention. Une radiographie du thorax est la première étape. Ses performances sont limitées, son intérêt étant d'être facile d'accès, permettant une première orientation rapide. Toute image suspecte doit amener à la réalisation d'un scanner thoracique dans les plus brefs délais. Un scanner thoracique avec produit d'injection doit compléter l'exploration. En cas de forte suspicion, des coupes abdominales supérieures entrant dans le cadre du bilan d'extension seront réalisées dans le même temps.

D'autres types d'imagerie telles que TEP-TDM (Tomographie par Emission de Positons/ Tomodensitométrie) et l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ne se conçoivent que dans un deuxième temps, chez un patient potentiellement éligible à un traitement curatif. Généralement, elles sont indiquées comme examen d'un bilan d'extension, en vue de préciser la taille et l'extension locorégionale de la tumeur et la présence de métastases ganglionnaires, thoraciques ou extrathoraciques (HAS, 2013). La TEP est une technique d'imagerie moléculaire et métabolique, en utilisant le [18F]-fluorodésoxy-glucose (FDG) qui est un analogue du glucose marqué par un émetteur de positons (Fletcher et *al*, 2008). La TEP-FDG tient une place prépondérante dans la prise en charge des patients atteints de CBP. Cet examen est standard pour le diagnostic de malignité d'un nodule pulmonaire et

le bilan d'extension initial locorégional et à distance. Il peut être une option pour le diagnostic différentiel entre récurrence et remaniements post-thérapeutiques et pour optimiser la définition des volumes irradiés en complément de la TDM (Colavolpe et *al*, 2012).

I.3.2. Confirmation du diagnostic

Le diagnostic du CBP repose sur l'examen anatomopathologique. Les prélèvements sont réalisés à partir de la tumeur et/ou des adénopathies associées, d'un site métastatique accessible ou encore d'un épanchement pleural. Le compte rendu anatomopathologique doit contenir des données pour préciser notamment le type et le sous-type histologique de la tumeur (HAS, 2013).

La classification histologique d'un CBP permet de déterminer le type de cancer en fonction de sa morphologie et son évolution. Cette classification joue un rôle important dans le choix thérapeutique.

I.4. Classification

I.4.1. Classification histologique

Le CBP est classé en deux formes majeures corrélées à la clinique :

- le cancer broncho-pulmonaire à petites cellules (CBPC)
- le cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC).

Le CBPC et le CBNPC représentent environ 15% et 80% du CBP, respectivement (Herbst, 2008).

La figure 4 présente les différents sous-types histologiques du CBP et ses taux d'incidence.

La figure 5 indique les localisations et les origines cellulaires de ces tumeurs.

La figure 6 présente des exemples des coupes histologiques (colorés par l'hématoxyline et l'éosine) des différents sous-types histologiques.

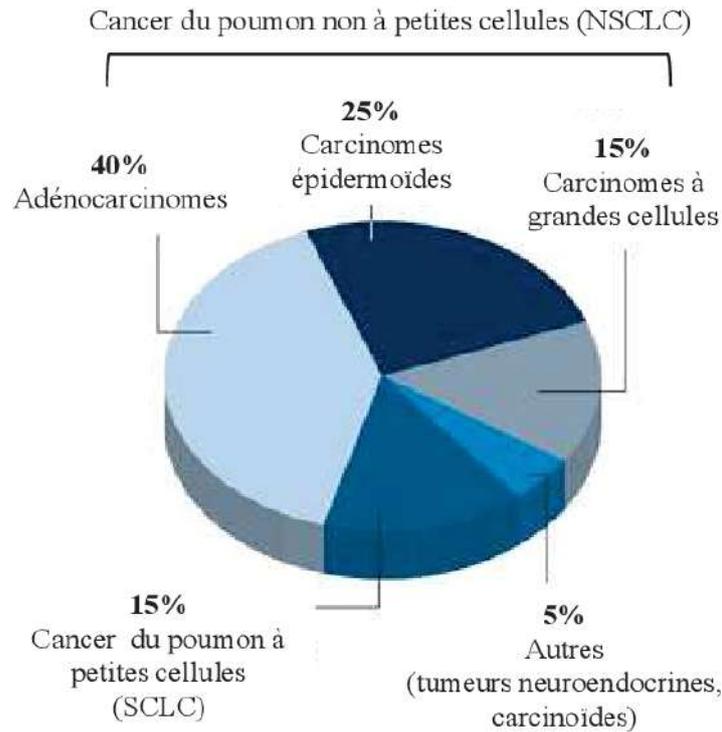


Figure 4 : Classification histologique et incidences du CBP (d'après Beganton, 2017).

- **Cancer broncho-pulmonaire à petites-cellules (CBPC)**

Les CBPC sont des tumeurs malignes épithéliales d'origine neuroendocrine qui se développent à partir de cellules neuroendocrines présentes dans les voies aériennes les plus grandes. Ce type est très agressif avec un temps de doublement extrêmement rapide avec un pouvoir métastatique très important et par conséquent il a un très mauvais pronostic (survie médiane de 2 à 4 mois sans traitement). Le tabac est la principale cause de développement du CBPC. Dans 98% des cas, les patients qui développent ce type de cancer sont des fumeurs (Yokota, 2010 ; Van Meerbeeck, 2011).

- **Cancer broncho-pulmonaire non à petites-cellules (CBNPC)**

Les CBNPC comportent essentiellement trois sous-groupes histologiques en fonction du type de cellules concernées (Travis, 2011) :

- Adénocarcinomes :

Il s'agit du type histologique le plus fréquent parmi les cancers broncho-pulmonaires, représentant 40% à 50% des CBNPC. Ils sont souvent situés en périphérie du poumon et se

développent à partir des pneumocytes de type II, les cellules Clara ou les cellules souches broncho-alvéolaires dans des nodules périphériques.

➤ Carcinomes épidermoïdes (Malpighiens ou Squameux) :

Il représente le deuxième type histologique le plus fréquent, avec des taux variant de 25% à 30% des CBNPC, et sont des tumeurs centrales de la trachée et des grosses bronches. Ils se développent dans la plupart des cas à partir des cellules basales dans de grosses bronches au centre du poumon.

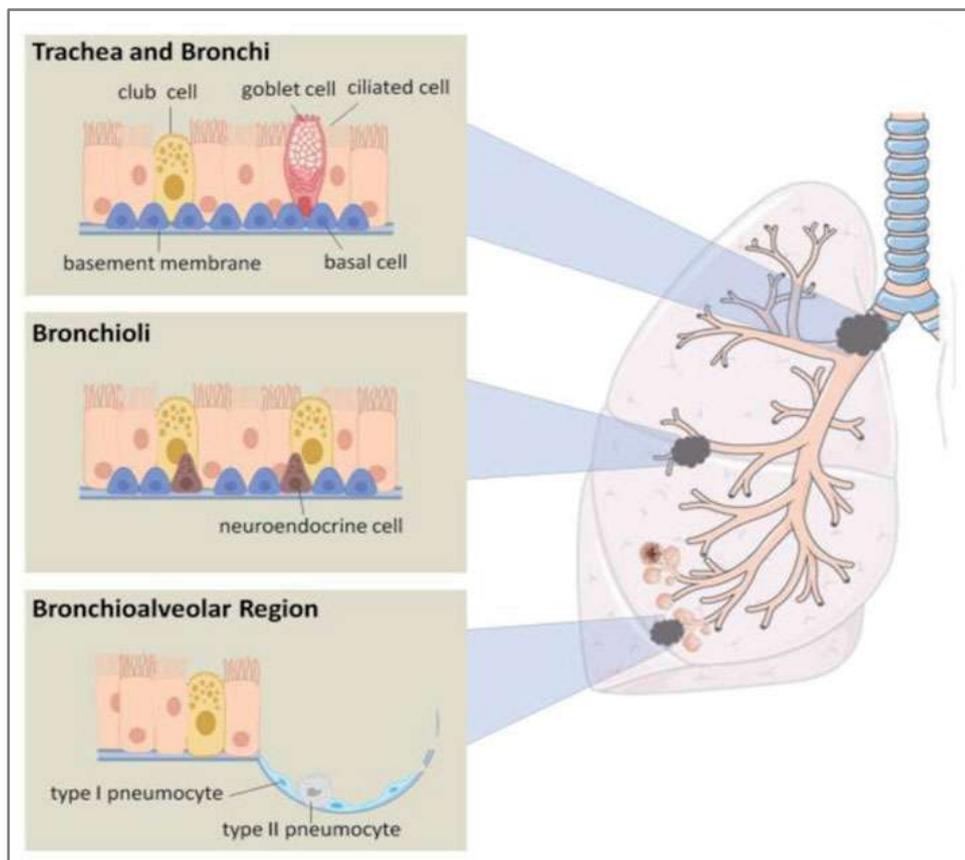


Figure 5 : Localisation et origines cellulaires des tumeurs broncho-pulmonaires (d'après Barros-Filho et *al*, 2019).

➤ Carcinomes à grandes cellules :

Ils représentent la forme la moins répandue parmi les CBNPC (environ 10% à 15%). Il s'agit d'un carcinome indifférencié qui ne présente aucun caractère de différenciation

épidermoïde, glandulaire ou neuroendocrine. Ces tumeurs sont plus généralement situées dans le parenchyme pulmonaire.

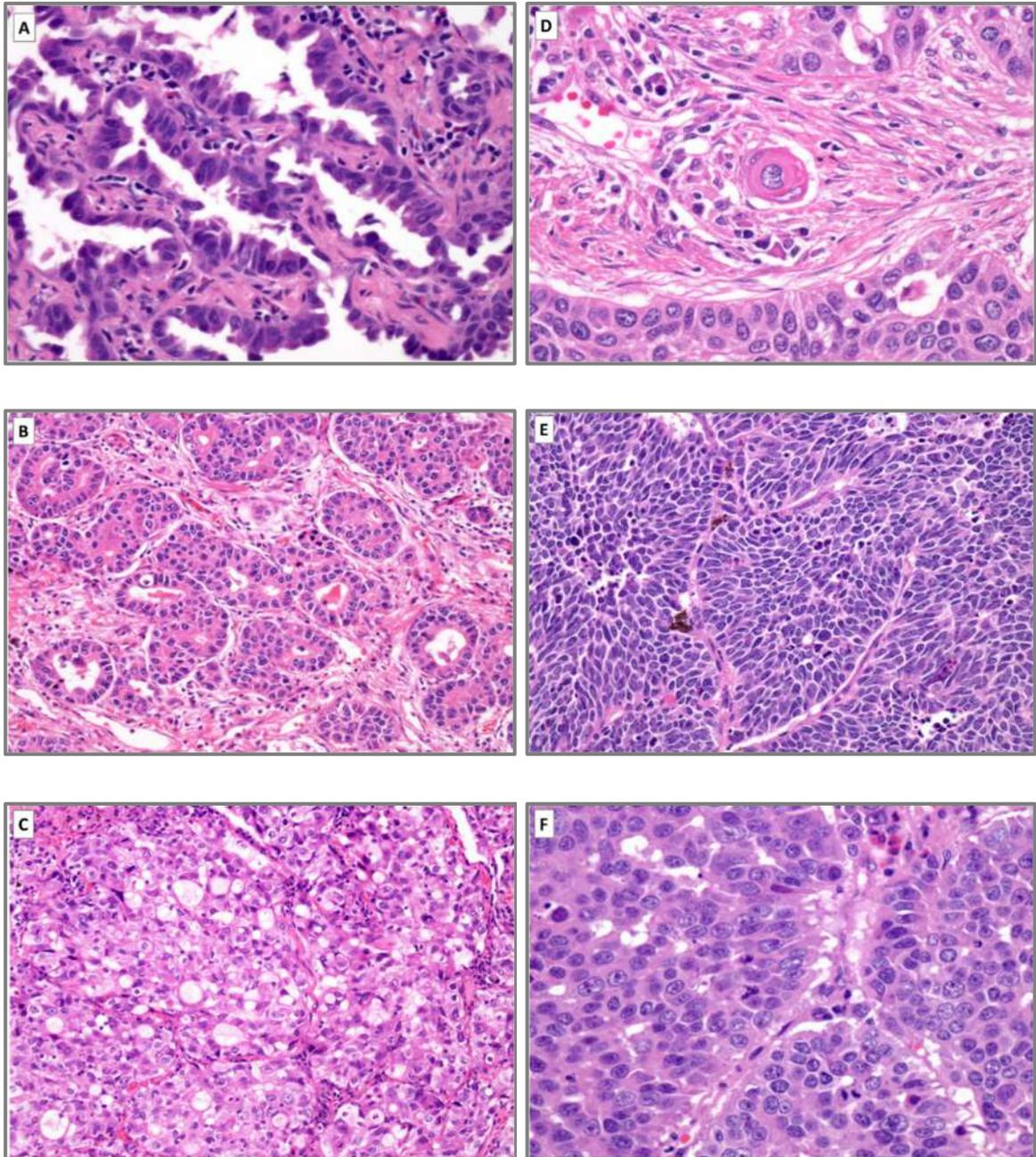


Figure 6 : Exemples des coupes histologiques de sous-types histologiques du CBP (www.webpathology.com). A) Adenocarcinome lépidique, B) Adenocarcinome acinaire, C) Adenocarcinome solide, D) Carcinome épidermoïde bien différencié, E) Carcinome à petites cellules, F) Carcinome neuroendocrine à grandes cellules.

▪ **Nouvelle classification de l'OMS (2015)**

Les modifications les plus marquantes de la classification de 2015 sont d'une part qu'elle est basée sur des études multidisciplinaires intégrant des données cliniques radiologiques, mais aussi génétiques et moléculaires et d'autre part qu'elle fournit des recommandations sur les diagnostics et les terminologies à employer sur les petits prélèvements, alors que la précédente classification ne s'appliquait qu'aux résections chirurgicales.

Cette nouvelle classification apporte également des modifications majeures concernant les adénocarcinomes, qui ont été divisés en différents sous-types en fonction de leur architecture prédominante d'après Travis et *al.* (2011).

En ce qui concerne les autres types de CBP, les modifications principales viennent du reclassement des carcinomes épidermoïdes et des tumeurs neuroendocrines et dénombremens nécessaires de la catégorie des carcinomes à grandes cellules (Lantuejoul et *al.*, 2014).

Deux groupes histologiques du CBP peuvent être distingués selon cette classification :

- Les CBNPC qui comprennent :
 - l'adénocarcinome,
 - le carcinome épidermoïde,
 - le carcinome à grandes cellules,
 - le carcinome sarcomatoïde,
 - le carcinome indifférencié.
- Les tumeurs neuroendocrines qui comprennent :
 - le CBPC,
 - le carcinome neuroendocrine à grandes cellules,
 - les tumeurs carcinoïdes.
- D'autres types rares.

Le Tableau 1 récapitule les différents types et sous-types du CBP selon la classification de l'OMS mise à jour en 2015.

Tableau 1 : Nouvelle classification du CBP selon l’OMS, 2015 (d’après Zheng, 2016).

Type histologique	Sous-type histologique
Adenocarcinome (ADK)	<ul style="list-style-type: none"> • Adénocarcinome <i>in situ</i> ou à invasion minime (mucineux/non-mucineux) • ADK lépidique • ADK acinaire • ADK papillaire • ADK micro-papillaire • ADK solide • ADK invasifs (selon architecture prédominante) • Autres formes invasives : mucineux, colloïde, fœtal, entérique.
Carcinome squameux ou épidermoïde (CE)	<ul style="list-style-type: none"> • Kératinisant • Non-kératinisant • Basaloïde
Carcinomes à grandes cellules (CGC)	<ul style="list-style-type: none"> • Indifférenciée
Tumeurs neuroendocriniennes	<ul style="list-style-type: none"> • Haut grade <ul style="list-style-type: none"> - Carcinome à petites cellules (CBPC) - Carcinome neuroendocrine à grandes cellules (CNEGC) • Bas grade : <ul style="list-style-type: none"> - Carcinoïdes atypiques - Carcinoïdes typiques
Autres	<ul style="list-style-type: none"> • Carcinome adénoquameux • Carcinomes sarcomatoïdes : <ul style="list-style-type: none"> - Carcinosarcome ; - Carcinome pléomorphe, Carcinome à cellules géantes, Carcinomes cellules fusiformes ; • Blastome. • Autres formes rares

➤ Caractéristiques immunohistochimiques (IHC) :

Le diagnostic histologique est porté sur des caractéristiques morphologiques, mais également sur des critères immunohistochimiques. Deux situations peuvent se présenter dans l'analyse histopathologique : soit la morphologie est évidente, permettant de distinguer le type histologique ; soit une étude immunohistochimique doit être effectuée avec un panel restreint d'anticorps pour confirmer le diagnostic (Cucherousset, 2014).

Des exemples de marqueurs immunohistochimique qui peuvent aider au diagnostic différentiel sont présentés dans le tableau 2 et la figure 7.

Tableau 2 : Marqueurs cellulaires utilisés dans l'étude immunohistochimique du CBP.

Type histologique	Marqueurs IHC
Adénocarcinome	TTF1, Napsin-A, Cytokératine 7
Carcinome épidermoïde	P40, P63, Cytokératine 5/6
Tumeurs neuroendocriniennes	Chromogranine-A, Synaptophysine, CD56, TTF-1, AE1/AE3

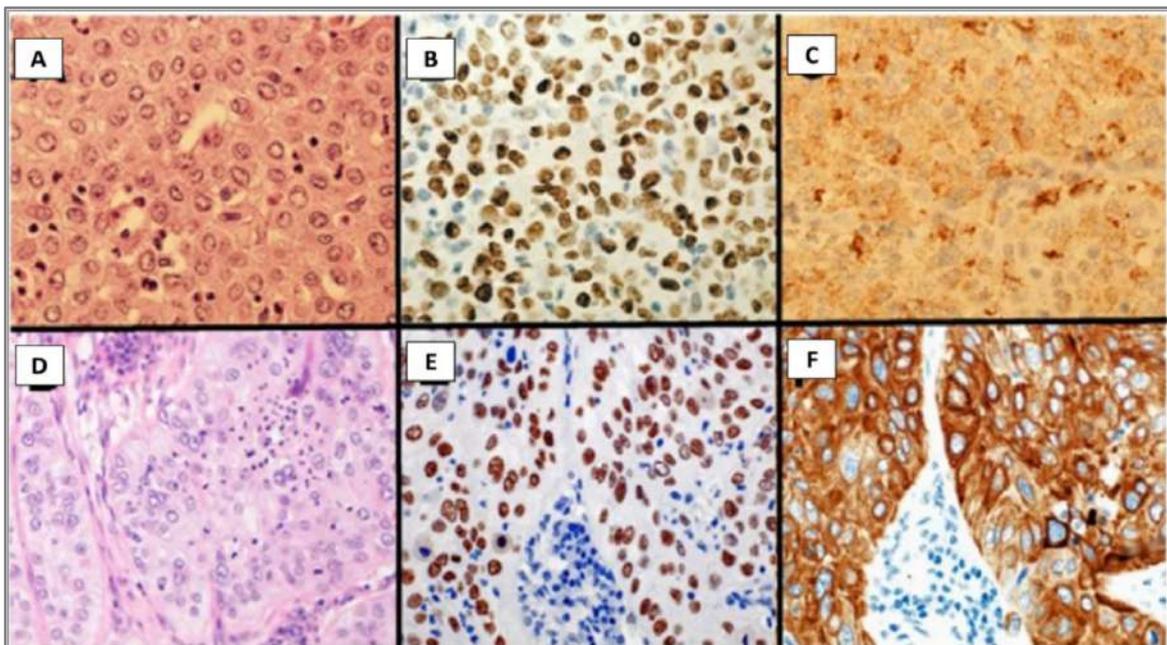


Figure 7 : Exemples de marquage immunohistochimique dans le CBNPC (d'après Inamura, 2017). [A–C] Adénocarcinome solide : A) H&E ; B) IHC+ TTF1 ; C) IHC+ Napsin-A. [D–F] Carcinome épidermoïde non-kératinisant : D) H&E ; E) IHC+ p40 ; F) IHC+ CK5/6.

➤ Classification des micro-prélèvements :

L'immunohistochimie est particulièrement recommandée sur prélèvements de petite taille « biopsies ou prélèvements cytologiques » lorsque les ponts d'union ou la kératinisation ne sont pas évidents pour faire la preuve d'une différenciation malpighienne. Elle doit être limitée cependant pour épargner le matériel si des analyses de biologie moléculaire sont faites en aval. Trois éléments essentiels guident le pathologiste : 1) l'étude morphologique sur lame colorée par l'hématoxyline et l'éosine (H&E) est la première approche permettant d'orienter le diagnostic, 2) les colorations spéciales des mucines orientent vers un adénocarcinome, 3) l'immunohistochimie avec un panel d'anticorps (Cucherousset, 2014).

La terminologie utilisée dans le diagnostic de CBNPC sur petits prélèvements est figurée dans le tableau ci-dessous.

Tableau 3 : Terminologie à employer pour les petits prélèvements du CBNPC.

Terminologie	Marqueurs IHC
CBNPC, en faveur d'un adénocarcinome	TTF1 (+), P63/P40 (-)
CBNPC, en faveur d'un carcinome épidermoïde	TTF1 (-), P63/P40 (+)
CBNPC, NOS (<i>Not-Otherwise Specified</i>)	TTF1 (-), P63/P40 (-)
CBNPC, en faveur d'un carcinome adénoquameux ou d'un adénocarcinome	TTF1 (+), P63 / P40 (+)

I.4.2. Stadification

▪ **Classification TNM**

La classification TNM est recommandée par l'IASLC qui a établi la dernière classification (huitième édition) des CBP en 2014 (*Annexe F*). Les trois éléments pris en compte sont :

- T (*Tumor*) : Taille et/ou extension de la Tumeur primitive (Tx, T1 – T4) ;
- N (*Node*) : Présence de métastase ganglionnaire (Nx, N0 – N3) ;
- M (*Metastasis*) : Présence de Métastase à distance (M0, M1a – c).

La classification TNM peut être divisée en deux catégories :

➤ La classification TNM clinique :

Elle est basée sur toutes les données disponibles avant tout traitement telles que données cliniques, imagerie et analyses de biopsies. L'orientation du choix thérapeutique est basée sur cette classification.

➤ La classification TNM pathologique (pTNM) :

Elle est basée sur un examen anatomopathologique de résection chirurgicale broncho-pulmonaire, intervenant après le diagnostic histologique. Elle peut aider à adapter le choix de traitement et permet de préciser le pronostic.

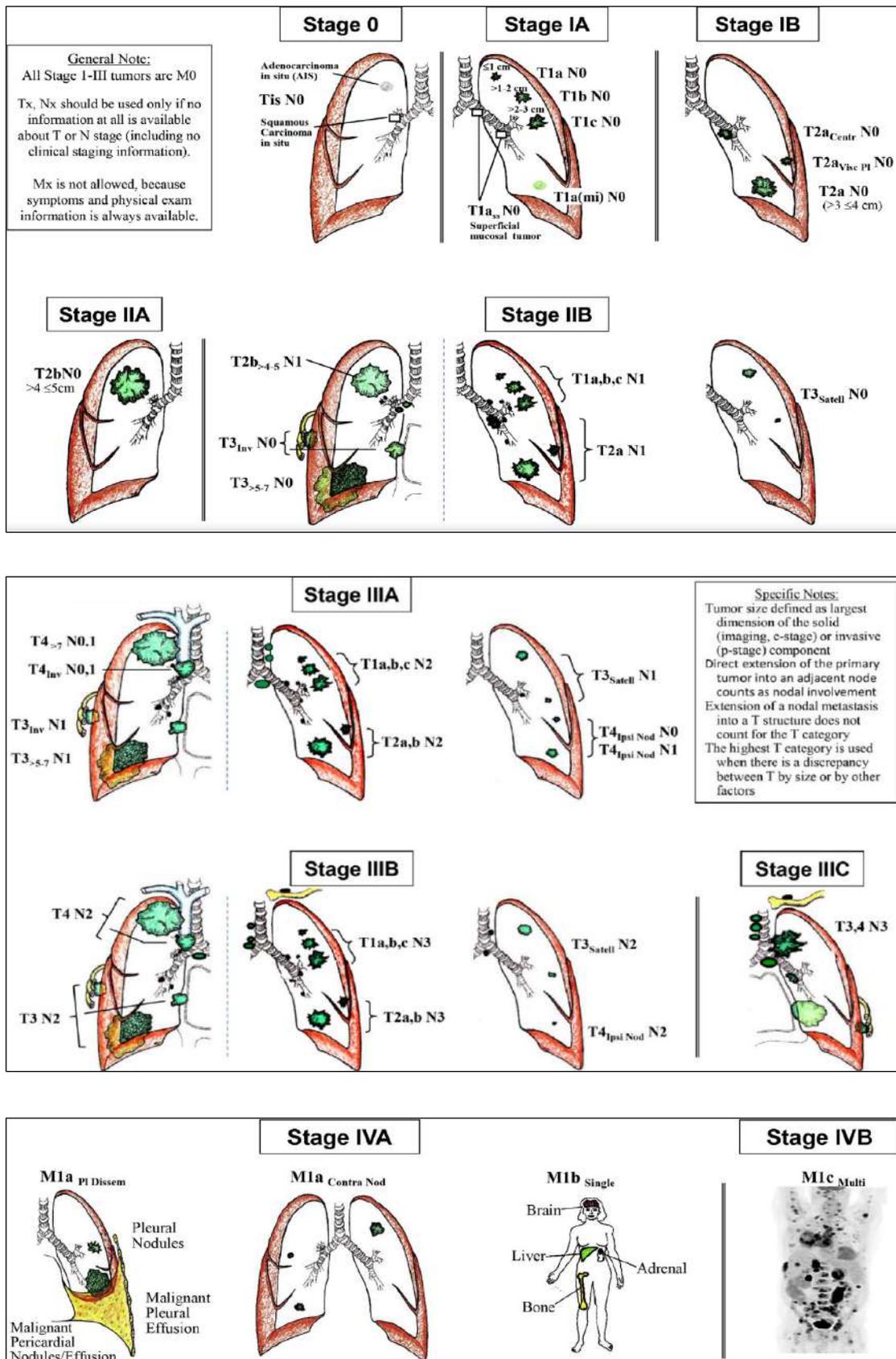
▪ **Stades tumoraux**

La détermination du stade tumoral permet d'évaluer le pronostic et de guider le choix thérapeutique. Les descripteurs T, N et M ont été regroupés en différents stades de pronostics équivalents (Goldstraw et al, 2016). Le regroupement par stades est résumé dans la figure 8.

Les stades tumoraux sont classés de I à IV :

- Stade 0 : Cancer *in situ* non invasif ;
- Stade I : Invasion très localisée, sans métastases à distance ;
- Stade II : Extension limitée localement et /ou atteinte ganglionnaire satellite minime ;
- Stade III : Atteinte locale importante et/ou atteinte ganglionnaire satellite majeure ;
- Stade IV : Tumeur avec métastase.

Un nouveau comité a été nommé par l'IASLC en vue d'élaborer des propositions pour la neuvième classification. La nouvelle base de données devra intégrer la classification de l'OMS de 2015, les recommandations de l'IASLC pour les tumeurs en verre dépoli et les tumeurs multiples, ainsi que les résultats de biologie moléculaire (Berghmans et al, 2019).



I.5. Prise en charge thérapeutique

I.5.1. Thérapies anticancéreuses

- **Chirurgie**

La chirurgie du cancer du poumon a pour objectif d'enlever la tumeur dans son intégralité. L'intervention est associée à un curage ganglionnaire, qui consiste à retirer les ganglions lymphatiques qui drainent la zone où se situent les poumons. La chirurgie peut aussi être utilisée pour traiter certains symptômes générés par la maladie.

- **Radiothérapie**

La radiothérapie est un traitement locorégional des cancers, qui utilise des rayonnements ionisants pour détruire les cellules tumorales en les empêchant de se multiplier. Ces rayonnements sont dirigés avec précision, sous forme de faisceaux, sur la zone à traiter. Ils visent, à travers la peau, soit la tumeur et les ganglions lymphatiques voisins, soit le lit tumoral, soit des métastases. La radiothérapie a pour but de détruire les cellules cancéreuses tout en préservant le mieux possible les tissus sains et les organes avoisinants.

- **Traitements médicamenteux**

Plusieurs types de traitements médicamenteux sont utilisés pour traiter les cancers du poumon : des médicaments de chimiothérapie conventionnelle, des thérapies ciblées, ainsi que des molécules d'immunothérapie spécifique (INCa, 2017).

- **Chimiothérapie** :

Les médicaments de chimiothérapie conventionnelle agissent principalement sur les mécanismes de la division des cellules. Ces agents cytotoxiques sont le plus souvent des sels de platine tels que le Cisplatine et dans une moindre mesure le Carboplatine. Ces deux agents alkylants induisent un blocage de la réplication de l'ADN par la formation de liaisons covalentes entre les bases guanine de l'ADN qui l'empêchent ainsi de se dérouler. Les sels de platine, Cisplatine et Carboplatine, sont habituellement associés à l'un des agents de chimiothérapie conventionnelle : le Paclitaxel, le Docetaxel, le Gemcitabine, le Vinorelbine ou le Pemetrexed.

➤ Thérapies ciblées :

Elles bloquent des mécanismes spécifiques de croissance ou de propagation des cellules tumorales en interférant avec des altérations moléculaires ou avec des mécanismes qui sont à l'origine de leur développement ou de leur dissémination.

➤ Immunothérapies :

Actuellement utilisées pour traiter les CBP, encore appelées inhibiteurs de point de contrôle immunitaire (*Immune checkpoint*), sont des médicaments visant à stimuler les défenses immunitaires de l'organisme contre les cellules tumorales. Les molécules ciblent un point de contrôle immunitaire tel que l'axe PD (*Programmed Death*) par l'inhibition de l'interaction du récepteur PD1 et son ligand PDL1 qui permet de lever l'inhibition exercée par les cellules tumorales sur l'immunité adaptative développée contre elles. Les inhibiteurs anti-PD1/PDL1 sont : le Pembrolizumab, l'Atezolizumab, le Cemiplimab, le Nivolumab et l'Ipilimumab.

I.5.2. Stratégies thérapeutiques

La prise en charge des cancers broncho-pulmonaires dépend principalement de trois variables : le type histologique, le statut fonctionnel du patient et l'extension tumorale. Même si pour les CBPC il y a eu peu d'évolution durant les deux dernières décennies, les choix thérapeutiques pour les CBNPC se sont considérablement diversifiés en fonction de la présence d'une mutation oncogénique activatrice et de l'introduction de l'immunothérapie dans l'arsenal thérapeutique (Berghmans et *al*, 2019).

▪ **Stade précoce ou opérable (stades I et II)**

Les stades I et II représentent seulement 15 à 30% des cas du cancer broncho-pulmonaire. Les taux de survie à 5 ans sont de l'ordre de 63 % dans ces stades (ASCO, 2021). La chirurgie constitue l'approche principale de traitement du CPNPC de stades localisés ou précoces. Elle consiste à enlever la tumeur dans son intégralité, ainsi que les ganglions correspondants (Postmus et *al*, 2017). Le type de la chirurgie pratiquée est déterminé en fonction de l'étendue de la tumeur :

- Une segmentectomie : consiste à réaliser l'ablation d'un ou de plusieurs segments pulmonaires qui est utilisée pour les petites tumeurs.
- Une lobectomie : consiste à enlever le lobe du poumon où se trouve la tumeur ;
- Une pneumonectomie : consiste à réaliser l'ablation totale d'un des deux poumons

- En complément, un curage ganglionnaire qui permet d'enlever les ganglions lymphatiques situés dans la zone de la tumeur, entourant les bronches et la trachée.

Les ganglions lymphatiques seront ensuite examinés pour contrôler la présence éventuelle de cellules cancéreuses. Savoir si le cancer s'est étendu aux ganglions lymphatiques permet également aux médecins de décider s'il y a besoin d'un traitement ultérieur de chimiothérapie adjuvant ou de radiothérapie (Postmus et *al*, 2017). La chimiothérapie périopératoire, qui n'a pas d'indication dans les stades IA et IB, peut être recommandée chez les patients de stade IIA et IIB.

- **Formes localement avancées (stades III)**

Le CPNPC localement avancé représente une maladie très diversifiée. Il est donc impossible de recommander une approche du traitement à taille unique. Dans le cas des stades IIIA avec tumeur potentiellement résécable, les solutions de traitement sont généralement le traitement d'induction avec chimiothérapie ou chimio-radiothérapie, suivi par la chirurgie (préférable dans le cas de patients chez qui il est probable que la tumeur soit complètement retirée par lobectomie) ou chimioradiothérapie. Dans les cas des stades IIIA non opérables ou des stade IIIB et IIIC, avec tumeur non résécable, il est préférable de les traiter par chimio-radiothérapie. En alternative, un traitement séquentiel par chimiothérapie tout d'abord puis par radiothérapie peut être administré chez les patients qui ne sont pas en mesure de tolérer le traitement simultané (Postmus et *al*, 2017).

- **Formes métastatiques (stades IV)**

Les stades IV représentent la moitié des cas du cancer bronchopulmonaire diagnostiqués. La prise en charge des CBNPC métastatiques a beaucoup évolué ces dernières années. Depuis plus de dix ans, la survie des patients avec un CBNPC métastatique s'est améliorée, dépassant les 12 mois grâce aux traitements anti-angiogéniques. Ces progrès se sont accélérés ces dernières années avec le développement des thérapies ciblées pour les patients dont la tumeur présente une anomalie oncogénique activatrice et de l'immunothérapie.

Pour les thérapies ciblées, on distingue le cancer CBNPC épidermoïde et les cancers non épidermoïdes. Pour les cancers non épidermoïdes et cancer épidermoïde avec un passif de tabagisme et un âge moins de 50 ans, l'identification d'anomalies oncogéniques activatrices, telles que les mutations de l'EGFR et les réarrangements de l'ALK

(*Anaplastic Lymphoma Kinase*) ou de ROS1 (*C-Ros Oncogene 1*) a permis de proposer à certains patients une thérapie ciblée (ARISTOT, 2021).

Actuellement, des immunothérapies (des inhibiteurs anti-PD1/PDL1) peuvent désormais être utilisées pour traiter les patients atteints de CBP dont la tumeur n'exprime pas une altération moléculaire particulière et présente une surexpression de la protéine PDL1. Les inhibiteurs anti-PD1/PDL1 peuvent être utilisés comme monothérapie ou en combinaison avec une chimiothérapie. Pour les patients qui ne présentent pas une surexpression de PDL1, la chimiothérapie conventionnelle seule est le traitement de référence. Elle peut être associée à un anti-angiogénique dans certains cas (Majem et al, 2019).

Pour le traitement du type CBPC, il repose essentiellement sur la chimiothérapie et l'immunothérapie. Il est palliatif, ne permettant qu'exceptionnellement une survie supérieure à 2 ans. Sans traitement, la survie est brève (3 à 6 mois) ; avec un traitement, la médiane de vie est autour de 10-12 mois avec une amélioration nette de la qualité de vie (ARISTOT, 2021).

II. RÉCEPTEUR DE L'EGF DANS LES CBNPC

II.1. Carcinogénèse bronchique

II.1.1. Caractéristiques de la tumorigénèse

La cancérogenèse est un processus multiétape qui est initié au niveau d'une cellule normale. Lors de l'étape d'initiation, la cellule normale va accumuler des altérations génétiques qui vont aboutir à l'acquisition par la cellule de caractéristiques anormales. Suite à une sélection clonale et une multiplication, les cellules vont progresser vers un stade tumoral cancéreux puis vers un stade métastatique (ANEPC, 2016). Les nouvelles caractéristiques biologiques distinctives des cellules cancéreuses ou « *The hallmarks of cancer* » ont été décrites par Hanahan & Weinberg (2000 ; 2011), ce sont : l'indépendance vis-à-vis des signaux de croissance, l'insensibilité aux signaux antiprolifératifs, l'échappement à l'apoptose, la capacité de se répliquer indéfiniment, l'induction de l'angiogénèse, la capacité à former des métastases, la reprogrammation du métabolisme énergétique et l'échappement au système immunitaire (Figure 9).

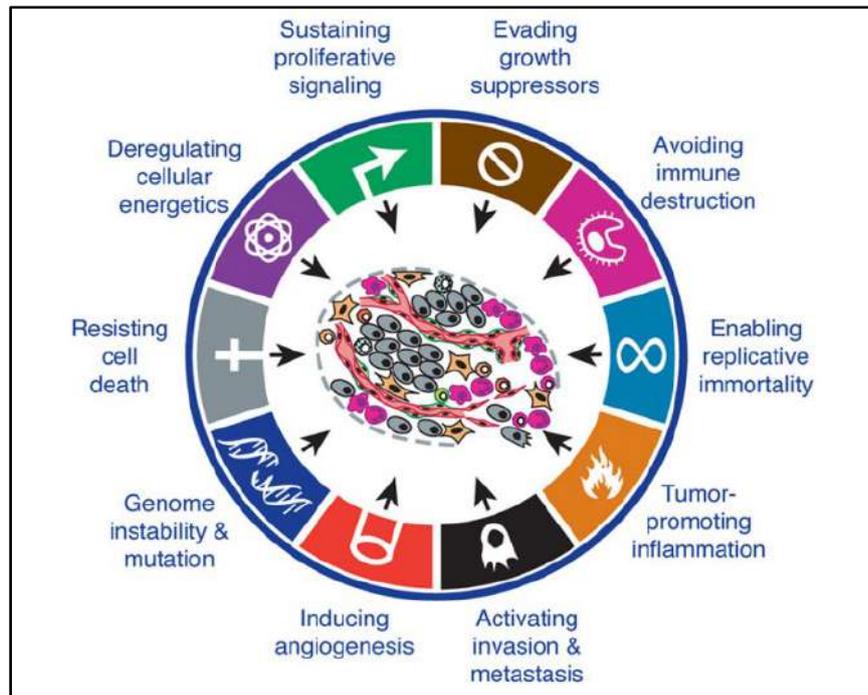


Figure 9 : Caractéristiques biologiques de la cellule cancéreuse
(d'après Hanahan et Weinberg, 2011)

II.1.2. Caractéristiques moléculaires du cancer

La cellule cancéreuse est une cellule génétiquement instable, capable d'explorer les fonctions de l'ensemble du génome et de mettre à profit tout avantage prolifératif ou migratoire pour le sélectionner et le transmettre à sa descendance. Une tumeur est une néoformation nécessitant une multiplication cellulaire toujours active et le support de la malignité des cancers est lié à leur aptitude à se disséminer dans l'organisme. Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et la différenciation, dans l'adhésion et la migration et dans la survie et la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques (de Cremoux et Robert, 2012).

La cellule épithéliale bronchique normale nécessite l'expression équilibrée de gènes prolifératifs ou les proto-oncogènes (oncogène après activation) qui sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire, contrôlant la division ou la différenciation cellulaire, et de gènes antiprolifératifs (gènes suppresseurs de tumeur) qui sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire, freinant le cycle cellulaire ou induisent l'apoptose. Le cancer broncho-pulmonaire est la résultante de la rupture de cet équilibre physiologique sous l'effet des carcinogènes ou d'autres facteurs induisant la transformation de cette

cellule bronchique normale en cellule cancéreuse passée, par un long processus multiétape. Les oncogènes peuvent être activés dites « gain de fonction » par une mutation, une amplification génique ou une translocation chromosomique. Ceci conduit à l'addiction oncogénique c'est-à-dire que la survie et la prolifération de ces cellules tumorales deviennent entièrement dépendantes de ce gène (Weinstein, 2008 ; Smolle et al, 2020).

De nombreuses altérations génétiques, qui jouent un rôle dans la pathogénie du cancer broncho-pulmonaire, ont été identifiées en particulier ce qui concerne la voie du suppresseur de la tumeur p53 et la voie oncogénique EGFR et ses effecteurs KRAS et PI3K (Levy, 2012).

II.2. Récepteur de l'EGF (EGFR)

Le récepteur du facteur de croissance épidermique ou *Epidermal Growth Factor Receptor* (EGFR) est un récepteur membranaire à activité tyrosine kinase. L'EGFR appartient à la famille des facteurs de croissance épidermiques ErbB (*Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*) ou HER (*Human Epidermal Receptor*). Elle est impliquée dans les mécanismes de signalisation intracellulaire contrôlant la croissance, la survie, l'adhésion, la migration ainsi que la différenciation cellulaire (Ruppert et al, 2011). Il joue un rôle clé dans l'apparition et le développement du cancer bronchique (Carcereny et al, 2015).

II.2.1. Description structurelle de l'EGFR

Le gène de l'EGFR est situé au niveau du bras court du chromosome 7 (7p12.13), constitué de 28 exons d'une taille de 200 kb (kilobases) (de LaMotte Rouge, 2007). Il code pour une glycoprotéine transmembranaire d'un poids moléculaire de 170 kDa (kilodaltons) (Carpenter et al, 1990). L'EGFR appartient à la famille ErbB, dénomination venant de leur homologie avec l'oncogène viral d'érythroblastose aviaire v-erb, ou HER. HER est une famille de récepteurs transmembranaires comprenant quatre membres : HER1/erbB1 ou EGFR, HER2/erbB2, HER3/erbB3 et HER4/erbB4, qui est une famille multigénique dont les membres partagent cependant une grande homologie de structure primaire. Ils possèdent des caractéristiques communes (Figure 10) : un domaine extracellulaire capable de servir de récepteur à différents ligands, domaine transmembranaire et un domaine intracellulaire porteur notamment d'une activité tyrosine kinase (Yarden, 2001 ; Hynes et al, 2009).

- Le domaine extracellulaire NH₂-terminal (ectodomaine), composé de 621 acides aminés (AAs), il consiste en quatre sous-domaines répétés deux à deux : L1 (I), CR1 (II), L2 (III) et CR2 (IV). Les domaines I et III (L1 et L2) sont analogues. Ils sont riches en résidus leucine et participent à la fixation des ligands (la formation de ponts disulfure), tandis que les domaines II et IV (CR1 et CR2), caractérisés par leur abondance en résidus cystéines, augmentent l'affinité de fixation du ligand pour le récepteur et permettent d'établir des contacts avec le second récepteur du dimère (Lemmon *et al.*, 1997, Jorissen *et al.*, 2003).
- Le domaine transmembranaire très hydrophobe, est composé de de 621 AAs, permettant l'ancrage du récepteur dans la membrane plasmique des cellules.
- Le domaine intracellulaire est composé de 542 AAs, inclut un domaine juxta-membranaire porteur de l'activité enzymatique tyrosine kinase et un domaine COOH-terminal riche en sites de phosphorylation (Roskoski, 2014). L'activité tyrosine kinase nécessite la fixation d'un phosphate sur un des sites majeurs d'autophosphorylation, comporte un petit lobe qui contient un site de liaison de l'ATP et un grand lobe qui contient le site catalytique de l'enzyme et une extrémité riche en résidus tyrosine qui est un siège de phosphorylation.

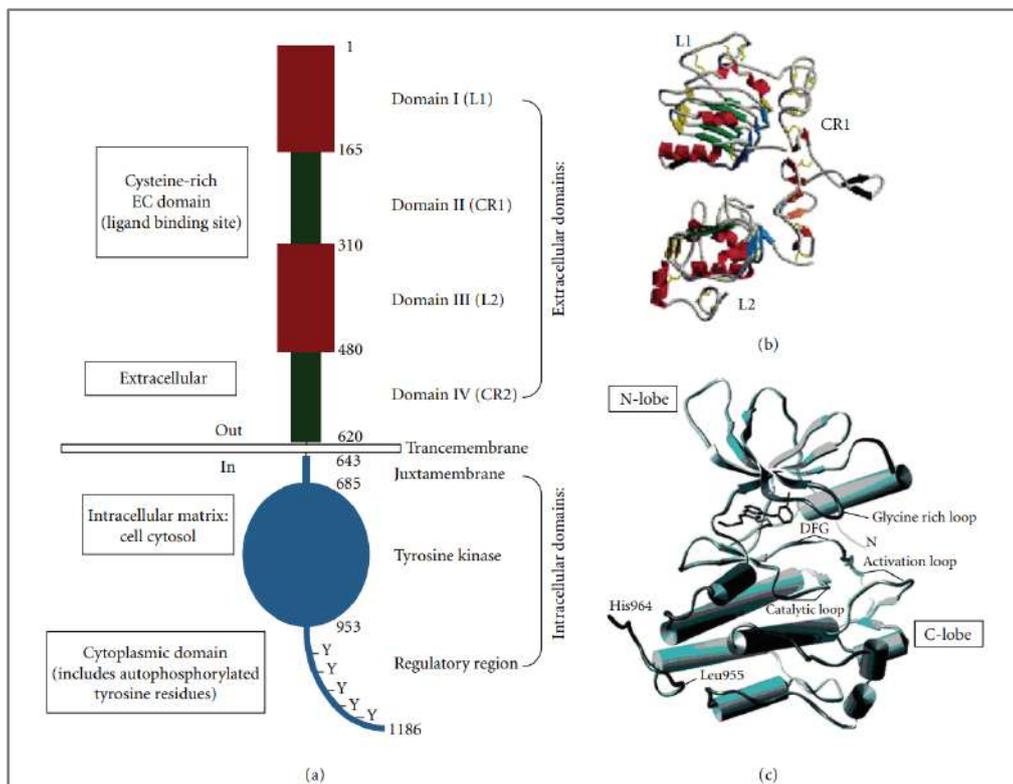


Figure 10 : Représentation schématique de la structure du récepteur EGFR (Flynn, 2009).

II.2.2. Activation de l'EGFR

L'EGFR est monomérique et en conformation repliée et ne peut être dimérisé en l'absence de ligand. La fixation de deux molécules d'un ligand spécifique (EGF) conduit à la dimérisation du récepteur ; il se produit une modification de la conformation du récepteur qui dévoile un site d'affinité au niveau du domaine extracellulaire II. Cette dimérisation permet la mise en contact des domaines intracellulaires et leur phosphorylation réciproque (Figure 11).

L'EGFR possède différents ligands, dont EGF (*Epidermal Growth Factor*) et le TGF- α (*Transforming Growth Factor-Alpha*) qui sont les deux ligands extracellulaires endogènes majeurs l'activant, mais aussi autres ligands sont décrits : l'Héparine-binding-EGF (HB-EGF), l'Amphiréguline (AREG), l'épigène (EPG), la Bêta-celluline (BTC) et l'Epiréguline (EREG). Les quatre molécules EGF, TGF α , AREG, EPG sont spécifiques de l'EGFR ; tandis que l'HBEGF, l'EREG et la BTC reconnaissent les récepteurs EGFR et ERBB4. Ces facteurs jouent un rôle clé dans la prolifération de nombreux tissus (Rebert, 2010 ; Viel et *al*, 2012).

Le récepteur activé est formé d'un homo- ou d'un hétérodimère, entre l'EGFR et un autre récepteur de la famille Erb. Le rapprochement des deux domaines tyrosine-kinases aboutit à l'activation de la fonction tyrosine kinase et permet l'auto- ou la transphosphorylation des différents résidus tyrosine situés à l'extrémité COOH-terminale intracellulaire du récepteur (Hsuan et *al*, 1993 ; Perez-Soler et *al*, 1994 ; Zhang, 2006).

La dimérisation du récepteur est réalisée par le démasquage d'un site de liaison entre deux molécules du récepteur par la liaison de chaque molécule de ligand avec une molécule de récepteur. La liaison avec l'EGF, au niveau des domaines extracellulaires 1 et 3, permet le passage à une conformation dépliée dévoilant, au niveau du domaine 2, un site de liaison avec une autre molécule de récepteur ayant également fixé une molécule de ligand, entraîne l'ouverture du site actif « poche à ATP » de l'enzyme et l'accessibilité de l'ATP. La disposition dans l'espace des deux domaines catalytiques permet la phosphorylation de leurs résidus tyrosine (de Cremoux & Rebert, 2012).

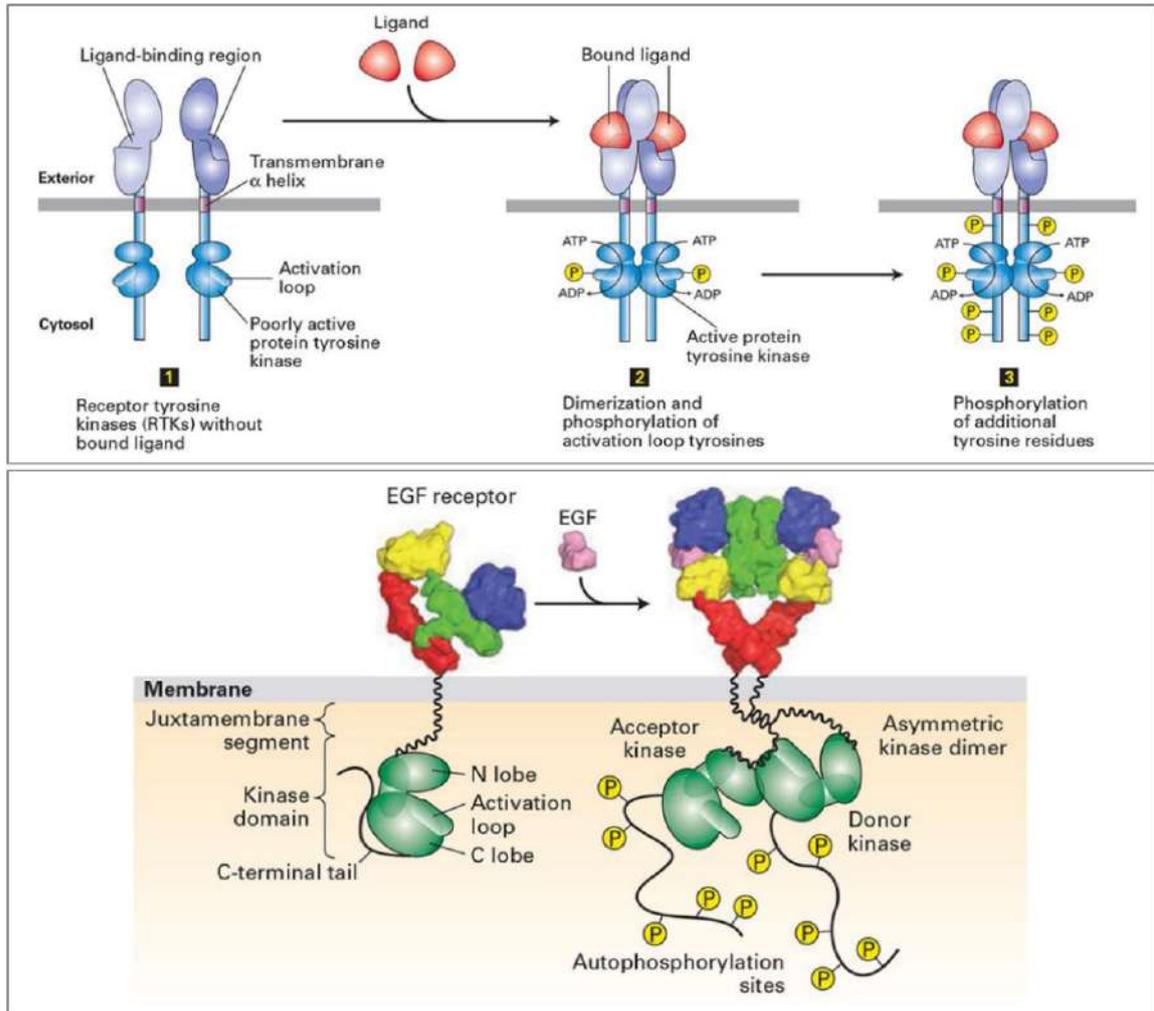


Figure 11 : Représentation schématique de mécanisme d’activation de l’EGFR (d’après Lodish, 2016).

II.2.3. Voies de signalisations de l’EGFR

Après fixation du ligand et dimérisation, il se produit une modification structurale de la portion intracellulaire du récepteur induisant par phosphorylation en cascade l’activation des voies de transduction du signal de prolifération cellulaire (Ono et al, 2006).

L’autophosphorylation de l’EGFR permet l’activation de voies de signalisation grâce à des protéines adaptatrices. Les principales voies de signalisation sont les voies : 1) MAPK (RAS/RAF /MEK), 2) PI3K/AKT, 3) PLC- γ /PKC et 4) STAT.

Le domaine SH2 de PLC- γ lui permet de se fixer directement à l’EGFR au niveau de ses tyrosines 992 et/ou 1173 et de s’activer. Son activation lui permet de catalyser l’hydrolyse de PIP2 (*phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate*) en IP3 (*inositol 1,4,5-trisphosphate*) et en

DAG (*diacylglycérol*). IP3 favorise la libération des ions calcium et DAG active PKC (*protein-serine/threonine kinase C*). A son tour, PKC phosphoryle des substrats qui agissent sur de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la survie cellulaire, la migration et l'adhésion cellulaire (Roskosky, 2014) (Figure 12).

Trois grandes voies de prolifération et de survie sont activées par l'EGFR : la voie Ras/Raf/MEK/ MAPK, la voie PI3K/AKT/mTOR et la voie JAK/STAT. La transduction du signal implique essentiellement trois types de molécules : les protéines à domaines SH2/SH3, les protéines G monomériques et les protéines kinase avant d'emprunter différentes voies de signalisations.

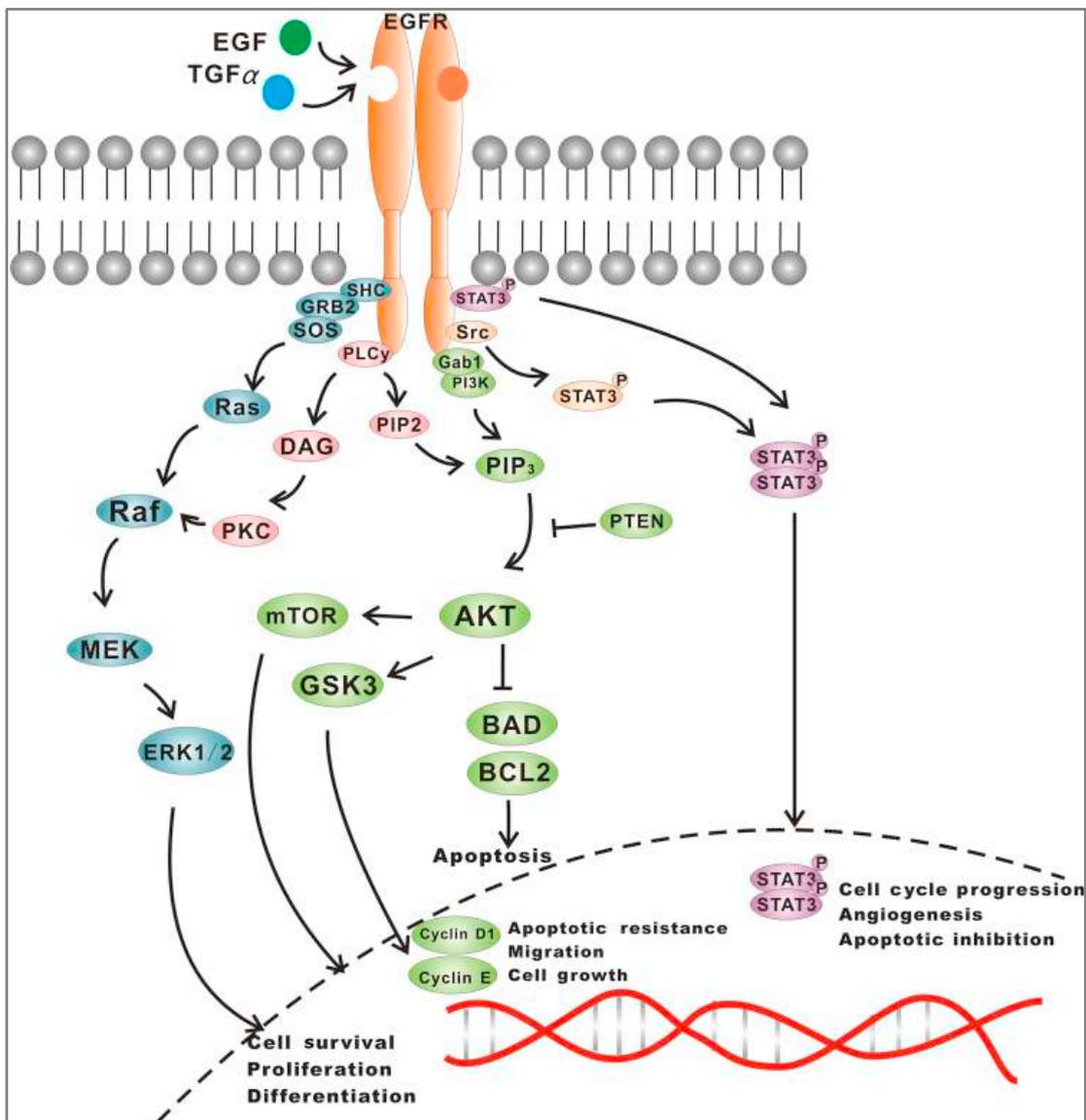


Figure 12 : Principales voies de transduction du signal dépendant de l'EGFR (d'après Huang, 2015).

- **Protéines adaptatrices**

Les phosphotyrosines servent de sites de fixation à des protéines intracellulaires de nature diverse appelées « protéines adaptatrices » grâce à des motifs de reconnaissance de type SH2 (*Src Homolgy Domain 2*) et PTB (*Phospho-Tyrosine Binding*).

Les protéines à domaine SH2/SH3 sont le premier relais de l'action des récepteurs à tyrosine kinase. Les domaines SH2 comportent deux poches : une première poche qui reconnaît spécifiquement une tyrosine kinase, uniquement lorsqu'elle est phosphorylée, une deuxième poche qui reconnaît un résidu tyrosine phosphorylé.

La protéine cytoplasmique Grb2 (*Growth Factor Receptor Bound*) possède un domaine SH2 situé entre deux domaines SH3. Les domaines SH3 permettent la liaison de Grb2 à la protéine SOS (*Son of Sevenless*). Lorsque l'EGFR s'autophosphoryle, la tyrosine phosphorylée est reconnue par le domaine SH2 de Grb2, d'où l'interaction EGFR/Grb2/SOS. La protéine se trouve positionnée à proximité du substrat, la p21 codée par RAS. La protéine SOS est un facteur d'échange qui agit sur Ras-GDP pour faciliter le remplacement du GDP par le GTP (Ruppert, 2011).

- **Voie de signalisation RAS/MAPK**

La voie des MAPK contrôle essentiellement l'expression de protéines impliquées dans la survie, la différenciation et la prolifération cellulaire (de Cremoux & Robert, 2012). La liaison des protéines adaptatrices Shc ou Grb2 sur l'EGFR initie l'activation de la voie des Ras/Raf/MEK/MAPK (Figure 13). L'EGFR active la voie des MAP Kinase, après la phosphorylation des tyrosines 1068 et 1086 (Jorissen, 2003). La protéine Grb2, constitutivement liée à SOS, peut soit interagir indirectement avec l'EGFR par l'intermédiaire de Shc, soit lier directement les phosphotyrosines du récepteur (Sasaoka et al, 1994). Dans ce cas, le complexe Grb2/Sos active la GTPase Ras en lui apportant de l'énergie sous forme de GDP.

Cette activation de RAS permet la mise en œuvre d'une cascade de phosphorylations aboutissant à l'activation de facteurs de transcription. Trois sérine/thréonine kinases successives sont mises en jeu : une RAF-1, une MEK ou MAP2K (*Mitogen-activated protein kinase kinase*) et une ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) ou MAP kinase. Ces derniers sont responsables de la phosphorylation de facteurs de transcription tels que c-FOS, c-MYC et c-JUN qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand

nombre de gènes, en particulier ceux de cycline D1 et de CDK6, ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1 (Vaillancourt et *al*, 1994 ; Hallberg et *al*, 1994).

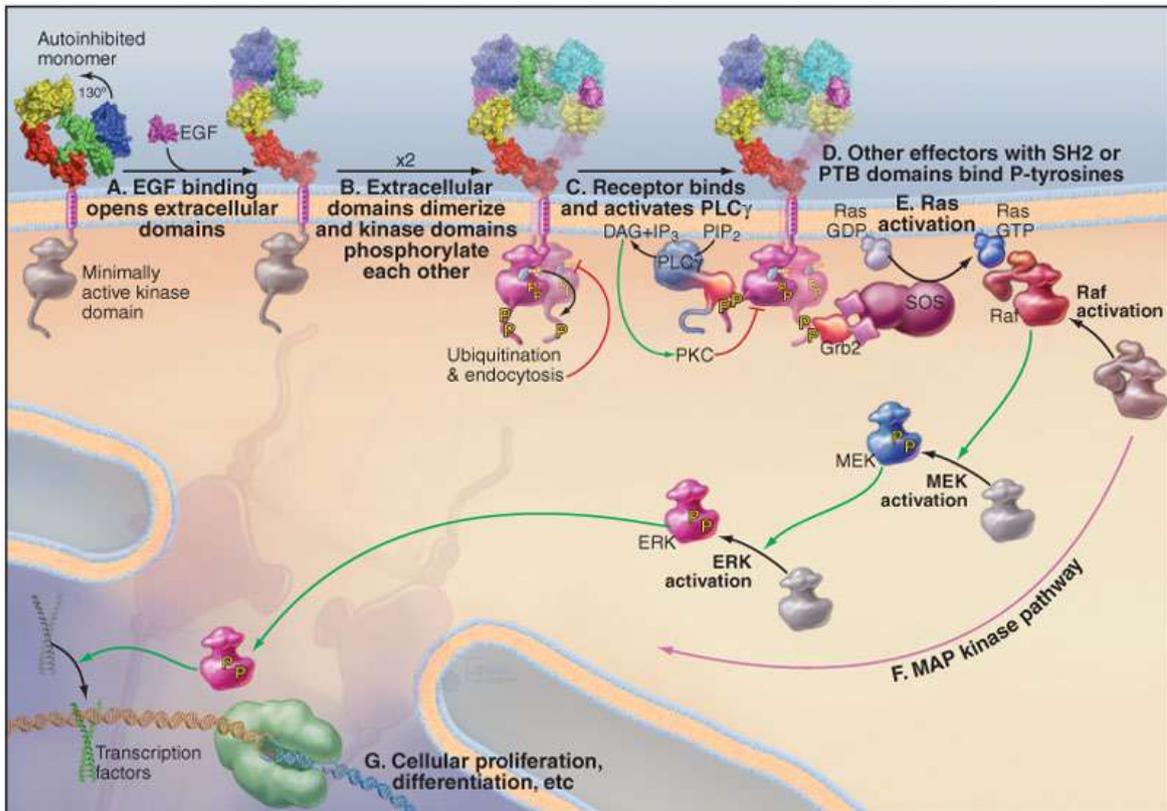


Figure 13 : Voie des MAPK après activation par l'EGFR (d'après Pollard, 2008).

▪ **Voie PI3K /AKT**

La voie de la phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) suit un chemin parallèle à la voie des MAP kinases. Comme cette dernière, elle comporte des activations séquentielles de kinases aboutissant à des effets multiples sur la transcription de gènes impliqués dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaires. Cette voie est interconnectée en particulier avec la voie des MAP kinases au niveau de RAS (Rebert, 2010).

La PI3K est une enzyme hétérodimérique composée de deux sous-unités : l'une catalytique (p110) portant une activité de lipide kinase et l'autre régulatrice (p85, PIK3R1) dotée d'un domaine SH2 qui lui permet de reconnaître des phosphotyrosines de RTK activés, et de transmettre cette activation à la sous-unité catalytique. Cette enzyme peut être activée directement par la liaison de récepteurs à activité tyrosine kinase à sa sous-unité p85 ou par l'intermédiaire de RAS par sa liaison à sa sous-unité p110. PI3K activée induit alors la

phosphorylation de PIP2 ce qui conduit à la formation de PIP3 (phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate). PIP3 est le principal lipide produit *in vivo* et il sert de ligand pour recruter la protéine AKT (Protein serine/ threonine kinase) à la membrane où cette dernière est phosphorylée et activée par la sérine/thréonine kinase phosphatidylinositol-3-dependent kinase 1 (PDK1).

La protéine AKT activée a pour cible de nombreuses protéines d'aval dont mTOR, BAD et GSK3 (Vignot et al, 2005). Akt catalyse la phosphorylation et l'activation de mTOR (*Mammalian target of rapamycin*) et la phosphorylation et l'inhibition de BAD (*Bcl2-associated death promoter*) qui entrent dans la régulation de la survie cellulaire et de l'apoptose, respectivement (Roskoski, 2014).

La voie PI3K/Akt est négativement régulé par PTEN (*phosphatase and tensin homolog*) qui catalyse l'hydrolyse de PIP3 en PIP2 (Chalhoub et Baker, 2009).

- **Voie STAT**

L'EGFR est capable d'activer la voie des STAT (*Signal Transducer and Activator of Transcription*). Les STAT sont phosphorylés par l'EGFR conduisant soit leur homo- ou hétérodimérisation, et leur translocation dans le noyau où ils vont agir comme facteur de transcription contrôlant la prolifération, la différenciation, la survie cellulaire et l'apoptose (Jorissen, 2003).

Les kinases JAK réalisent la phosphorylation de facteurs de transcription de la famille STAT. Les gènes cibles des facteurs de transcription STAT sont nombreux, mais leur identification reste incomplète. STAT3 est fortement impliqué dans la prolifération cellulaire, avec des gènes cibles codant pour les protéines BCL2, les cyclines D, des facteurs de croissance comme le VEGF, des facteurs de transcription comme MYC, JUN et FOS. STAT3 est en revanche un répresseur de la transcription du gène TP53 (Rebert, 2010).

II.3. Altérations de L'EGFR dans les CBNPC

Les différentes altérations de l'EGFR observées dans les tumeurs bronchiques sont liées aux modes d'activation du récepteur qui peuvent être une surexpression du récepteur ou une activation intrinsèque du récepteur indépendante du ligand. La surexpression du

récepteur EGFR et/ou la mutation activatrice du gène contribue au développement ou la dissémination du CBP (Ciardiello et Tortora, 2003 ; Gazdar, 2009).

II.3.1. Surexpression de l'EGFR

Deux types d'altérations de l'expression de l'EGFR peuvent être observés : la surexpression protéique du récepteur et/ou l'amplification (haut niveau de copies) du gène de l'EGFR. La surexpression de l'EGFR est retrouvée dans plusieurs types de tumeurs solides, dont les cancers colorectaux, de la tête et du cou, de l'ovaire, du col de l'utérus, du sein, de l'estomac et du poumon. Elle est fréquemment considérée comme un signe d'un mauvais pronostic (Nicholson et *al*, 2001).

▪ Augmentation du nombre de copies du gène EGFR

Plusieurs anomalies chromosomiques ont été identifiées dans le CBNPC, dont l'augmentation du nombre de copies du gène EGFR qui est due soit à une amplification génique, soit à une polysomie du chromosome 7 (7p12) porteur du gène de l'EGFR (Testa et Siegfried, 1992). L'augmentation du nombre de copies du gène EGFR est principalement détectée par la technique FISH (Fluorescence in situ Hybridation), et existe dans 32 à 42% des adénocarcinomes CBNPC (Hirsch, 2003 ; Cappuzzo et *al*, 2005 ; Liang et *al*, 2010), et semble plus fréquente chez le patient non-fumeur (Jeon et *al*, 2006).

Cette augmentation est liée à un mauvais pronostic chez les patients atteints de CBNPC (Hirsch et *al*, 2003 ; Jeon et *al*, 2006). En outre, des études cliniques ont montré qu'elle est un facteur prédictif de réponse plus robuste aux inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (Cappuzzo et *al*, 2005 ; Sequist et *al*, 2007 ; Hirsch, 2007). À l'inverse, d'autres études ont montré que l'amplification génique n'était pas un marqueur prédictif de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR (Fiala et *al*, 2016).

▪ Surexpression de la protéine EGFR

L'EGFR est surexprimé dans 50% à 60% des cas du CBNPC et son expression est associée à un mauvais pronostic (Hirsch et *al*, 2003 ; Sharma, 2007 ; Gazdar, 2010 ; Liang et *al*, 2010 ; Chang et *al*, 2017). Cette surexpression se varie selon le type histologique, elle est plus fréquente dans le carcinome épidermoïde que dans l'adénocarcinome (Hirsch et *al*, 2003).

Les valeurs pronostique et prédictive de la surexpression protéique de l'EGFR ont fait l'objet d'études contradictoires. Certaines études n'ont pas de l'association entre la surexpression de l'EGFR n'avait pas une valeur pronostique dans le CBNPC (Hirsch et al, 2003), alors que d'autres travaux indiquent qu'elle pourrait être prédictive d'un mauvais pronostic (Selvaggi et al, 2004). Une autre étude par Onn et al. (2004) ont montré que la concomitance de surexpressions de HER2 et de l'EGFR pourrait être un facteur prédictif d'une diminution de la survie et d'un plus fort risque de rechute chez les patients atteints du CBNPC.

De même pour sa valeur prédictive, des études ont montré que la surexpression de l'EGFR est associée à un meilleur taux de réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase de l'EGFR. En revanche, d'autres études complémentaires ont ensuite démontré l'absence de valeur prédictive de la surexpression de l'EGFR (Cappuzzo et al, 2003 ; Hirsch, 2007 ; 2009).

II.3.2. Mutations du gène EGFR

▪ Mutations intracellulaires dans le domaine tyrosine kinase de l'EGFR :

Dans le CBNPC, les mutations activatrices de l'EGFR ont lieu principalement sur les exons 18 à 21 au niveau du domaine tyrosine kinase de l'EGFR (Figure 14).

Ces altérations ont toutes été clairement associées à un gain de fonction du récepteur muté souvent lié à une auto-phosphorylation du site kinase et induisent l'activation constitutive de l'EGFR et de ses voies d'aval ce qui permet la prolifération et la survie des cellules tumorales. La prévalence de ces mutations dans les CBNPC varie selon les sous-types histologiques et les populations étudiées.

Deux de ces mutations sont les plus fréquentes représentant environ 85% de l'ensemble des mutations d'EGFR dans le CBNPC : mutation L858R dans l'exon 21, substitution d'une leucine en arginine au niveau du codon 858 comptent pour 40 à 45% de ces mutations, et délétions au niveau de l'exon 19 (Del-19) d'au moins cinq codons 746 à 750 (delE746-A750), emportant systématiquement la séquence d'acides aminés LREA (leucine, arginine, glutamate, alanine) représente environ 45% d'entre ces mutations. D'autres mutations activatrices plus rares ont été décrites dans l'exon 18, environ 5% de toutes les mutations EGFR (notamment substitutions G719X, G719C, G719S, G719A, V689M, ...), insertions dans l'exon 19 (< 1%), substitution T790M (2%) et insertions (4%

à 9%) dans l'exon 20, substitution L861Q (2%) dans l'exon 21 (Sharma et al, 2007 ; Tanaka et al, 2010).

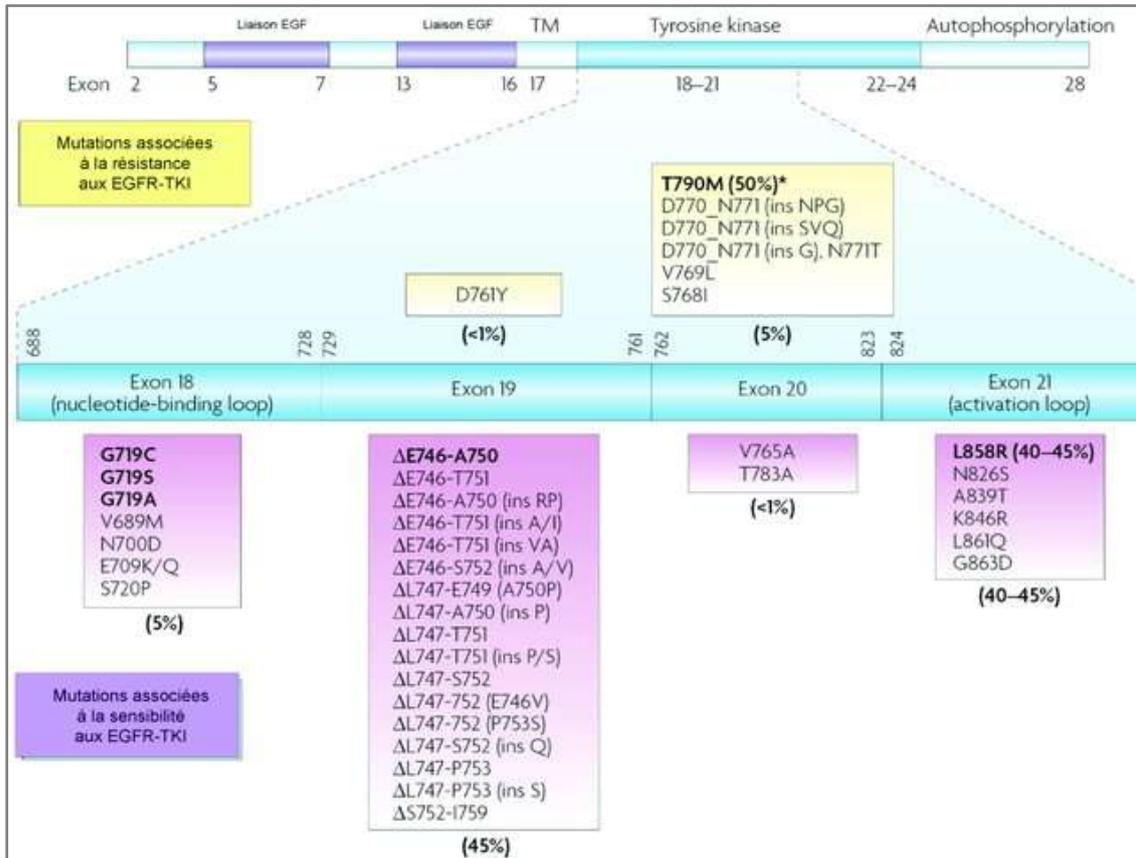


Figure 14 : Mutations du gène EGFR dans le CBNPC (d'après Sharma, 2007).

▪ **Mutations dans le domaine extracellulaire :**

Le mutant le plus fréquent est l'EGFRvIII (de2-7 EGFR ou ΔEGFR). Il s'agit d'une délétion des exons 2 à 7, entraînant une perte de 267 acides aminés, et a pour conséquence la perte du domaine de fixation du ligand et l'autophosphorylation qui entraîne l'activation du récepteur en l'absence de ligand (Haley et al, 1987 ; Pedersen et al, 2001). Cette mutation rare dans l'adénocarcinome et présente dans 5% de carcinome épidermoïde (Ohtsuka et al, 2007).

II.4. Thérapies ciblées anti-EGFR

De par le rôle clé que joue l'EGFR dans la carcinogenèse pulmonaire, l'EGFR a été assez tôt identifié comme une cible thérapeutique potentielle. L'inhibition de l'activité tyrosine-kinase de l'EGFR diminue la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et l'invasion tumorale

locale et métastatique, de plus, elle favorise l'apoptose. Des thérapies ciblées visant à le bloquer ont été développées, il existe deux façons d'inhiber l'EGFR : soit en utilisant des inhibiteurs compétitifs de l'ATP qui vont bloquer l'activité tyrosine kinase du récepteur, soit en utilisant des anticorps monoclonaux dirigés contre le domaine extracellulaire du récepteur.

- Les inhibiteurs de l'activité tyrosine-kinase de l'EGFR ou EGFR-TKIs (*Tyrosine kinase inhibitors anti-EGFR*) se fixent de manière compétitive à la poche de fixation de l'ATP empêchant ainsi la fixation de l'ATP. L'échange de phosphate n'étant plus possible entre l'EGFR et l'ATP, la phosphorylation de l'EGFR est inhibée, ce qui provoque l'inactivation transitoire de l'activité tyrosine kinase (Ciardiello et Tortora, 2008).
- Les anticorps empêchent la fixation du ligand au récepteur EGFR.

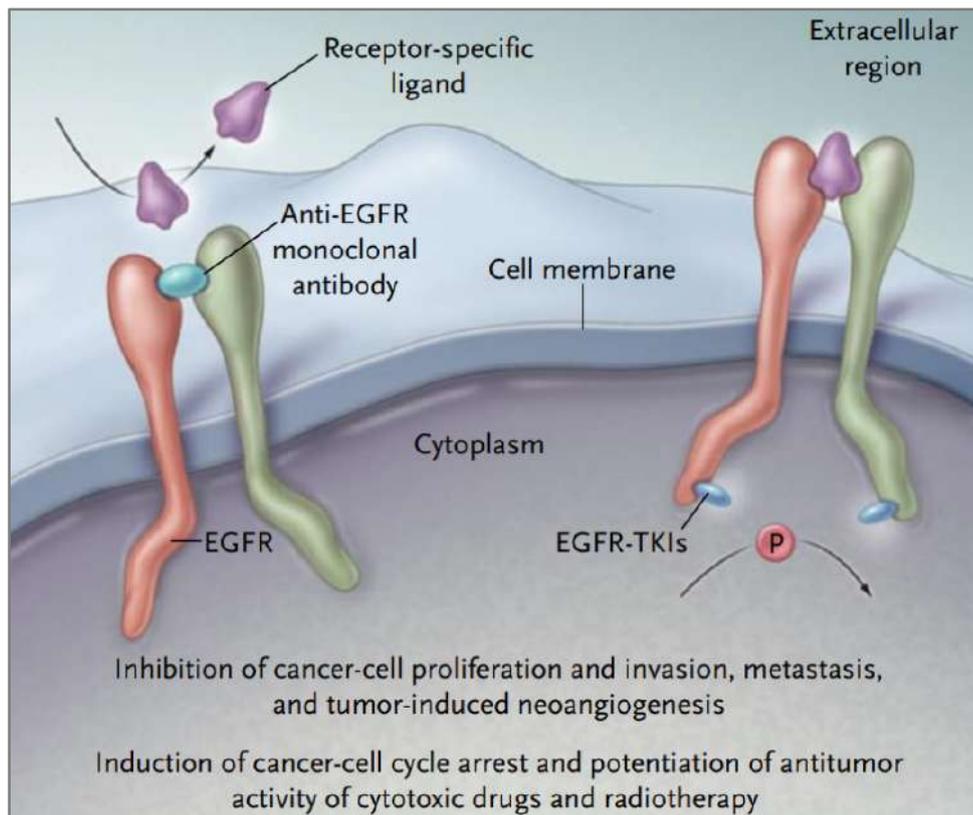
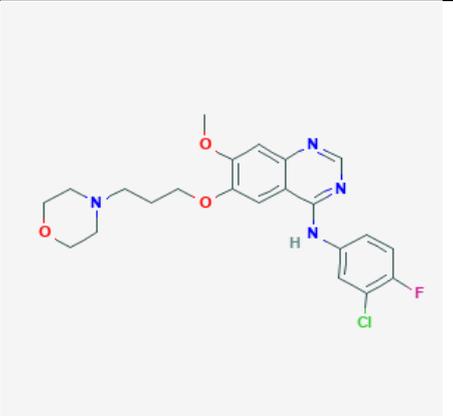
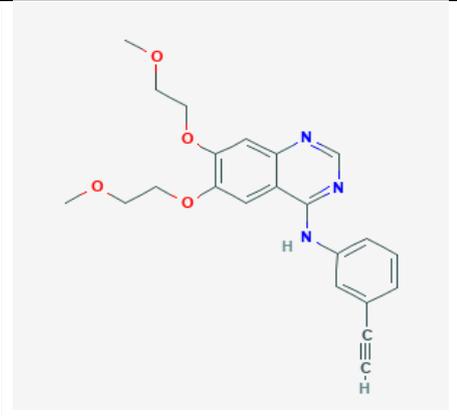


Figure 15 : Mécanismes d'action des inhibiteurs de l'EGFR (d'après Ciardiello et Tortora, 2008).

II.4.1. Inhibiteurs de l'activité tyrosine kinase de l'EGFR (EGFR-TKIs)▪ **EGFR-TKIs de première génération**

La découverte du motif structural « 4-anilinoquinazolines » a permis le développement de nombreux inhibiteurs de la famille HER dont les EGFR-TKIs de première génération. Les EGFR-TKIs développés les premiers furent le Géfitinib et l'Erlotinib (Tableau 4).

Tableau 4 : EGFR-TKIs de première génération.

Dénomination	Géfitinib (ZD1839)	Erlotinib (OSI774)
Nom commercial	Iressa® (Laboratoires AstraZeneca)	Tarceva® (Laboratoires Roche)
Nom du produit	<i>4-(3-chloro-4-fluoro-anilino)-7-methoxy- 6-(3-morpholinopropoxy) quinazoline</i>	N-(3-éthynylphényl)-6, 7-bis(2-méthoxyéthoxy) -4-quinazolinamine
Formule		

Les patients porteurs d'une mutation de l'EGFR avaient une meilleure survie sans progression et un meilleur taux de réponse au Géfitinib comparativement aux patients avec un EGFR non muté (Tableau 5). Ces derniers représentent une meilleure survie sans progression sous chimiothérapie (Mok et al, 2009).

Tableau 5 : Efficacité des EGFR-TKIs de première génération (d’après Brosseau, 2015).

Essai clinique	Molécule	Nb patient EGFR muté	SSP HR IC 95 %	Médiane SSP (mois)	SG HR IC 95 %	Médiane SG (mois)
IPASS	Géfitinib	261	0,48 (0,36 ; 0,64)	9,5	1 (0,76 ; 1,33)	21,6
WJTOG	Géfitinib	171	0,49 (0,34 ; 0,71)	9,2	1,19 (0,77 ; 1,83)	36
OPTIMAL	Erlotinib	165	0,16 (0,10 ; 0,26)	13,1	1,04 (0,69 ; 1,58)	22,7
EURTAC	Erlotinib	174	0,37 (0,25 ; 0,52)	9,7	1,04 (1,65 ; 1,68)	22,9

SSP : survie sans progression ; SG : survie globale.

▪ **Facteurs prédictifs de sensibilité aux EGFR-TKIs**

Les mutations activatrices de l’EGFR ont été identifiées comme facteurs prédictifs de sensibilité aux EGFR-TKIs en 2004 par deux groupes indépendants : Paez et *al.* (2004) et Lynch et *al.* (2004). Les cellules tumorales avec ces mutations auront une plus grande sensibilité à ces traitements que les cellules sans mutation.

Dans le CBNPC, les mutations activatrices de l’EGFR sont plus fréquentes chez les femmes, les non-fumeurs, et les cas ayant un adénocarcinome (Cappuzzo et al., 2005 ; Rosell, 2009). Selon les populations étudiées, ces mutations représentent environ 10% à 20% des patients Caucasiens et 40% à 50% des cas en Asie (Midha et *al.*, 2015 ; Zhang et *al.*, 2016).

On peut distinguer trois catégories de ces mutations, selon leurs fréquences et leurs sensibilités aux EGFR-TKIs :

- Deux mutations les plus fréquentes, qui représentent plus de 85% de toutes les mutations EGFR, sont décrites sur deux loci : l’exon 19, au sein du motif dit ELREA, et une mutation faux-sens L858R dans l’exon 21.
- Les autres mutations rares dont l’impact sur la fonctionnalité du récepteur n’est pas toujours connu (Gibault et al, 2014).

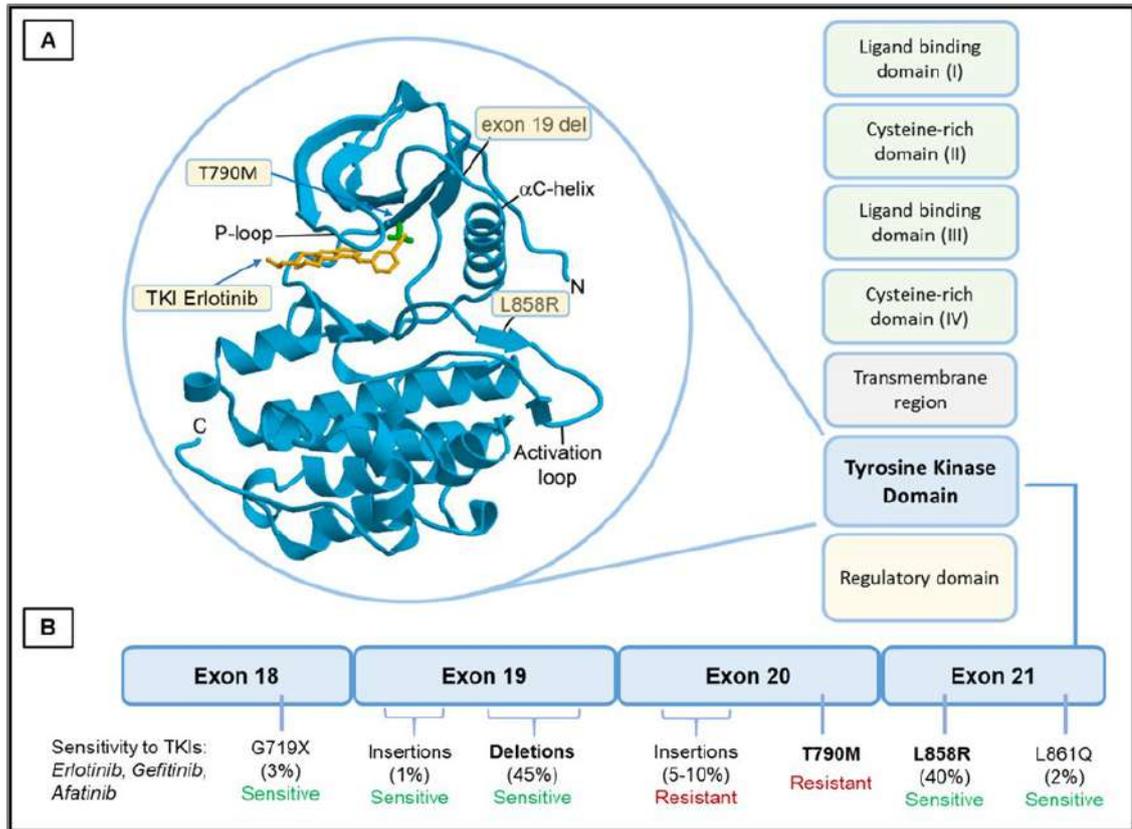


Figure 16 : Mutations de l'EGFR dans le CBNPC et ses sensibilités aux EGFR-TKIs (modifié d'après Jorge et *al*, 2014).

- Les mutations associées à une résistance aux EGFR-TKIs sont généralement situées au sein d'exon 20. Ces mutations sont des insertions ou des mutations ponctuelles telles que la mutation T790M, qui présente le principal mécanisme de résistance aux EGFR-TKIs (Fallet et *al*, 2016).

Certaines études ont montré que les patients ayant un EGFR muté, avec une amplification du gène, ont une survie sans progression plus longue et surtout un meilleur taux de réponse aux EGFR-TKI (Hirsch, 2008 ; Dahabreh et *al*, 2011 ; Shan, 2015). De même, Cappuzzo et *al*. (2005) ont trouvé une corrélation significative entre la surexpression de protéine EGFR avec H-score immunohistochimique > 200 et le taux de réponse et la survie sans progression plus longue chez les patients traités par le Gefitinib.

▪ **Résistance aux EGFR-TKIs**

Les patients atteints de CBNPC montrent une résistance aux EGFR-TKIs, soit ils ne présentent pas de réponse initiale « la résistance primaire », soit ils présentent une résistance après une période de traitement « résistance acquise ou secondaire ». La résistance primaire survenant avant le troisième mois de traitement par EGFR-TKI et la résistance acquise qui apparaît plus tardivement et qui représente 90% des cas de résistance.

II.4.2. Anticorps monoclonaux anti-EGFR

Les principaux anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR testés pour le traitement du CBNPC avec une surexpression de l'EGFR sont : le Cetuximab, le Necitumumab, le Panitumumab, le Matuzumab et le Nimotuzumab.

Le Cetuximab (*Erbix[®]*), est un anticorps chimérique, utilisé en pratique clinique dans le traitement du cancer colorectal métastatique et du carcinome épidermoïde de la tête et du cou (HAS, 2009), est toujours en phase clinique pour le traitement du CBNPC. Dans l'essai clinique de FLEX (phase III), par son utilisation combinée à une double chimiothérapie (Cisplatine et Vinorelbine), une amélioration de la survie globale a été observée comparativement à la chimiothérapie seule chez les patients atteints d'un CBNPC métastatique (Pirker, 2012). De même, la combinaison avec une chimiothérapie (Pemetrexed ou Docetaxel) apporte un bénéfice de survie sans progression (Zhang, 2015).

Le Necitumumab (*Portrazza[®]*), un anticorps monoclonal de deuxième génération, a montré une amélioration de la survie globale et de la survie sans progression de la maladie en combinaison avec une double chimiothérapie (Gemcitabine et Cisplatine) comparativement à la chimiothérapie seule, chez des patients atteints de carcinomes épidermoïdes incluant le CBNPC. En décembre 2015, il a reçu l'autorisation de mise sur le marché (AMM) de l'agence américaine des produits alimentaires et médicamenteux FDA (*Food and Drug Administration*) et de l'agence européenne des médicaments EMA (*European Medicines Agency*) pour une indication, en combinaison avec la Gemcitabine et le Cisplatine, dans le traitement des carcinomes épidermoïdes bronchiques localement avancés ou métastatiques et chimiothérapie-naïfs (Losanno, 2016 ; Agustonia et al, 2019).

II.5. Altérations de voies de signalisation de l'EGFR et Thérapies ciblées

II.5.1. Ciblage de voie RAS

La protéine RAS joue un rôle majeur en aval de l'EGFR dans la transduction du signal entre le récepteur et les kinases cytoplasmiques. C'est une GTPase ancrée à la membrane plasmique qui agit comme un commutateur on/off en recrutant et activant des protéines nécessaires à la propagation du signal lorsque le récepteur est activé. La conversion GTP>GDP conduit à une inactivation de KRAS et est un frein de l'activation en aval. La première kinase en aval de KRAS est la protéine BRAF, qui permet la transduction du message aux kinases MEK (MAPK) (Gibault et *al*, 2014).

Les altérations majeures de cette voie correspondent aux mutations des gènes KRAS et BRAF. La présence de telles mutations au niveau tumoral est responsable d'une activation acquise de la voie RAS/MAPK en aval de l'EGFR, et totalement indépendante de la fixation du ligand à ce dernier.

- **Mutations de KRAS**

Le gène KRAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) est situé sur le bras court du chromosome 12 (12p12.1). Les altérations de KRAS associées au CBNPC consistent principalement en des mutations ponctuelles au niveau des codons 12 et 13 au sein de l'exon 2 du gène KRAS (Riely et *al*, 2009).

La présence des mutations activatrices de KRAS est une altération moléculaire fréquente dans les CBP (Dearden et *al*, 2013). La présence de cette anomalie est mutuellement exclusive des mutations de l'EGFR, et souvent considérée comme un facteur de mauvais pronostic et de résistance aux thérapies anti-EGFR et à la chimiothérapie ; même si cela reste controversé, avec des résultats divergents selon les études (Guibert et *al*, 2016).

- **Mutations de BRAF**

Des mutations activatrices de BRAF ont été identifiées dans environ 1 à 3 % des CBNPC principalement de type adénocarcinome (Paik et *al*, 2011 ; Barlesi et *al*, 2013 ; Hamard et *al*, 2016). La présence des mutations de BRAF est mutuellement exclusive des mutations de l'EGFR et de KRAS (Gibault et *al*, 2014).

▪ **Thérapies ciblées la voie RAS / MAPK**

Le développement de différentes classes de thérapies ciblées qui visent à inhiber ces voies, les trois principales catégories des agents thérapeutiques sont : les inhibiteurs de RAF, les inhibiteurs de MEK et les inhibiteurs directs de RAS.

➤ **Les inhibiteurs directs de RAS :**

Les mutations KRAS sont même longtemps considérées comme non traitables ou 'Undruggable'. En effet, les principaux obstacles au développement des thérapies ciblant directement cet oncogène sont liés à la grande affinité de la protéine KRAS pour le GTP et la toxicité de ces approches thérapeutiques contre cette protéine.

Deux médicaments, le Sotorasib (*AMG-510, Amgen*) et l'Adagrasib (*MRTX-849, Mirati Therapeutics*), sont les premiers inhibiteurs directs de KRAS à atteindre le stade de développement clinique (Hong et al, 2020 ; Jänne et al, 2020 ; Skoulidis et al, 2021).

➤ **Les inhibiteurs d'effecteurs de voie RAS :**

Des essais cliniques sont en cours pour valider l'intérêt des inhibiteurs de BRAF chez les patients atteints de CBNPC. Parmi les inhibiteurs ciblant les mutations de BRAF « le Dabrafenib et le Vemurafenib » et l'inhibiteur « le Trametinib » ciblant MEK (Hamard et al, 2016 ; O'Leary et al, 2019 ; Mazieres et al, 2020).

II.5.2. Ciblage de voie PI3K

Parallèlement à l'activation de la voie RAS/MAPK, la voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR est une cible en aval de l'EGFR, associée à la survie cellulaire, l'échappement à l'apoptose, l'acquisition d'une mobilité cellulaire et l'angiogenèse (Gibault et al, 2014). Les altérations de voie PI3K sont liées principalement à la région du gène PIK3CA (3q26) codant pour la sous-unité catalytique p110 α . De plus, d'autres anomalies sont liées au régulateur négatif principal de la voie PI3K/AKT, la phosphatase PTEN (*Phosphatase and Tensin homologue*) (Marsit et al, 2005 ; Scheffler et al, 2015 ; Wang et al, 2020).

▪ **Thérapies ciblées anti-PI3K**

Les inhibiteurs de PI3K peuvent être classés en trois catégories : les inhibiteurs pan-PI3K, les inhibiteurs PI3K sélectifs, et les inhibiteurs duels PI3K/mTOR. Parmi les inhibiteurs évalués dans le traitement de CBNPC (essais cliniques phase I-II) : les inhibiteurs pan-

PI3K (Buparlisib, Voxtalisib, XL147, Pictilisib), l'inhibiteur sélectif anti-p110 α (Taselisib) et l'inhibiteur PI3K/mTOR (Apatolisib). Ils ont été testés comme monothérapies ou en combinaison avec des agents de chimiothérapie ou thérapies ciblées. D'autres sont en cours pour évaluer leur intérêt chez les patients atteints de CBNPC (Rebuzzi et *al*, 2021).

CHAPITRE II
MATÉRIEL & MÉTHODES

I. Méthodologie

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive et analytique, menée entre juin 2015 et décembre 2020, sur des patients ayant été diagnostiqués et/ou traités au niveau du CHU Ben-Badis de Constantine.

Nous avons présenté dans une première partie notre étude épidémiologique basée sur les données disponibles pour 169 cas de CBP. Les données recueillies nous ont permis d'évaluer certains paramètres pathologiques et cliniques afin de décrire le profil épidémiologique et clinico-pathologique du CBP dans notre population.

Dans une seconde partie, nous avons étudié le statut mutationnel du gène EGFR et la surexpression de la protéine EGFR dans une cohorte de 58 patients atteints de CBNPC, en analysant les caractéristiques clinico-pathologiques des patients présentant des mutations de l'EGFR. Les mutations et la surexpression de l'EGFR ont été détectées par techniques de séquençage capillaire et d'immunohistochimie, respectivement.

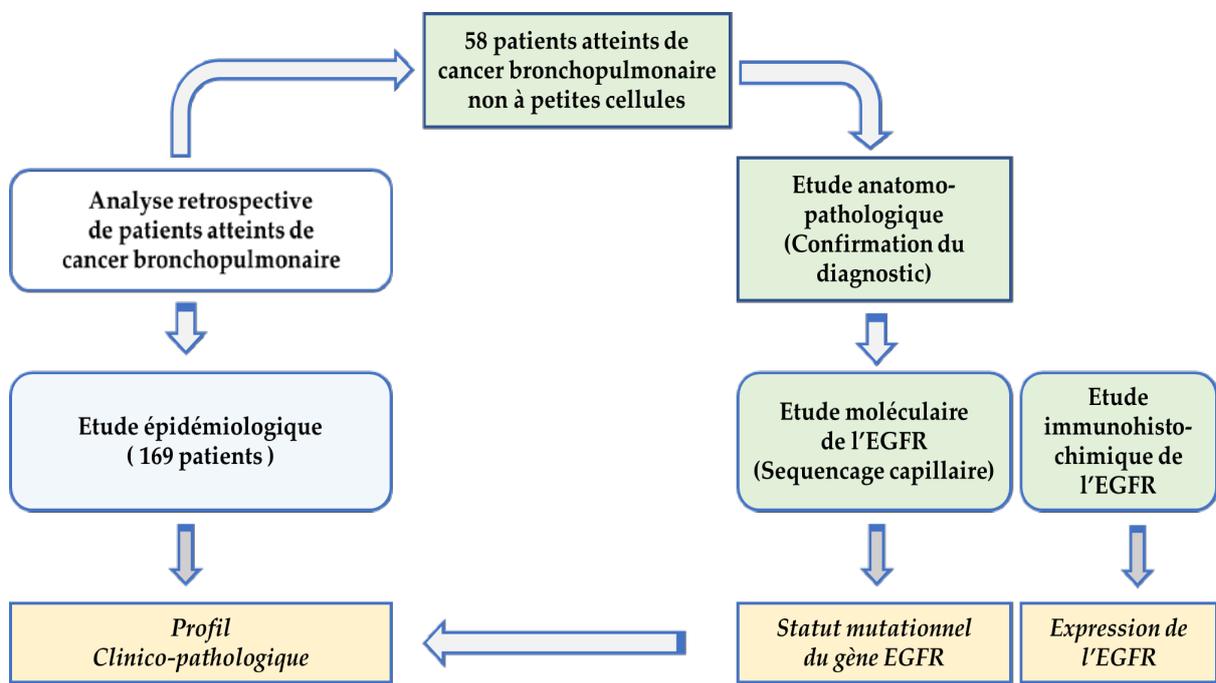


Figure 17 : Schéma représentatif de la méthodologie adoptée pour notre étude.

▪ **Patients**

La majorité des patients présentant notre population d'étude proviennent de l'Est algérien, habitant la ville de Constantine et aux villes limitrophes.

Les critères d'inclusion étaient :

- patients de deux sexes.
- tout âge confondu.
- ayant un diagnostic histologique ou cytologique prouvé de CBP.
- ayant un cancer métastatique ou non.
- ayant subi ou non un traitement (chirurgie, radiothérapie et/ou chimiothérapie).

Les critères d'exclusion, concernant les patients sélectionnés pour l'étude moléculaire de l'EGFR, étaient :

- patients n'ayant pas un CBNPC histologiquement prouvé.
- n'ayant pas des échantillons tumoraux archivés au sein du service Anatomopathologique.
- n'ayant pas des échantillons éligibles pour une analyse moléculaire en termes du volume de prélèvements ou de la richesse tumorale.

▪ **Recueil de données**

Les données cliniques et pathologiques disponibles ont été recueillies rétrospectivement à partir des dossiers archivés des patients au niveau des services Anatomie pathologique, Pneumologie, Chirurgie thoracique et Oncologie médicale. Ces données ont été saisies et organisées sur Excel (Microsoft Office 2019) afin d'effectuer l'analyse statistique des différents paramètres.

▪ **Aspects d'éthique**

L'acquisition et l'analyse des données des patients ainsi que les échantillons tumoraux archivés ont été effectués dans le respect de la confidentialité et de l'anonymat. Au préalable une autorisation nous a été délivrée auprès du CHU Ben-Badis de Constantine, signée par le directeur général et les chefs de services concernés. Notre étude a été également approuvée par le comité consultatif d'éthique (CCE) du centre de recherche en biotechnologie de Constantine (CRBt) (*Annexes A et B*).

- **Analyses statistiques**

Les variables qualitatives ont été exprimées en effectifs et pourcentages et les variables quantitatives en moyenne ou médiane. Pour les données qualitatives, la comparaison entre deux groupes a été réalisée par le test du chi-deux (X^2) ou le test exact de Fisher. La différence est considérée statistiquement significative, si la valeur de p est inférieure à 0,05. Les intervalles de confiance sont donnés à 95%. Les analyses statistiques des données ont été réalisées au moyen du logiciel GraphPad Prism version 7.

II. Méthodes

II.1. Étude épidémiologique

Notre étude épidémiologique a porté sur une série de 169 patients. Nous avons effectué une analyse descriptive de données des patients collectées rétrospectivement pour décrire les caractéristiques clinico-pathologiques et les facteurs de risques liés au CBP. Les principaux paramètres analysés sont : le sexe, l'âge, le tabagisme, le type histologique, le stade de la maladie et le type de traitement.

II.2. Collecte des échantillons tumoraux

58 échantillons des patients atteints d'un CBNPC, dont le prélèvement tumoral était éligible pour une étude moléculaire de l'EGFR ont été inclus. Les échantillons tumoraux sont de type 'tissus fixés au formol et inclus en paraffine' ou FFPE (*Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*) archivés au niveau du service d'Anatomie pathologique du CHU de Constantine.

La confirmation du diagnostic histopathologique de CBNPC a été effectuée au sein du service d'Anatomie pathologique sur des prélèvements tissulaires obtenus à partir des biopsies (biopsies pulmonaires et pleurales) ou des dissections des pièces opératoires, adressés principalement par les services de Chirurgie thoracique et de Pneumologie. Ces prélèvements sont utilisés pour la préparation d'échantillons FFPE.

Ce diagnostic est basé sur des études macroscopique, microscopique et complété par une étude immunohistochimique, en analysant l'expression des différents marqueurs cellulaires des CBNPC (TTF1, Napsin A, Cytokératine 7, P63/P40 et Cytokératine 5/6).

II.3. Étude histologique

L'étude histologique correspond à l'examen de prélèvements tissulaires, en analysant des cellules et des tissus par diverses méthodes principalement basées sur la morphologie.

II.3.1. Préparation des coupes histologiques

Les échantillons FFPE ont été préparés à partir des différents types de prélèvements, essentiellement des pièces chirurgicales, des biopsies et des biopsies pleurales, après une étude macroscopique. Elle passe par une série de préparation (*Annexe C*) :

- **Fixation**

Cette étape a pour but de s'opposer à la déshydratation prématurée des cellules et surtout à la putréfaction des tissus. La solution de formol dilué à 10% est utilisée, car il permet de bonnes études immunohistochimique et moléculaire.

- **Déshydratation**

L'échantillon tissulaire est fixé, puis progressivement déshydraté par passages successifs dans des solutions éthanoliques de plus en plus concentrées (60%, 70%, 90%, 95%, 100%) jusqu'à ce que toute l'eau ait été soustraite et que l'échantillon soit totalement imprégné d'éthanol absolu. L'éthanol est ensuite remplacé par un solvant organique (xylène ou toluène) dans lequel peuvent se dissoudre à la fois la paraffine et l'éthanol (la paraffine n'est pas soluble dans l'éthanol).

- **Inclusion en paraffine**

L'échantillon est alors immergé dans la paraffine liquide chauffée à une température dépassant juste son point de fusion, puis celle-ci est solide à température ambiante.

- **Refroidissement**

Une fois l'échantillon bien imprégné, il est laissé refroidir dans un moule rempli de paraffine qui se solidifie (pour former un bloc de paraffine).

▪ **Réalisation des coupes**

En se refroidissant, le fragment, imbibé de paraffine, se trouve inclus dans un bloc solide à partir duquel, grâce à un microtome comportant un rasoir, des coupes de 5 µm d'épaisseur sont obtenues.

▪ **Coloration histologique des coupes par Hématoxyline-Eosine (H&E)**

L'étape de coloration des coupes a été effectuée à l'aide d'une coloration par H&E, qui permet de distinguer clairement les noyaux (en bleu par l'hématoxyline) et le cytoplasme (en rose par l'éosine) des cellules, en utilisant l'automate de coloration (Varistain, Thermofisher scientific).

- Afin d'éliminer la paraffine et réhydrater les tissus, les lames sont prétraitées par l'xylène, déshydraté par passages successifs dans des solutions éthanoliques à concentrations décroissantes (100%, 90% et 70%) ;
- Colorer par l'hématoxyline pendant 4 minutes et rincer à l'eau courante ;
- Rincer à l'alcool acide pendant 10 secondes et rincer à l'eau courante ;
- Colorer dans une solution d'éosine pendant 1 minute et rincer rapidement à l'eau courante ;
- Déshydrater par passages successifs dans l'éthanol (70% et 100%) et dans l'xylène, pendant 5 minutes chacun.

▪ **Montage des lames**

Le montage des lames consiste à les protéger définitivement par une lamelle de verre collée à l'aide de la résine ou d'un produit synthétique qui se polymérise à l'air.

II.3.2. Étude microscopique

L'observation microscopique des lames a été effectuée grâce au microscope optique. Au terme de cette étude morphologique, l'examen histopathologique conventionnel nous a permis de préciser principalement le type histologique et le grade avec envahissement ganglionnaire et métastatique à distance (pTNM), ainsi qu'il permet d'évaluer la densité des cellules tumorales pour l'analyse moléculaire.

II.4. Étude immunohistochimique

L'expression de la protéine EGFR a été évaluée par étude immunohistochimique sur des échantillons FFPE, en utilisant le kit *EnVision+ System* (Dako, Agilent) et respectant le protocole accompagnant ce kit.

II.4.1. Description de la technique

L'immunohistochimie a pour but de mettre en évidence, dans les tissus, des protéines membranaires, cytoplasmiques et/ou nucléaires visualisées grâce à la détection par un anticorps spécifique couplé à un chromogène agissant sur un substrat. La détection est sensibilisée par des méthodes de démasquage antigénique et amplifiée par des réactions immunologiques ou biochimiques améliorant la visualisation du signal. Elle peut être réalisée sur des échantillons FFPE pour la morphologie conventionnelle incluant des prélèvements biopsiques de petite taille, voire sur des prélèvements cytologiques (Antoine, 2007).

Dans notre étude, l'immunohistochimie a été réalisée à l'aide du kit *EnVision+ System* qui est basé sur un système de révélation indirecte. Le principe de ce système est représenté schématiquement par la figure 18.

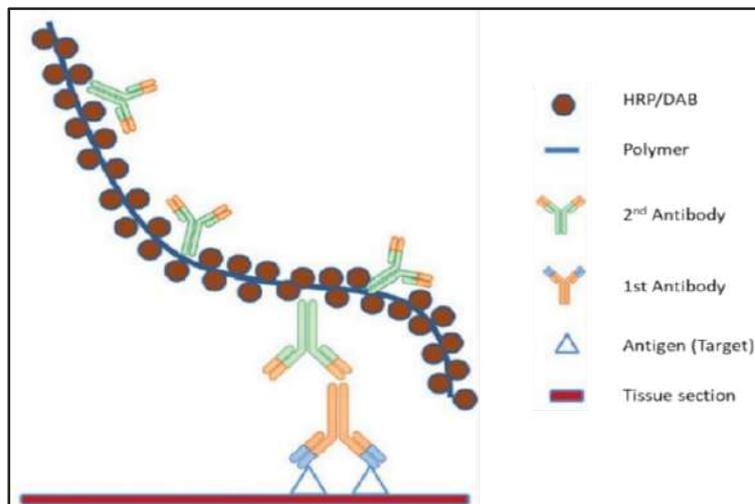


Figure 18 : Principe de la détection indirecte dans la technique immunohistochimique (d'après Shi & Stack, 2015).

L'antigène au niveau du tissu est détecté par un anticorps primaire de lapin qui se lie à un anticorps secondaire anti-lapin. Ce dernier se fixe à un polymère composé d'un dextrane lié à des anticorps de chèvre se fixant aux immunoglobulines de lapin et à de multiples molécules

d'HRP (*Horseradish Peroxydase*). Le montage est ensuite révélé par un système chromogène substrat avec l'ajout de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) et de DAB (Diamino Benzidine).

II.4.2. Technique immunohistochimique

II.4.2.1. Anticorps utilisé

Il s'agit d'un anticorps de Lapin dirigé contre la protéine EGFR humaine dont la référence commerciale est *PLA0101* fourni par Sigma-Aldrich ; reconnaît le domaine extracellulaire du récepteur couvrant la région entre résidus 1150 et le C-terminal (résidu 1210). Il a été utilisé à une dilution de 1 : 1000 avec un diluant appelé *Universal antibody diluent* (Abcam).

II.4.2.2. Protocole détaillé

L'immunomarquage a été réalisé à l'aide du kit *EnVision+ System* (Dako) a été utilisé conformément aux recommandations faites par le fabricant. Les composants du kit ont été adaptés à la température ambiante avant d'être utilisés.

▪ Préparation des coupes

- Des coupes histologiques d'une épaisseur de 4 µm ont été préparées sur des lames silanisées (pour assurer l'adhérence des coupes).
- Elles ont été fixées par incubation dans une étuve à 37°C pendant 24 heures.

▪ Déparaffinage et réhydrations

Le déparaffinage consiste en un prétraitement des lames afin d'éliminer la paraffine et réhydrater les tissus par du xylène, des passages successifs dans des solutions éthanoliques à concentrations décroissantes (100%, 90% et 70%) puis bains dans de l'eau distillée jusqu'à l'utilisation dans l'étape suivante.

▪ Démasquage antigénique (Restauration antigénique par la chaleur)

Pour l'étape de la perméabilisation des membranes et la restauration antigénique, les lames ont été immergées dans du tampon Citrate (pH.6) dans un récipient et incubées dans bain-marie à 95°C pendant 25 à 35 minutes. Après refroidissement et 2 lavages en eau distillée, les lames laissées dans de l'eau jusqu'à utilisation.

▪ **Blocage des peroxydases endogènes**

- Les lames sont placées à température ambiante dans une chambre humide. Cette démarche sera assurée pour toutes les prochaines étapes pour éviter la déshydratation des tissus.
- Afin de bloquer l'activité des peroxydases endogènes présentes dans les cellules et ainsi réduire le bruit de fond, les lames a été incubées avec de l' H_2O_2 3% (*Peroxydase Block Reagent*) pendant 5 minutes.
- Les lames ensuite rincées à l'eau distillée, puis placées dans un bain contenant du tampon PBS pendant 5 minutes afin d'éliminer l' H_2O_2 .
- On délimite les zones sur lesquelles nous appliquerons l'anticorps primaire avec PAP pen qui empêche la diffusion des réactifs (anticorps).

▪ **Anticorps primaire**

- On applique suffisamment de solution d'anticorps primaire anti-EGFR pour couvrir d'échantillon et on incube pendant 1 heure.
- On égoutte les lames et on les fait passer dans 2 bains de lavage par PBS pendant 5 minutes.

▪ **Anticorps secondaire et système révélateurs**

- Puis, les lames sont incubées pendant 30 minutes avec l'anticorps secondaire anti-Lapin (*Labelled polymer-HRP Reagent*) qui correspond à un polymère couplé à l'HRP.
- On égoutte les lames et on les rincer dans 2 bains du PBS pour lavage.
- Le sérum normal de lapin a été utilisé comme témoin négatif de réaction Ag/Ac.
- Pour la révélation du site de réaction Ag/Ac, on applique une solution de substrat DAB pendant 10 minutes. Le DAB est converti en un produit chromogène via le HRP prenant une coloration marronne.
- On rince à l'eau distillée et on égoutte les lames.

▪ **Contre-coloration**

- La contre-coloration doit être minime, suffisant pour visualiser tous les noyaux et pas trop forte pour ne pas empêcher l'appréciation de marquage faible.
- Elle a été réalisée à l'hématoxyline pendant 1 minute, puis on rince les lames à l'eau.
- Les tissus sont ensuite déshydratés par des bains successifs dans l'éthanol (70%, 90% et 100%) puis de Xylène pour la décoloration du cytoplasme et du tissu conjonctif.

- **Montage des lames et observation microscopique**
 - Le montage lame-lamelle s'est effectué de même façon que celle précédemment décrite dans l'étude histologique.
 - L'observation microscopique a été effectuée grâce au microscope optique avec caméra *DM1000* et le logiciel d'acquisition des images *LAS version 3* (Leica).
- **Règles d'interprétation**
 - L'expression de l'EGFR combine le pourcentage des cellules tumorales positives pour le marquage et l'intensité de marquage.
 - La protéine EGFR a été considérée comme surexprimée lorsque plus de 10% des cellules tumorales aient positives avec un degré d'intensité de 2 à 3.

II.5. Étude du statut mutationnel de l'EGFR

Les exons 19, 20 et 21 du gène EGFR ont été séquencés pour chercher la présence des mutations. La lignée H1975 achetée à l'ATCC (*American Type Culture Collection*), qui est une lignée cellulaire humaine d'adénocarcinome pulmonaire, a été utilisée comme contrôle positif pour la détection de mutations de l'EGFR. Cette lignée exprime la mutation L858R dans l'exon 21 et la mutation T790M (mutation de résistance aux TKIs) dans l'exon 20.

II.5.1. Extraction et quantification de l'ADN génomique

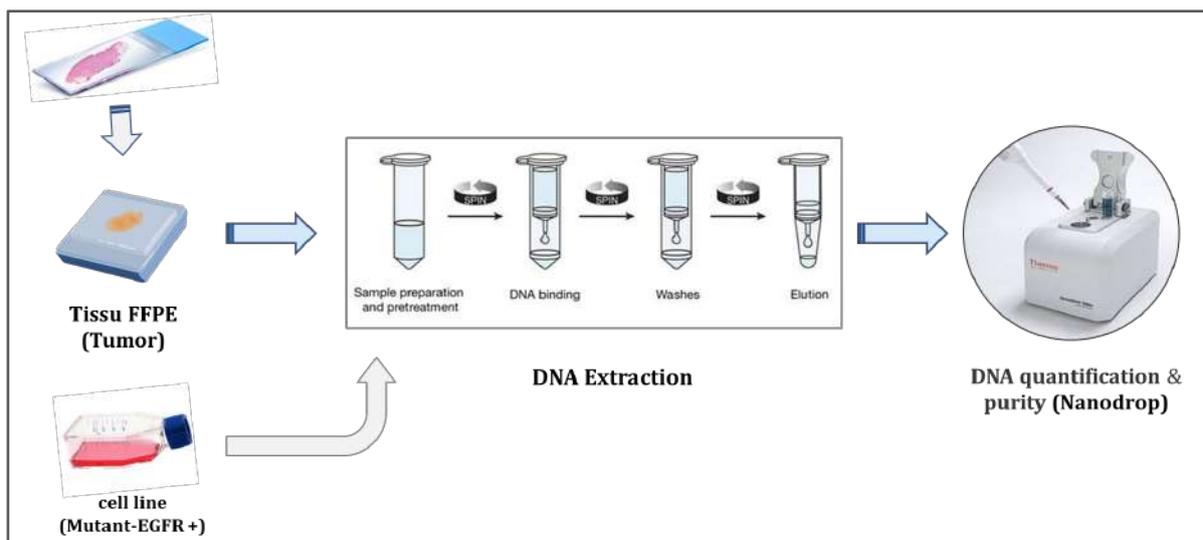


Figure 19 : Schéma représentatif de la méthodologie adoptée pour l'extraction et la quantification de l'ADN dans notre étude.

▪ **Extraction de l'ADN à partir des échantillons FFPE**

➤ Préparation des échantillons FFPE :

- L'évaluation de densité des cellules tumorales sur des coupes histologiques (H&E).
- La préparation de 5 à 8 coupes histologiques de 10 µm d'épaisseur de tissu tumoral (FFPE) à l'aide d'un microtome et collectées dans un microtube de 2 ml.
- Le tissu a été déparaffiné par incubation avec du xylène pendant 10 minutes, puis une étape de centrifugation pour précipiter le tissu. Le surnageant contenant du xylène a été enlevé.
- Le tissu a été incubé avec de l'éthanol absolu pendant 30 secondes pour éliminer les traces du xylène.
- Le culot (tissu) a été ensuite laissé sécher à l'air libre ou à 37°C pendant 15 minutes.

➤ Extraction d'ADN tissulaire :

L'extraction d'ADN a été ensuite réalisée avec le kit *AllPrep DNA/RNA FFPE* (Qiagen) selon les recommandations du fabricant. Les étapes suivies sont :

- Étape de lyse :

Le culot a été resuspendu dans 180 µl de solution de lyse *Buffer ATL* et 40 µl de la Protéinase K avec agitation au vortex. Puis la suspension a subi deux étapes successives d'incubation pendant 1 heure à 55°C et 2 heures à 90°C, suivi d'une étape de digestion par la RNase-A pendant 2 minutes en vue de prévenir une éventuelle contamination par l'ARN.

- Filtration de lysat (tissu lysé) sur colonne de gel de silice pour récupérer de l'ADN :

Le lysat a été resuspendu dans une solution contenant 200 µl du tampon *AL* et 200 µl de l'éthanol et transféré dans une colonne de gel de silice (*QIAamp MinElute spin column*) placée dans un tube collecteur de 2 ml. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 1 minute à $\geq 10,000$ rpm (rotation par minute).

- Étape du lavage de l'ADN fixé :

La colonne de gel de silice contenant de l'ADN fixé a été déposée dans un nouveau tube de 2 ml, puis a subi trois étapes du lavage successives, en utilisant les tampons *AW1*, *AW2* et de l'éthanol, respectivement, avec centrifugation à $\geq 10,000$ rpm pendant 15 seconds chacune. Les tubes ont été ensuite séchés par centrifugation à vitesse maximale

pendant 5 minutes (le couvercle ouvert de la colonne) pour éliminer les traces de l'éthanol.

- Élution de l'ADN :

Il s'agit d'introduire 35 µl du tampon d'élution *AE* au centre de la colonne de gel de silice, placé dans un tube collecteur de 1.5 ml et laisser pendant 5 minutes à température ambiante. Puis il a été centrifugé à une vitesse maximale pendant 1 minute pour éluer la solution d'ADN.

▪ **Extraction de l'ADN à partir de lignée cellulaire**

➤ Culture cellulaire :

- Les cellules adhérentes (la lignée H1975) sont cultivées dans du milieu RPMI-1640, supplémenté de 10% de sérum de veau bovin et 1% d'antibiotiques, à 37°C et en atmosphère humide à 5% de CO₂.
- Lorsque le tapis cellulaire a atteint environ 80% de confluence, les cellules ont été lavées par le tampon *PBS* et collectées par centrifugation.

➤ Extraction d'ADN cellulaire :

L'ADN a été extrait à l'aide du kit *QIAamp DNA* (Qiagen) selon les recommandations faites par le fabricant, en passant par les étapes précédemment mentionnées pour l'extraction de l'ADN tissulaire, brièvement :

- Le culot cellulaire a été lysé par incubation avec la Protéinase K et la RNase pendant 2 minutes.
- Il a subi une étape d'incubation avec le tampon de lyse *ATL* à 70°C (bain-marie) pendant 10 minutes. Suivi d'une filtration du lysat cellulaire sur une colonne de gel de silice avec du tampon *AL* et de l'éthanol.
- L'ADN fixé a été lavé sur le gel de silice avec les tampons *AW1* et *AW2*, respectivement.
- Le tampon *AE* a été utilisé pour l'élution de l'ADN fixé.

▪ **Quantification et évaluation la pureté de l'ADN**

À la fin de l'étape de l'extraction, la quantité et la pureté des échantillons d'ADN ont été évaluées par dosage d'absorbance, en utilisant le spectrophotomètre (UV-visible) de microvolume *NanoDrop 8000* (Thermo Scientific).

➤ Description de la technique du dosage spectrophotométrique :

Les bases purines et pyrimidines constituant l'ADN et l'ARN absorbent fortement à la longueur d'onde de 260 nm (nanomètre). L'absorbance à 260 nm (A_{260}) permet de quantifier l'ADN ; une unité d'absorbance correspond à une solution d'ADN double brin de 50 µg/ml. La mesure de l'absorbance à 280 nm (A_{280}) permet d'estimer la présence de contaminants protéiques et à 230 nm (A_{230}) de contaminants phénoliques. Les deux rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} permettent d'estimer la pureté des échantillons d'ADN. Une solution pure d'ADN doit avoir des valeurs comprises entre 1,8 et 2 pour le rapport A_{260}/A_{280} et entre 2 et 2,2 pour le rapport A_{260}/A_{230} (Tagu et al, 2018).

➤ Protocole :

- Un volume de 1 µl d'échantillon a été déposé sur le socle de *NanoDrop* en vue de mesurer d'absorbance à la longueur d'onde de 260 et 280 nm.
- Le tampon de l'élution *AE* de kits d'extraction (Qiagen) a été utilisé comme blanc.
- Le résultat du dosage montre la concentration de l'échantillon, les rapports de pureté et le profil du spectre d'absorbance.

II.5.2. Détection des mutations par PCR et séquençage capillaire

II.5.2.1. Description du séquençage d'ADN par la technique Sanger

Principe de la technique Sanger

La méthode des didésoxy (ddNTP) ou technique de terminaison de chaîne, appelée communément méthode de Sanger (Figure 20), développée principalement par Frederick Sanger fondée sur la synthèse par l'ADN polymérase-I d'un brin d'ADN complémentaire radio-marqué ou fluorescent (Sanger et al, 1977).

Brièvement, d'abord le fragment d'ADN ciblé est amplifié par PCR puis de le dénaturer afin d'obtenir un simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin ciblé, identique ou différente de celle utilisée pour la PCR, un ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce, de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3', il ajoute les désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) complémentaires et de manière aléatoire et inconstante des di-dNTP (ddNTP).

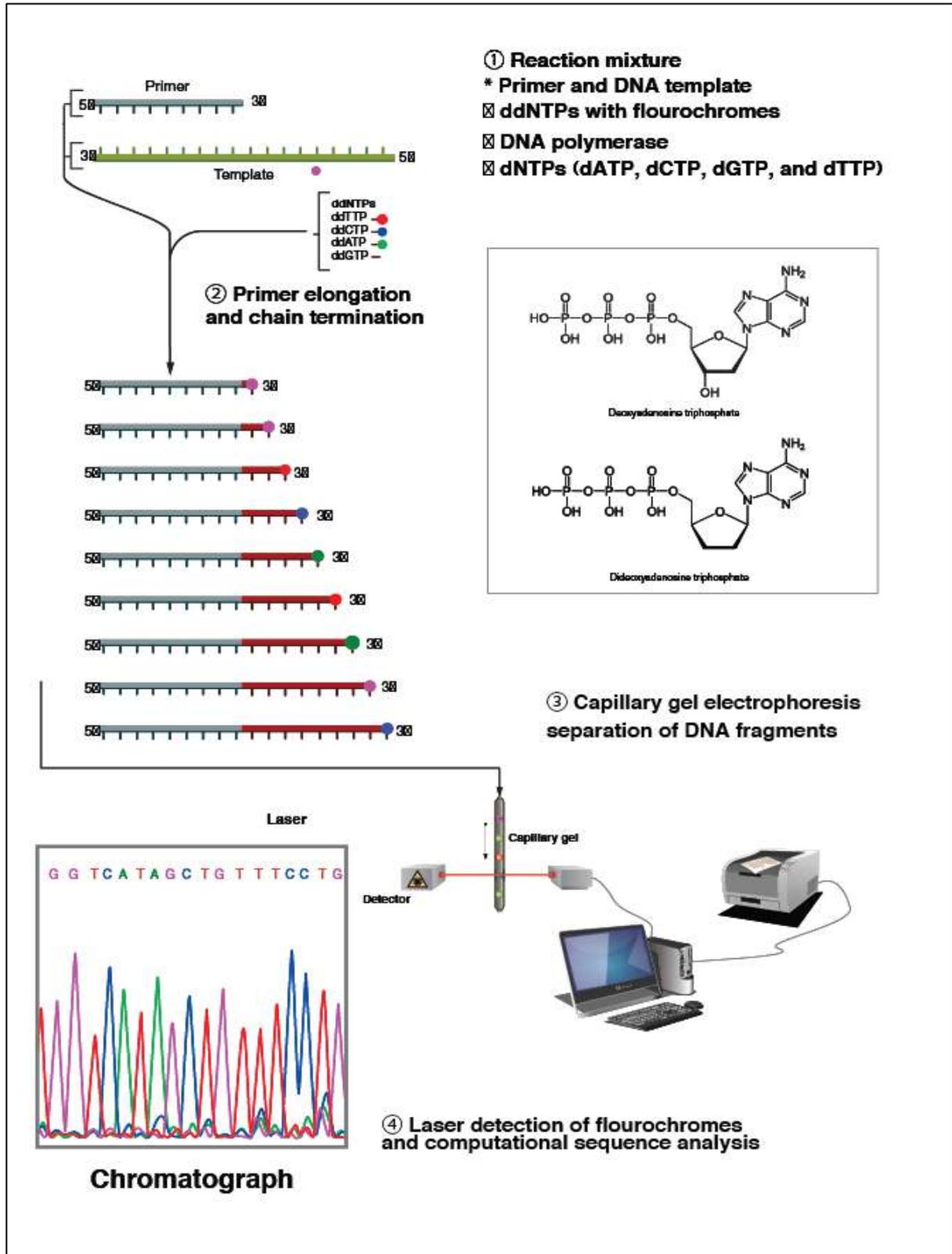


Figure 20 : Principe du séquençage par la méthode Sanger.

La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP sont marqués à l'aide de fluorophores différents pour chaque ddNTP (4 couleurs), mise au point pour la première fois en 1986 par Smith et *al.* Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, la réaction d'extension s'arrête (ddNTP ne possède pas de groupe 3'-OH). Ainsi, les 4 réactions avec les 4 ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP ou ddTTP) permettent d'obtenir statistiquement autant de fragments interrompus de tailles différentes que de nucléotides de la séquence analysée. L'analyse de la réaction est ensuite effectuée par différentes méthodes. Aujourd'hui, l'électrophorèse capillaire réalisée sur un automate de séquençage, lors de la migration, chaque fragment (ddNTP marqué par un fluorophore) sera excité par un laser et le signal obtenu analysé par un logiciel spécifique (Lamoril et *al.*, 2008).

▪ **Méthodologie du séquençage direct**

Contrairement à la méthode indirecte du séquençage qui nécessite d'abord de cloner la séquence d'ADN ciblée dans un plasmide (bactérie ou levure), en se multipliant pour avoir un grand nombre de copies de cette séquence qui ensuite peut être séquencée, la méthode directe est caractérisée par le séquençage direct de la séquence d'ADN ciblée.

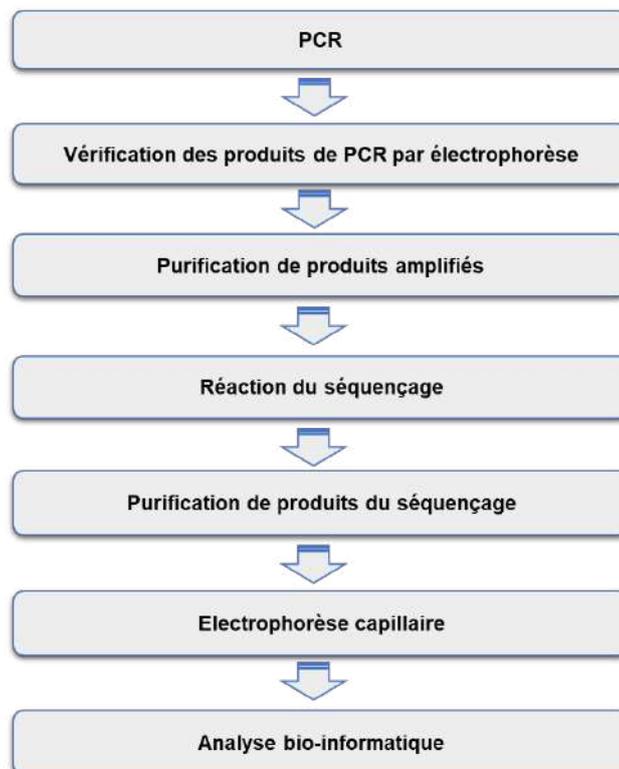


Figure 21 : Méthodologie du séquençage capillaire directe.

Elle consiste en une PCR en utilisant des amorces doubles-sens spécifiques de chaque séquence ciblée, suivie d'une vérification du produit de PCR sur gel d'agarose et d'une purification de produits amplifiés et par la suite le séquençage de fragments d'ADN ciblés (Figure 21) ; s'effectue en trois étapes (*Annexe E*) :

- La réaction du séquençage ;
- La purification de produits du séquençage ;
- L'électrophorèse capillaire réalisée à l'aide d'un séquenceur automatisé.

III.5.2.2. Protocole détaillé du séquençage

▪ **Polymerase Chain Reaction (PCR)**

Les amorces choisies ayant permis d'amplifier les exons 19, 20 et 21 du gène EGFR, validées par Tae-Won Jang *et al.* (2009), dont l'amplicon correspond à une longueur de 219, 185 et 350 pb, respectivement (Tableau 6). Après la mise au point de la température d'hybridation (Tm) des amorces. Tm de 57°C a été appliquée pour les réactions de PCR et de séquençage.

Tableau 6 : Séquences et caractéristiques des amorces utilisées.

Exon	Séquence		Tm	Amplicon
Exon 19	Forward	5'- ATGTGGCACCATCTCACAATTGCC-3'	57°C	219 pb
	Reverse	5'- CCACACAGCAAAGCAGAAACTCAC-3'		
Exon 20	Forward	5'- CATTCATGCGTCTTCACCTG-3'		185 pb
	Reverse	5'- CATATCCCCATGGCAAACCTC-3'		
Exon 21	Forward	5'- GCTCAGAGCCTGGCATGAA-3'		350 pb
	Reverse	5'- CATCCTCCCCTGCATGTGT-3'		

La PCR a été réalisée avec le kit *AmpliTaq Gold 360 master mix* fourni par *Applied Biosystems* (Life Technologies), comprenant le master mix *AmpliTaq Gold 360* et la solution *GC Enhancer*. Ce master mix est composé de différents éléments, avec des conditions optimisées, nécessaires au bon fonctionnement de la PCR sur différents types échantillons d'ADN. Le principal composant du master mix est l'*AmpliTaq Gold DNA* polymérase qui est

une enzyme très sensible et se trouve à l'état inactif à température ambiante garantissant la stabilité du mix tout au long de sa préparation et à l'état actif après une étape de chauffage. De plus, la solution *GC Enhancer* est utilisée pour cibler les fragments d'ADN à teneur élevée en GC qui sont difficiles à amplifier dans les conditions conventionnelles de PCR.

Nous avons utilisé la technique de PCR en suivant le protocole standard du fournisseur. Les conditions de PCR sont notées dans le tableau 7.

Tableau 7 : Mélange réactionnel de PCR.

PCR	Volume (µl)	Concentration
Master mix	12.5	1X
GC Enhancer	0.5	//
Amorce Forward	1.2	0.3 µM
Amorce Reverse	1.2	0.3 µM
ADN dilué	5	50 à 100 ng
Eau stérile	4.6	//
Volume total	25	//

Une fois tous les éléments réunis et mixés, l'échantillon est placé dans un thermocycleur *C1000* (Bio-Rad), puis traité selon les températures et les durées issues des recommandations du fabricant, en utilisant la T_m de nos amorces (Tableau 8).

Tableau 8 : Conditions de thermocyclage pour la réaction de PCR.

Étape	Température	Durée	
Activation de l'enzyme	95°C	10 minutes	//
Dénaturation	95°C	30 secondes	35 cycles
Hybridation	57°C	30 secondes	
Elongation	72°C	30 secondes	
Extension finale	72°C	7 minutes	//

▪ **Vérification des produits de PCR par électrophorèse :**

Les amplicons obtenus ont été révélés par une électrophorèse sur gel d'agarose. Il consiste en un gel à 2% d'agarose, contenant un colorant appelé *SYBR safe DNA gel stain* à une concentration de 0.001% (Invitrogen) et un tampon *TBE*. L'ADN a été préparé avec du tampon de charge (0,25% bleu de bromophénol, 0,25% xylène cyanol et 30% glycérol) et déposé dans un des puits du gel. Ainsi qu'un marqueur de poids moléculaire de 100 pb (Invitrogen) a été utilisé pour identifier la taille du fragment ciblé. Les échantillons d'ADN déposés (charge négative) vont migrer dans un tampon *TBE* de la cathode vers l'anode via un champ électrique (120V) pendant 30 minutes. Les produits de PCR séparés ont été ensuite visualisés à l'aide du système d'imagerie *Gel Doc XR+* (Bio-Rad), sous forme de bandes, comme montrés dans la figure 22.

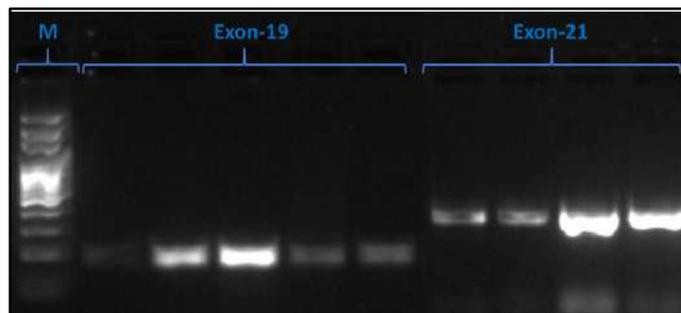


Figure 22 : Électrophorèse sur gel d'agarose pour la détection des exons 19 et 21 de l'EGFR. Présence de bandes correspondant aux séquences des exons 19 (219pb) et 21 (350pb) avec le marqueur de taille 100pb (M).

▪ **Purification de produits amplifiés**

Les fragments d'ADN amplifiés ont été purifiés à partir du gel ou directement du mix de la réaction de PCR, afin d'éliminer tous les composés en excès dans le mix (enzyme, dNTPs, amorces, $MgCl_2$). Nous avons utilisé le kit *PureLink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo* (Invitrogen) selon les recommandations du fournisseur.

Le fragment du gel contenant l'ADN a été dissous par incubation avec le tampon de solubilisation *L3* à 50°C (bloc chauffant) et agitation au vortex. Suivi d'une filtration sur la colonne *PureLink Clean-up Spin Column*. Les tubes ont été ensuite centrifugés pendant 1 minute à $\geq 10,000$ rpm. La colonne contenant l'ADN fixé a été ensuite déposée dans un

nouveau tube et subie d'une étape de lavage, en utilisant le tampon *AWI*, avec centrifugation à $\geq 10,000$ rpm pendant 1 minute. Les tubes ont été ensuite séchés par centrifugation à une vitesse maximale pendant 2 à 3 minutes pour éliminer les traces du tampon de lavage. 35 μ l de la solution d'éluion *Buffer AE* a été utilisé, avec centrifugation à une vitesse maximale pendant 1 minute pour l'éluion de l'ADN.

▪ **Séquencage**

Les produits d'amplification purifiés ont été séquencés à l'aide du kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing version 3.1* sur le séquenceur capillaire *ABI Prism 3500xl* de la compagnie Applied Biosystems (*Annexe E*).

La réaction de séquencage a été réalisée en suivant le protocole recommandé du fabricant, en utilisant les mêmes amorces que pour la PCR, en présence des produits suivants :

- 6 microlitres BigDye ready reaction mix ;
- 3 microlitres BigDye sequencing buffer ;
- 1 microlitre d'amorces Forward ou Reverse ;
- Produit de PCR purifié (25 – 40 ng) ;
- Compléter le volume à 20 μ l avec de l'eau stérile.

Les mélanges réactionnels ont été ensuite traités au sein d'un thermocycleur selon le programme suivant (Tableau 9) :

Tableau 9 : Conditions de thermocyclage pour la réaction de séquencage

Température	Durée	
96°C	10 secondes	35 cycles
50°C	5 secondes	
60°C	4 minutes	

- **Purification des produits de séquençage**

La purification des réactions de séquençage a été réalisée par le kit *BigDye XTerminator Purification* (Applied Biosystems, Lifetechnologies) pour éliminer les autres éléments restant dans la solution (contenant de l'ADN) : amorces, dNTP, ddNTP et l'enzyme. Nous avons suivi le protocole recommandé du fabricant : 20µl de *BigDye X-terminator* (billes) et 90µl de *SAM* (détergent), volumes pour chaque puits, ont été mixés et mélangés avec le produit de séquençage (contenant de l'ADN). La plaque de 96 puits a été vivement agitée pendant 30 min, suivie d'une centrifugation pour précipiter les éléments en excès ainsi que les sels au fond du tube (par les billes).

- **Électrophorèse capillaire**

L'électrophorèse des réactions de séquençage purifiées a été réalisée à l'aide du *3500xL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) pour analyser les fragments d'ADN ciblés. Cet appareil est un séquenceur automatique doté de 24 capillaires, basé sur le principe de l'électrophorèse capillaire. L'analyse spectrale permet alors d'assigner la base correspondante et ainsi de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice. Le logiciel *SeqScape Software version 3* (Applied Biosystems) a été utilisé pour l'analyse des données créées par le séquenceur, présentées sous forme des électrophorégrammes, afin de vérifier leurs qualités.

- **Analyse bio-informatique**

Les séquences nucléotidiques extraites ont été alignées et comparées avec la séquence du gène EGFR (Référence : NG_007726.3) répertoriée dans la base de données GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/399923581>), via l'outil bioinformatique « LALIGN » (*Expasy, SIB Swiss Institute of Bioinformatics*). Les chromatogrammes des séquences obtenus sont ensuite analysés par le logiciel *Unipro UGENE version 36* (Okonechnikov et al, 2012) pour identifier et confirmer la présence des mutations.

CHAPITRE III
RÉSULTATS

I. Profil épidémiologie et clinico-pathologique des patients

Un nombre total de 169 patients ayant un CBP, avec des résultats anatomopathologiques définitifs au niveau du CHU de Constantine, ont été inclus dans l'étude épidémiologique. Les données ont été colligées à partir de dossiers des patients sur une période de 5 ans (juin 2015 - décembre 2020) incluant : l'âge, le sexe, le tabagisme, le type histologique, le stade tumoral et le traitement.

Ces paramètres clinico-pathologiques ont été examinés en prenant en compte le manque des données détaillées pour certains patients au sein de notre population d'étude, les données étaient disponibles pour :

- Tous les patients concernant le sexe, l'âge et le type histologique ;
- 153 sur 169 patients concernant le tabagisme, le stade tumoral et le traitement ;
- 127 sur 169 patients concernant les signes cliniques et les autres facteurs de risque (profession et antécédents).

I.1. Sexe

Les patients atteints de CBP dans notre population sont caractérisés par prédominance du sexe masculin. Nous dénombrons 148 hommes (87.6%) et 21 femmes (12.4%), soit un sex-ratio masculin de 7.4.

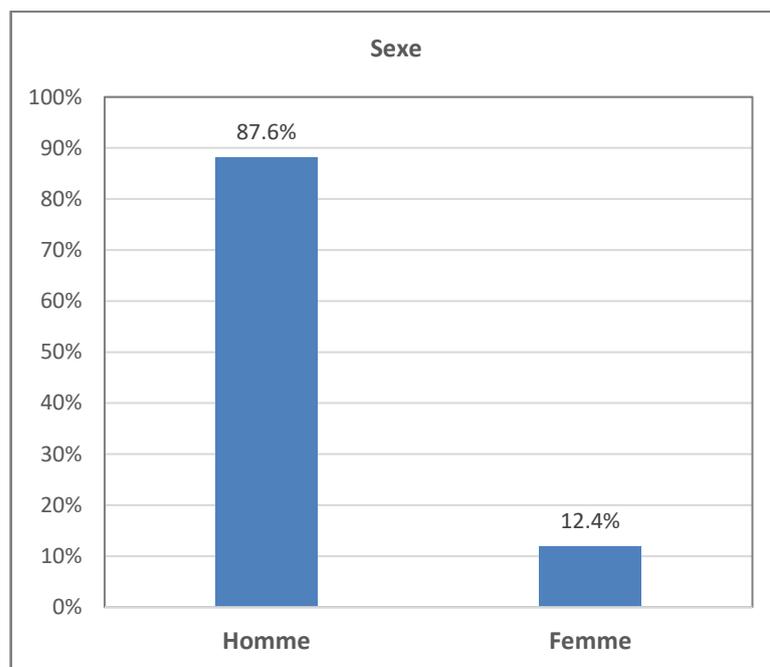


Figure 23 : Répartition de la population étudiée selon le sexe.

I.2. Âge

Les sujets ont été regroupés en fonction d'âge en 5 groupes : < 40, 40-49, 50-59, 60-69 et ≥ 70 ans (Figure 24). L'âge médian était de 61 ans et un pic de fréquence entre 32 et 94 ans. La tranche d'âge de 50 à 70 ans représente environ 66% des cas, tandis que les patients de moins de 40 ans représentent seulement 3%.

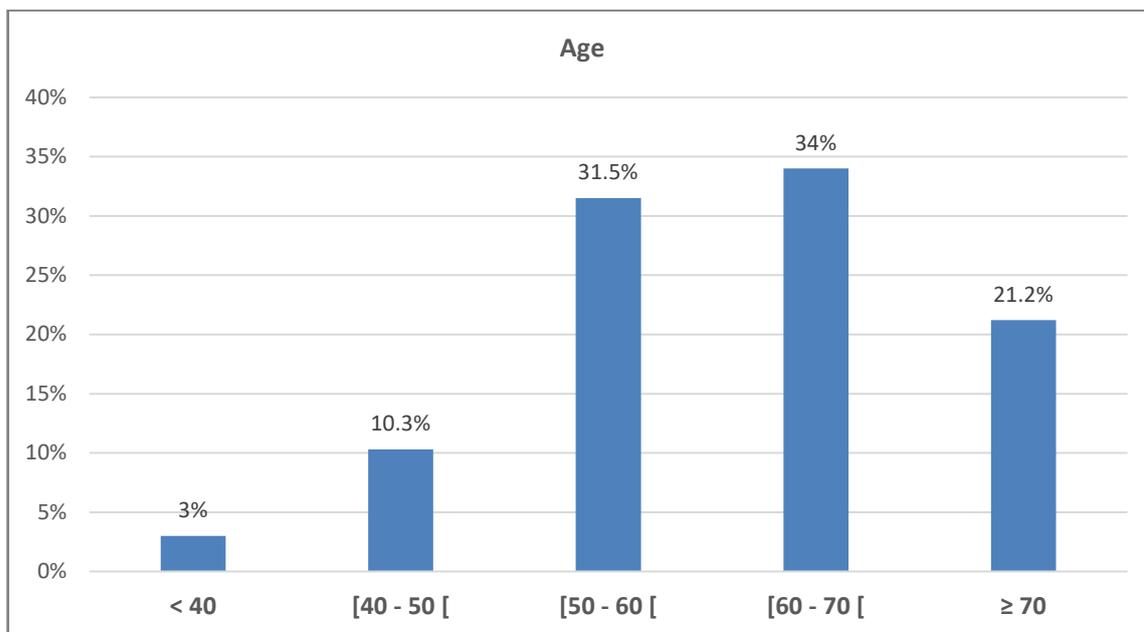


Figure 24 : Distribution de la population étudiée selon l'âge.

I.3. Facteurs de risque

▪ Tabagisme

L'analyse du statut tabagique a montré que 104 sur les 153 cas examinés étaient des fumeurs, soit 68%, dont 62.7% des fumeurs actifs et 5.3% ex-fumeurs (Figure 25). En tenant compte que toutes les femmes (20 cas) étaient non-fumeurs, le tabagisme est estimé à 78.2% chez l'homme. Chez les non-fumeurs (49 cas), les femmes représentent 40.8% et les hommes 59.2%.

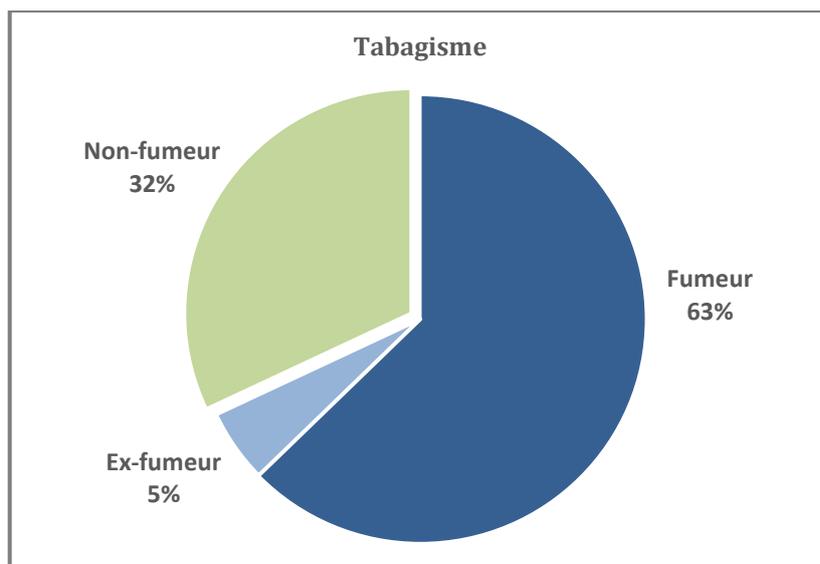


Figure 25 : Distribution de la population étudiée selon le statut tabagique.

- **Autres facteurs de risque**

- **Profession :**

Parmi les 127 patients examinés, 9 cas soit environ 7%, ont dans leurs professions, une exposition probable aux carcinogènes notamment aux carburants.

- **Antécédents personnels et familiaux :**

Notre étude a révélé que 14 sur 127 patients présentaient des antécédents personnels de maladies pulmonaires, soit 11%, telles que la BPCO, l'emphysème pulmonaire et la tuberculose. D'autre part, 59 cas ayant de maladies chroniques, soit environ 46.4%, dont l'hypertension artérielle représente 16.6%, le diabète 14.2% et d'autres pathologies 15.7%. De plus, 8,6% des cas avaient des antécédents personnels de cancers ou de tumeurs bénignes en particulier l'hypertrophie de la prostate et environ 15.8% des antécédents familiaux de cancers.

I.4. Signes cliniques

Le tableau 10 représente les principaux symptômes rapportés chez les patients examinés (127 cas). La dyspnée, la toux, les douleurs thoraciques et l'hémoptysie sont les symptômes les plus fréquents.

Tableau 10 : Répartition des patients selon les Signes cliniques.

Symptômes	N = 127
Dyspnée	33 (26%)
Toux	29 (23%)
Douleurs thoraciques	22 (17%)
Hémoptysie	14 (11%)
Autres	13 (10%)
Asymptomatique	16 (13%)

I.5. Type histologique

Le tableau 11 représente la répartition des patients selon leur diagnostic histologique, conformément à la nouvelle classification de l'OMS (2015).

Tableau 11 : Répartition des patients selon le type histologique.

Type histologique	N = 169
Adénocarcinome (ADK) :	95 (56.2%)
Adénocarcinome	82
En faveur d'un adénocarcinome	13
Carcinome squameux ou épidermoïde (CE) :	39 (23%)
Carcinome épidermoïde	28
En faveur d'un carcinome épidermoïde	11
Autres types du CBNPC :	13 (8%)
Carcinome à grandes cellules (CGC)	4
Carcinome adénoquameux	6
NOS (<i>Not Otherwise Specified</i>)	3
Carcinome à petites cellules (CBPC)	9 (5.4%)
Carcinome neuroendocrine à grandes cellules (CNEGC)	6 (3.6%)
Autres types :	7 (4.2%)
Sarcome	2
Carcinome	2
Autres	3

I.6. Stade tumoral

Parmi les 153 patients examinés, plus de 78% des cas présentaient au moment du diagnostic un stade avancé, localement avancé (près de 21%) ou métastatique (57%), comme rapporté dans le tableau 12. Les localisations des métastases les plus souvent observées étaient l'épanchement pleural (39.7%), suivi par la localisation osseuse (27.2%) et cérébrale (13.5%).

Tableau 12 : Répartition des patients selon le stade tumoral.

Stade	N = 153		
Non métastatiques	65 (42.5%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Stade I ▪ Stade II ▪ Stade III ▪ Stade indéterminé 	<p>4 (2.6%)</p> <p>22 (14.3%)</p> <p>32 (20.8%)</p> <p>7 (5.2%)</p>
Métastatique (Stade IV)	88 (57.5%)	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Épanchement pleural ▪ Osseux ▪ Cérébral ▪ Surrénal ▪ Hépatique ▪ Indéterminé 	<p>35 (39.7%)</p> <p>24 (27.2%)</p> <p>12 (13.5%)</p> <p>6 (6.8%)</p> <p>3 (3.4%)</p> <p>8 (9.4%)</p>

I.7. Données thérapeutiques

▪ **Traitement**

Prenant en compte l'indisponibilité de données thérapeutiques pour tous les patients, près de 60% des patients étaient traités par chimiothérapie, tandis que 22,2% et 18,3% étaient traités par radiothérapie et chirurgie, respectivement (Tableau 13). Pour les patients traités par chimiothérapie, 81 % des cas ont reçu une chimiothérapie de première ligne de traitement.

▪ **Test moléculaire de l'EGFR**

Dix patients atteints de CBNPC accueillis au sein du service d'oncologie médicale (CHU de Constantine) ont bénéficié du test moléculaire de l'EGFR. Parmi ces patients, trois présentaient une mutation de l'EGFR, soit environ 33.4%.

Tableau 13 : Répartition des patients selon les modalités thérapeutiques

Type de traitement	N = 153
<u>Chimiothérapie</u>	
Oui	91 (59.7%)
Non	62 (40.3%)
<u>Radiothérapie</u>	
Oui	34 (22.2%)
Non	119 (77.8%)
<u>Traitement chirurgical</u>	
Oui	28 (18.3%)
Non	125 (81.7%)

II. Étude du statut EGFR dans le CBNPC

II.1. Caractéristiques des patients :

Les caractéristiques clinico-pathologiques de 58 patients atteints de CBNPC impliqués dans l'étude des mutations et de l'expression de l'EGFR sont montrées dans le tableau 14.

- Il s'agit de 53 hommes (91.4%) et 5 femmes (8.6%).
- L'âge médian était de 59 ans [écart interquartile (EI) : 44 – 94].
- Les patients ont été classés selon leur diagnostique histologique comme suit :
27 cas d'adénocarcinome (ADK), 9 en faveur d'un ADK, 8 carcinome épidermoïde (CE), 8 en faveur d'un CE et 6 présentant d'autres types de CBNPC.
- Le statut tabagique et le stade tumoral n'ont pas pu être recueillis pour 17 (29.3%) et 10 (17.2%) patients, respectivement.

Tableau 14 : Caractéristiques clinico-pathologiques des patients inclus dans l'étude du statut EGFR.

Paramètre	N = 58
<u>Âge</u>	
Médian, ans [écart interquartile]	59 [44 - 94]
≥ 60	29 (50%)
< 60	29 (50%)
<u>Sexe</u>	
Homme	53 (91.4%)
Femme	5 (8.6%)
<u>Tabagisme</u>	
Fumeur	24 (41.4%)
Non-fumeur	17 (29.3%)
Non disponible (N/D)	17 (29.3%)
<u>Type histologique</u>	
Adénocarcinome	27 (46.5%)
En faveur d'un adénocarcinome	9 (15.5%)
Carcinome épidermoïde	8 (14%)
En faveur d'un carcinome épidermoïde	8 (14%)
Autres types	6 (10%)
<u>Stade tumoral</u>	
I – III	27 (46.5%)
IV	21 (36.2%)
N/D	10 (17.2%)
<u>Type de prélèvements</u>	
Pièce chirurgicale	32 (55.2%)
Biopsie	18 (31%)
N/D	8 (13.8%)

II.2. Mutations du gène EGFR

Taux de mutations du gène EGFR

Sur les 58 échantillons où l'analyse a été réalisée, les mutations de l'EGFR ont été détectées chez 23 patients, soit 39,6 % (Figure 26).

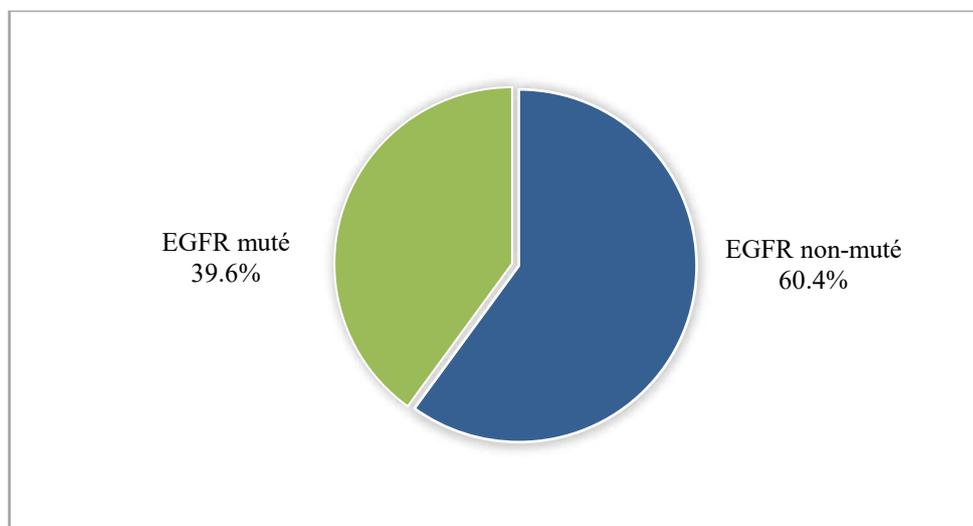


Figure 26 : Fréquence de mutations du gène EGFR dans la population de notre étude.

▪ **Types de mutations du gène EGFR**

➤ Exon 21 :

Dans les cas avec un EGFR muté, la mutation ponctuelle L858R dans l'exon 21 a été détectée dans 19 sur 23 cas, soit 91,3 %.

➤ Exon 21/19 :

La coexistence de deux mutations (dual ou double), L858R dans l'exon 21 et délétions dans l'exon 19, ont été détectées dans 2 sur 23 cas, soit 8,7%.

- Le premier patient porte une double mutation « la mutation L858R et la mutation DelL747_P753insS dans l'exon 19.
- Le deuxième patient ayant une double mutation « la mutation L858R et la mutation DelE746_A750 dans l'exon 19.

➤ Exon 20 :

Il n'a pas été détecté de mutations de l'exon 20.

La figure 27 représente des exemples de types de mutations du gène EGFR identifiées dans notre étude, en forme d'électrophérogrammes (séquençage capillaire).

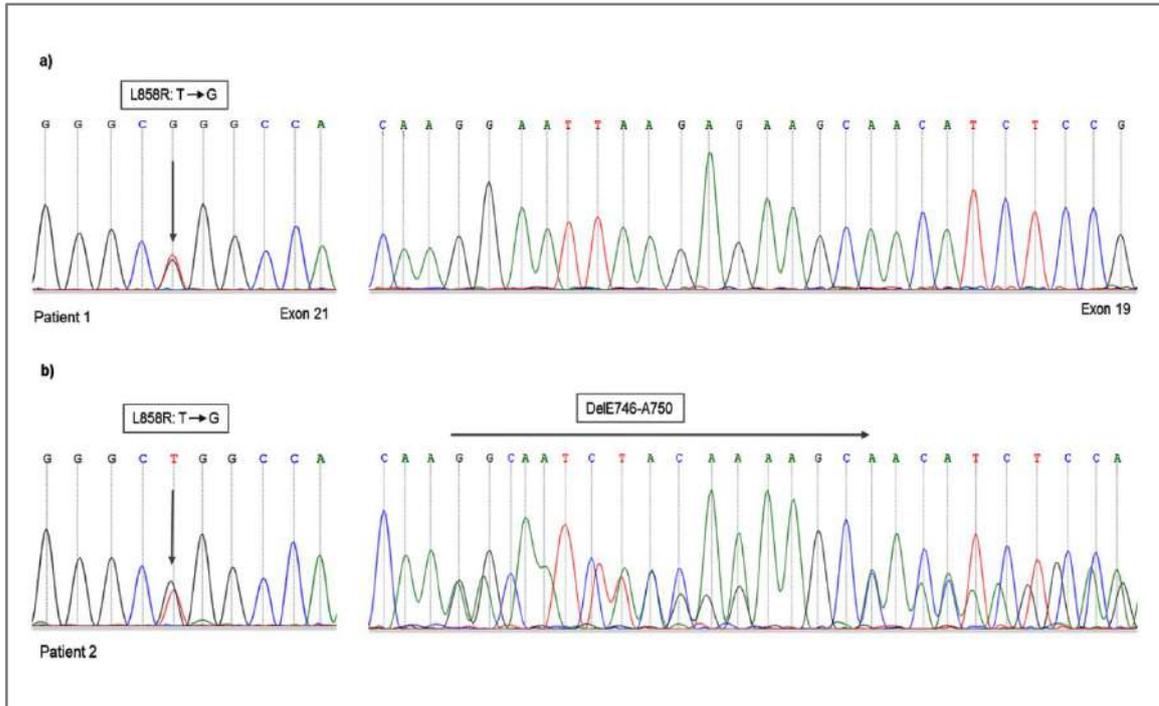


Figure 27 : Exemples des mutations de l'EGFR identifiées dans notre étude. a) Patient 1 : porteur la mutation ponctuelle L858R dans l'exon 21, avec exon 19 non muté (sauvage). b) Patient 2 : porteur double mutation (L858R et délétion DelE746_A750 dans l'exon 19).

II.3. Profil clinico-pathologique des patients présentant une mutation de l'EGFR

Histologie

Sur le nombre total des échantillons (58 cas), les mutations de l'EGFR étaient plus souvent observées chez les patients présentant un adénocarcinome (16 sur 36 cas, soit 44.4%) que les autres types histologiques (7 sur 22 cas, soit 31.8%), mais la différence n'est pas statistiquement significative.

Cependant, l'analyse de sous-groupe des patients avec du diagnostic anatomo-pathologique confirmé en termes du type histologique (41 cas), en excluant les cas diagnostiqués en faveur d'un adénocarcinome ou en faveur d'un carcinome épidermoïde, une différence significative a été trouvée entre l'adénocarcinome (14 sur 27 cas, soit 51,8%) et les autres types histologiques (3 sur 14 cas, soit 20,8%), avec valeur $p = 0.03^*$ (Tableau 15).

D'autre part, une fréquence élevée de ces mutations a été observée dans des cas diagnostiqués en faveur d'un carcinome épidermoïde 4 sur 8 cas, soit 50%.

Tableau 15 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l'EGFR et le type histologique.

Type histologique	Total N = 58	EGFR Muté N = 23	EGFR non muté N = 35
<u>Adénocarcinomes :</u>			
- Adénocarcinome*	27	14 (51.8%)	13 (48.2%)
- En faveur d'un adénocarcinome	9	2 (22.2%)	7 (77.8%)
Total	36	16 (44.4%)	20 (55.6%)
<u>Non-adénocarcinomes :</u>			
- Carcinome épidermoïde	8	2 (25%)	6 (75%)
- En faveur d'un carcinome épidermoïde	8	4 (50%)	4 (50%)
- Autres types histologiques	6	1 (16.6%)	5 (83.4%)
Total	22	7 (31.8%)	15 (68.2%)

▪ **Stade tumoral**

Les mutations de l'EGFR étaient plus fréquemment observées dans les tumeurs de patients avec un stade non métastatique (51,8%) en comparaison avec les patients présentant un stade métastatique (23,8%), avec une différence significative, $p = 0,02^*$ (Tableau 16).

Tableau 16 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l'EGFR et le stade tumoral.

Stade	EGFR Muté N = 23	EGFR non muté N = 35	<i>p</i>
Stade I – III*	14 (51.85%)	13 (48.15%)	0.02
Stade IV	5 (23.8%)	16 (76.19%)	
N/D	4 (40%)	6 (60%)	

▪ **Caractéristiques cliniques des patients**

Le tableau 17 représente le taux de mutations de l'EGFR selon les paramètres cliniques (l'âge, le sexe et le tabagisme) dans notre population d'étude.

- L'âge médian des patients ayant une mutation de l'EGFR au moment du diagnostic était de 58 ans [EI : 47 – 73].
- Il s'agit de 22 sur 53 hommes (41.5%) et 1 sur 5 femmes (20%) présentant une mutation de l'EGFR.
- Le statut tabagique était connu pour 41 cas, 6 sur 17 cas (35.3%) étaient non-fumeur et 9 sur 24 cas (37.5%) étaient fumeur de patients présentant une mutation de l'EGFR.

Il n'y avait pas d'association du statut mutationnel de l'EGFR avec l'âge et le statut tabagique des patients. Le nombre des femmes est insuffisant pour l'analyse de la distribution des patients selon le sexe.

Tableau 17 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l'EGFR et les caractéristiques cliniques.

	EGFR Muté N = 23	EGFR non muté N = 35	<i>p</i>
<u>Âge</u>			
Médian [EI]	58 (47-73)	60 (44-94)	0.4
< 60	13 (44.8%)	16 (55.17%)	
≥ 60	11 (35.7%)	18 (66.7%)	
<u>Sexe</u>			
Homme	22 (41.5%)	31 (58.5%)	0.3
Femme	1 (20%)	4 (80%)	
<u>Tabagisme</u>			
Fumeur	9 (37.5%)	15 (63%)	0.8
Non-fumeur	6 (35.3%)	11 (64.7%)	
N/D	8 (44.4%)	9 (55.6%)	

- **Type d'échantillons**

Tableau 18 représente la répartition des patients selon fréquence de mutations de l'EGFR et le type de prélèvements. Ces mutations étaient plus souvent détectées dans les échantillons préparés à partir des prélèvements chirurgicaux (16 sur 32 cas, soit 50%) comparativement aux biopsies (5 sur 18 cas, soit 27.7%), mais la différence n'est pas statistiquement significative.

Tableau 18 : Répartition des patients selon la présence de mutations de l'EGFR et le type de prélèvement.

Type de prélèvement	Muté N = 23	Non muté N = 35	<i>p</i>
Pièce chirurgicale	16 (50%)	16 (50%)	0.1
Biopsie	5 (27.7%)	13 (72.3%)	
N/D	2 (25%)	6 (75%)	

II.4. Statut mutationnel de l'EGFR chez les patients ayant un adénocarcinome

En plus de données de 36 patients de notre étude ayant un adénocarcinome, 8 patients ont bénéficié du test moléculaire de l'EGFR au niveau du service d'oncologie médicale (CHU de Constantine), ont été inclus dans l'analyse de sous-groupe des patients ayant un adénocarcinome et porteurs d'une mutation de l'EGFR.

Il s'agit de 44 patients, 39 hommes (88.6%) et 5 femmes (11.4%). Nous avons retrouvé la mutation de l'EGFR chez 19 sur 44 cas, soit 43.2%.

Dans ce sous-groupe, les mutations de l'EGFR étaient plus fréquentes chez les femmes (3 sur 5 cas, soit 60%) comparativement aux hommes (16 sur 39 cas, soit 41%) et chez les non-fumeurs (8 sur 17 cas, soit 47%) comparés aux fumeurs (8 sur 21 cas, soit 38.1%), mais la différence n'est pas statistiquement significative (Tableau 19).

Tableau 19 : Répartition des patients ayant un adénocarcinome présentant une mutation de l'EGFR selon le sexe et le statut tabagique.

Paramètre	Total N = 44	Muté 18 (43.2%)	Non muté 25 (56.8%)	<i>P</i>
<u>Sexe</u>				
Homme	39	15 (41%)	23 (59%)	0.4
Femme	5	3 (60%)	2 (40%)	
<u>Tabagisme</u>				
Fumeur	21	8 (38.1%)	13 (61.9%)	0.6
Non-fumeur	17	8 (47%)	9 (53%)	
N/D	6	2 (33.4%)	4 (66.6%)	

II.5. Expression de la protéine EGFR

L'évaluation de l'expression de l'EGFR par la technique d'immunohistochimie a pu être testée chez 56 sur 58 patients.

La surexpression de l'EGFR a été trouvée chez 18 sur 56 cas, soit 32%, avec une intensité de marquage modéré (2+) pour 8 cas et fort (3+) pour 10 cas. Des exemples des cas présentant une surexpression de l'EGFR dans notre cohorte étudiée sont illustrés dans la figure 28.

Selon le type histologique, la surexpression de l'EGFR était plus fréquente dans le carcinome épidermoïde (8 sur 16 cas, soit 50%) que dans l'adénocarcinome (10 sur 34 cas, soit 29%), mais la différence n'est pas statistiquement significative (Tableaux 20).

Il n'y avait pas d'association entre la surexpression de la protéine EGFR et les données cliniques des patients : l'âge, le statut tabagique et le stade de la maladie. Le nombre des femmes est insuffisant pour l'analyse de la distribution des patients selon le sexe (Tableaux 21).

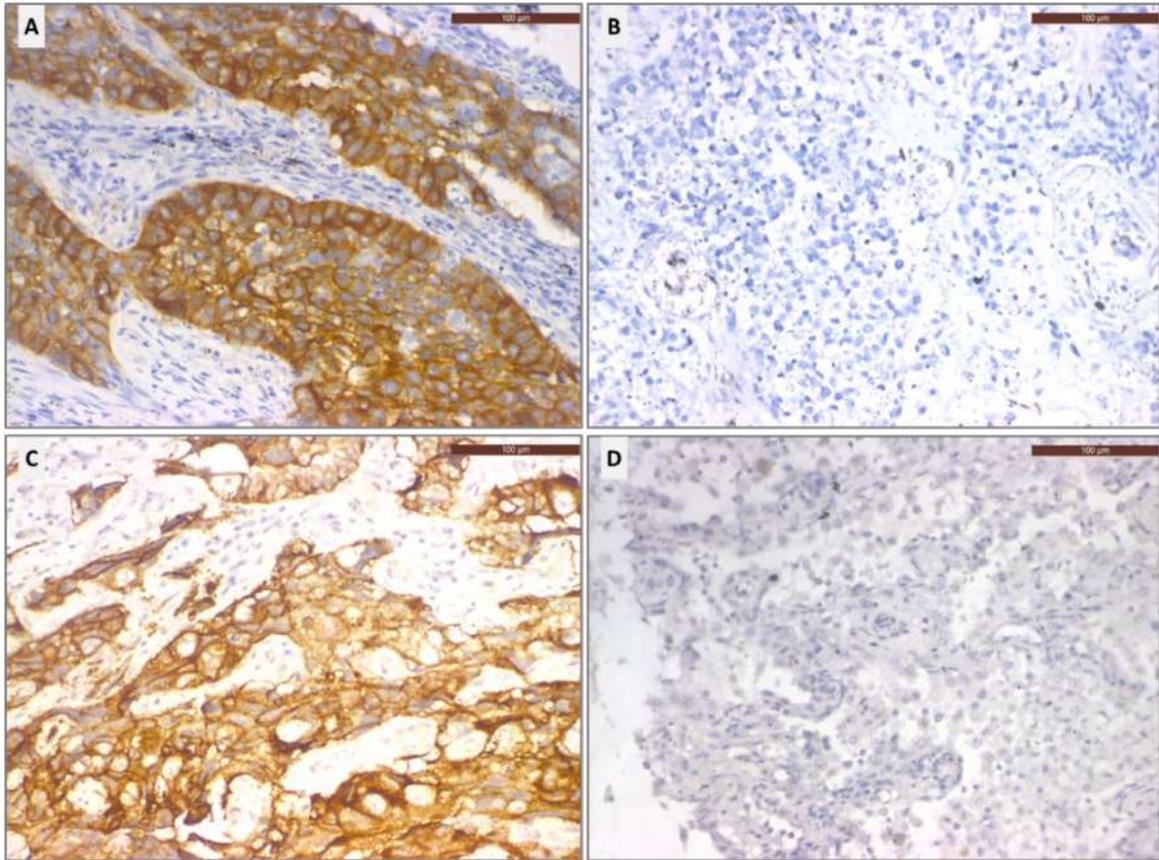


Figure 28 : Exemples de la surexpression de l'EGFR identifiée chez des cas de CBNPC dans notre étude. Cas de carcinome épidermoïde : A) immunomarquage positif (score 3+) et B) négatif. Cas d'adénocarcinome : C) immunomarquage positif (score 3+) et D) négatif (x200).

Tableau 20 : Répartition des patients selon l'expression de l'EGFR et le type histologique.

Type histologique	Surexpression de l'EGFR		<i>p</i>
	Oui	Non	
	18 (32%)	38 (68%)	
Carcinome épidermoïde	8 (50%)	8 (50%)	0.1
Adénocarcinome	10 (29%)	24 (71%)	
Autres types	//	6 (100%)	

Tableau 21 : Caractéristiques cliniques des patients selon l'expression de l'EGFR.

Paramètre	N = 56	Surexpression de l'EGFR		p
		Oui 18 (32%)	Non 38 (68%)	
Âge				
Médian (ans)	56	59.2	61.6	//
Sexe				
Homme	52	18 (34.6%)	34 (65.4%)	//
Femme	4	//	4 (100%)	
Tabagisme				
Fumeur	21	6 (28.6%)	15 (71.4%)	0.7
Non-fumeur	18	6 (33.4%)	12 (66.6%)	
N/D	17	6 (35.3%)	11 (64.7%)	
Stade tumoral				
I – III	26	10 (38.5%)	16 (61.5%)	0.4
IV	18	5 (27.8%)	13 (72.2%)	
N/D	12	3 (25%)	9 (75%)	

II.6. Relations entre les mutations et l'expression de l'EGFR

L'altération de l'EGFR, soit par une mutation activatrice, soit par une surexpression protéique, a été présentée chez 33 sur 56 patients, soit près de 59%. Il n'y avait pas d'association entre l'incidence des mutations et la surexpression de la protéine EGFR. 7 sur 22 cas (31.8%) ayant une mutation de l'EGFR présentant une surexpression de la protéine, soit près de 12.5% de l'ensemble des cas présentant un EGFR muté et surexprimé.

Tableau 22 : Répartition des patients selon les mutations et l'expression de l'EGFR.

	Total N = 56	Surexpression de l'EGFR		p
		Oui	Non	
EGFR muté	22	7 (31.8%)	15 (68.2%)	0.9
EGFR non muté	34	11 (32.4%)	23 (67.6%)	

CHAPITRE IV
DISCUSSION

DISCUSSION

I. Profil épidémiologie et clinicopathologique du CBP

Notre étude rétrospective portant sur 169 patients ayant un CBP, durant la période allant de janvier 2015 à décembre 2020, les données recueillies nous ont permis d'évaluer certains paramètres pathologiques et cliniques dans le but de décrire les caractéristiques épidémiologiques et clinico-pathologique du CBP dans notre population.

Les résultats de cette étude épidémiologique présentent les caractéristiques de patients atteints de CBP dans l'Est algérien. La majorité des patients inclus habitent la wilaya de Constantine et les wilayas limitrophes. De façon générale, nos résultats ont révélé que notre population est comparable aux populations d'autres études en Algérie sur le sexe, l'âge, le type histologique et le stade de la maladie. Cependant, il y a plus de patients non-fumeurs dans notre étude comparée aux autres études.

▪ Sexe

Le CBP est l'une des principales causes de décès chez les hommes comme chez les femmes, soit environ 18% des cas de décès par cancer chez les deux sexes (Globocan 2020). Dans notre série, le sexe masculin était dominant, environ 87.6% des cas sont des hommes et 12.4% des femmes avec un sex-ratio Homme/ Femme de 7,4. Nos résultats sont comparables avec ceux observés dans les registres de cancer à l'échelle régionale et nationale. Cette prédominance masculine dans le CBP a été rapportée dans le registre de cancer de la willaya de Constantine (Lakehal et *al*, 2021), dans le réseau régional est et sud-est des registres de cancer (Hamdi Cherif et *al*, 2020) et dans la région du centre et de l'Ouest (Harir et *al*, 2014 ; Ketfi et *al*, 2020). Ainsi qu'elle a été signalée chez les patients tunisiens et marocains (Ben Amar et *al*, 2016 ; Harizi et *al*, 2018 ; Blemokhtar et *al*, 2019). De même, selon les estimations mondiales basées sur les données Globocan 2020, le sex-ratio H/F varie d'une région à l'autre, le plus élevé (5.6%) a été rapporté en Afrique du Nord et le plus faible (1.2%) dans la région nord-américaine.

La baisse de l'incidence du CBP chez la femme dans la région MENA (Moyen-Orient et Afrique du Nord) est liée probablement à la prévalence du tabagisme qui représente de 2% à 5.6% seulement parmi les femmes (Jazieh et *al*, 2019-a). Par ailleurs, les femmes

n'accèdent pas ou très peu au travail dans les métiers où il y a une exposition aux agents carcinogènes pulmonaires (Ketfi et *al*, 2020).

- **Âge**

Dans notre étude le CBP touche principalement la catégorie d'âgés de 50 à 70 ans, avec un âge médian au moment du diagnostic (sexe confondu) de 61 ans, ce qui est en accord avec les données observées sur la population algérienne (Harir et *al*, 2014 ; Hamdi Cherif et *al*, 2014 ; 2020 ; Ketfi et *al*, 2020 ; Bounedjar et *al*, 2020), ainsi qu'avec celles d'études marocaines et tunisiennes (Missaoui et *al*, 2011 ; Tazi et *al*, 2013, Arfaoui et *al*, 2014 ; Ben Amar et *al*, 2016 ; Harizi et *al*, 2018 ; Blemokhtar et *al*, 2019). Le jeune âge observé parmi les patients atteints de CBP dans la région du Maghreb peut être expliqué probablement par le fait que notre population est plus jeune comparée avec autres populations, en particulier les populations européennes (Ritchie et Roser, 2019). La majorité des cas du CBP étant diagnostiqués chez les personnes de plus de 65 ans, avec un âge médian d'apparition de la maladie de 70 ans (Galvez-Nino et *al*, 2019).

- **Facteurs de risque**

En termes de facteurs de risque du CBP, le tabagisme reste le facteur de risque principal chez l'homme (Barta et *al*, 2019). Toutefois, l'épidémie de tabagisme varie entre les différentes régions du monde comme entre les hommes et les femmes. Dans la région du Maghreb, une méta-analyse de 50 études a montré une prévalence élevée du tabagisme varie entre 14% et 25% (Serhier et *al*, 2018). Dans notre série, les fumeurs représentent 78.2% des cas chez l'homme. Parmi les sujets non-fumeurs environ 43% des cas sont de femmes. Nos résultats sont comparables avec ceux de l'étude de Ketfi et *al*. (2020) dans la région du centre, qui a révélé qu'il y avait plus de 76% était fumeur. En revanche, d'autres études en Algérie et dans la région du Maghreb, il y avait plus de patients fumeurs comparativement à notre série, où ils représentent de 90% à 95% des cas chez les hommes (Missaoui et *al*, 2011 ; Harir et *al*, 2014 ; Ben Amar et *al*, 2016 ; Harizi et *al*, 2018 ; Blemokhtar et *al*, 2019 ; Bounedjar et *al*, 2020).

Il est à noter que l'incidence du CBP chez les non-fumeurs semble être augmentée dans notre population, ce qui suggère probablement d'autres facteurs de risques. Donc, il est important d'effectuer des études étiologiques, en particulier chez les patients non-fumeurs.

En effet, l'implication d'autres facteurs de risque est suggérée (Steenland et *al*, 1996 ; Boffetta, 2002 ; Herbst et *al*, 2008 ; Pallis et *al*, 2013 ; Schabath et Cote, 2019).

Dans notre étude, près de 11% des patients présentant des antécédents personnels de maladies pulmonaires, telles que la BPCO, l'emphysème et la tuberculose. Les résultats du projet SYNERGY qui était basé sur plusieurs études de cas-témoins, en analysant l'association entre le risque de développer d'un CBP et les différentes affections respiratoires, ont montré une association positive de ces comorbidités au CBP, en particulier BPCO incluant la bronchite chronique et l'emphysème et/ou la pneumonie (Denholm et *al*, 2014). D'autre part, plus de 46% des patients dans notre étude avaient de pathologies chroniques, essentiellement l'hypertension artérielle et le diabète. En effet, les comorbidités associées au CBP, en tenant compte de l'âge et de la consommation du tabac, peuvent avoir une influence négative sur la prise en charge thérapeutique en limitant l'accès aux certaines chimiothérapies (Dutkowska et *al*, 2016 ; Sigel et Wisnivesky, 2017).

À côté du tabagisme, le rôle des cancérigènes professionnels est souvent sous-estimé en raison du facteur confondant. L'étude de Keffi et *al*. (2020), qui a évalué la proportion du CBP présumé d'origine professionnelle chez des patients algériens, a relevé qu'il y avait environ 50% des patients ont été exposés à au moins un cancérogène pulmonaire sur les lieux de travail, tels que le gaz d'échappement diesel, la silice, les hydrocarbures polycycliques aromatiques, les fumées de soudage et l'amiante, ce qui suggère d'effectuer les démarches nécessaires chez nos patients pour l'évaluation de l'exposition professionnelle s'il existait.

- **Type histologique**

Sur le plan histologique, l'adénocarcinome est le type histologique le plus fréquent chez les hommes et les femmes dans notre étude, représentant 56% des cas, suivi du carcinome épidermoïde dans 23%, bien que le CBPC ne représente que 5.4% des cas. D'autres études portées sur notre population, présentant les données de la période entre 2014 et 2019, ont retrouvé ce même résultat comme celle du registre de la wilaya de Constantine (Lakehal et *al*, 2021), l'étude LuCaReAl (Bounedjar et *al*, 2020) et l'étude de Keffi et *al*. (2020). Seule, une étude menée par Harir et *al*. (2014) dans l'Ouest algérien, pour la période de 2008 à 2013, a rapporté une prédominance du carcinome épidermoïde. Dans la région du Maghreb, des études ont rapporté que l'adénocarcinome est le type histologique le plus

fréquent (Lachgar et al, 2016 ; Ben Amar et al, 2016 ; Blemokhtar et al, 2019). Ceci est en accord avec les données scientifiques actuelles où l'adénocarcinome devient le type histologique majoritaire depuis des années, en particulier chez les femmes (Cheng et al, 2016).

Le CBPC et le carcinome épidermoïde sont fortement associés à la consommation du tabac, mais lors des dernières décennies, le taux d'incidence de l'adénocarcinome a augmenté, cela pourrait être expliqué par l'évolution de la fabrication des cigarettes manufacturées qui a été à l'origine d'une augmentation du dépôt des agents carcinogènes dans les régions alvéolaires contribuant à l'augmentation du risque d'adénocarcinome (Sakhri et Bertocchib, 2019). Par ailleurs, les patients atteints de CBNPC non-fumeurs ont des caractéristiques histologiques différentes avec une prédominance encore plus marquée d'adénocarcinome que chez les fumeurs (Subramanian et Govindan, 2007).

- **Stade tumoral**

Le pronostic du CBP reste mauvais avec une survie globale à 5 ans varie entre 10% et 20%, tous stades confondus (Sung et al, 2021). Cela peut être expliqué par le diagnostic tardif vu que la majorité des patients ayant au moment du diagnostic une maladie de stade avancé. Environ 30% des cas à un stade localement avancé et de 40% à 50% à un stade métastatique (ASCO, 2021). Nos résultats illustrent cette réalité avec plus de 78% des cas ont été diagnostiqués à des stades avancés de la maladie, dont 57% des cas présentant un stade métastatique. Des résultats comparables ont été rapportés dans d'autres études nationales (Harir et al, 2014 ; Ketfi et al, 2020 ; Bounedjar et al, 2020). Ainsi que les mêmes résultats ont été rapportés dans des études tunisiennes (Ben Amar et al, 2016 ; Harizi et al, 2018).

Le diagnostic tardif du CBP peut être expliqué principalement par la symptomatologie non spécifique du CBP ainsi qu'à l'absence d'outils validés de dépistage précoce. Cependant, plusieurs études ont démontré que le dépistage annuel par le scanner faiblement dosé, chez les patients grands fumeurs et ex-fumeurs, a un effet significatif en diminuant le taux de mortalité (Denise et al, 2019 ; Pastorino et al, 2019 ; de Koning et al, 2020).

II. Statut EGFR dans les patients algériens atteints de CBNPC

Les mutations activatrices du gène EGFR ont été identifiées comme facteurs prédictifs de sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR (EGFR-TKIs) dans le CBNPC suivant la découverte de la corrélation entre la sensibilité aux EGFR-TKIs et les mutations du gène EGFR (Lynch et al, 2004 ; Pao et al, 2004 ; Paez et al, 2004). Le développement des thérapies ciblées pour les patients présentant une anomalie oncogénique activatrice s'est accéléré. Les altérations moléculaires rencontrées le plus souvent dans les CBNPC, par rapport à leur indication en pratique clinique, sont des mutations du gène EGFR et des réarrangements chromosomiques des gènes ALK et ROS1 (Gaughan et Cost, 2011 ; Levy et al., 2012 ; Ferrer et al, 2017 ; Hill et al, 2019 ; Majeed et al, 2021). Actuellement, les patients atteints de CBNPC de stade avancé dont la tumeur exprime une mutation de sensibilité de l'EGFR bénéficient d'un traitement par les EGFR-TKIs en première ligne de traitement par rapport à une chimiothérapie (Ruppert et al, 2011 ; Inoue et al, 2013 ; Zhou et al, 2015).

C'est dans ce contexte que s'inscrit l'intérêt d'étudier le statut mutationnel de l'EGFR chez les patients atteints de CBNPC dans l'Est algérien. Dans notre cohorte de 58 patients, les mutations de l'EGFR ont été analysées par PCR et séquençage capillaire, ainsi que l'expression de l'EGFR a été évaluée par immunohistochimie.

▪ Fréquence des mutations de l'EGFR

Dans la cohorte de notre étude, les mutations de l'EGFR sont retrouvées chez 39.6% des patients atteints de CBNPC, dont les patients ayant un adénocarcinome représentent un taux des mutations de 43.2%. Les patients porteurs de mutations de l'EGFR représentent un taux élevé comparé aux ceux rapportés chez les patients Caucasiens et peu similaires à ceux des patients asiatiques.

D'importantes variations dans les fréquences des mutations de l'EGFR ont été observées suivant les origines ethniques et/ou géographiques. Midha et al. (2015) et Zhang et al. (2016) ont réalisé des méta-analyses basées sur plusieurs études effectuées dans de nombreux pays, en précisant la prévalence des mutations de l'EGFR et les caractéristiques clinico-pathologiques associées à ces mutations (*Annexes H, I et J*). Les mutations de l'EGFR sont moins fréquentes chez les patients Caucasiens représentant en moyenne 12%

à 22% et 17.4% dans l'adénocarcinome et les CBNPC, respectivement, à l'inverse chez les patients asiatiques, elles sont plus fréquentes représentant en moyenne 47% dans l'adénocarcinome et 38.8% dans les CBNPC.

Des résultats quelque peu variables ont été signalés concernant les groupes ethniques dans la région de l'Afrique du Nord et du Moyen-Orient ou MENA (*Middle East and North Africa*) (Tableau 23).

Tableau 23 : Prévalence des mutations de l'EGFR chez les patients atteints de CBNPC dans la région MENA.

Region	%	N	Histologie	Méthode	Étude
<u>Afrique du Nord</u>					
Algérie	39.6	58	CBNPC	Sanger	<i>Notre étude</i>
Maroc	21	120	ADK	Sanger & Taqman	Errihani, 2013
Tunisie	21.9	334	ADK	Sanger	Lemine Sow, 2021
	44	50	ADK	IHC	Mraihi, 2018
	11.5	26	ADK	ARMS/Scorpion	Arfaoui, 2018
	5.5	73	ADK	Sanger	Dhieb, 2019
<u>Moyen-Orient</u>					
Golfe	28.7	230	CBNPC	qPCR	Jazieh, 2015
Iran	28	50	ADK	Sanger	Mohammad, 2019
Iraq	24.3	103	ADK	Sanger	Basi, 2018
	27.5	138	CBNPC	qPCR	Ramadhan, 2021
	21.5	65	CBNPC	ARMS/Scorpion	Mubarak, 2020
Levant	15.6	205	ADK	ARMS/Scorpion	Tfayli, 2017
Liban	11.9	201	Non-CE	ARMS/Scorpion	Naderi, 2015
Turque	8.5	106	ADK	ARMS/Scorpion	Fakhruddin, 2014
	42.6	48	CBNPC	Sanger	Unal, 2013
	32.3	300	ADK	Pyroséquençage	Demiray, 2018
	16.7	959	CBNPC	qPCR	Tezel, 2017

Sanger : Séquençage capillaire, *qPCR* : PCR quantitative, *IHC* : Immunohistochimie, *ARMS* : Amplification-Refractory Mutation System.

Dans la population maghrébine, deux études marocaines ont rapporté un taux des mutations de l'EGFR de 21% (Errihani et al, 2013) et 21.9% (Lemine Sow et al, 2021) parmi les patients ayant un adénocarcinome. De plus, deux études tunisiennes ont trouvé des taux des mutations de 11.5% (Arfaoui et al, 2018) et de 5.5% (Dhieb et al, 2019) chez des patients ayant un adénocarcinome. L'étude de Mraïhi et al. (2018) a rapporté un taux des mutations de 44% dans une série des patients tunisiens atteints d'un adénocarcinome, en utilisant l'immunohistochimie MS-IHC (*Mutation-specific immunohistochemistry*), ce qui concorde avec nos résultats. De plus, l'étude observationnelle de Jazieh et al. (2019-b) dans une population de la région de MENA, incluant l'Algérie, l'Arabie Saoudi, les Emirats Arabes Unis, le Qatar et le Liban, a démontré un taux de mutations de 31.3%. Par ailleurs, dans la population turque, la précédente étude d'Unal et al. (2013) portant sur des patients avec CBNPC dans l'ouest de la Turquie, a relevé un taux des mutations de l'EGFR de 42.6%. Des études récentes, Tezel et al. (2017) ont rapporté un taux des mutations de 16.7% dans CBNPC, tandis qu'il fût 32.3% dans l'étude de Demiray et al. (2018) chez des patients turcs atteints d'un adénocarcinome.

Des différences dans les fréquences de mutations de l'EGFR chez les patients au sein des pays de la même région ont été observées (Midha et al, 2015 ; Zhang et al, 2016). Les données actuellement disponibles donc ne nous permettent pas de tirer une conclusion précise sur cette question.

- **Type des mutations de l'EGFR**

Dans notre étude, nous avons trouvé seulement les deux mutations classiques, la mutation L858R et les délétions dans l'exon 19, avec l'absence de mutations sur l'exon 20. La mutation T790M localisée sur l'exon 20 est associée à une résistance aux EGFR-TKIs et émergée comme mutation secondaire dans plus de 50% des cas, mais elle est rare dans les patients naïfs au traitement par des EGFR-TKIs (Fallet et al, 2016).

De manière intéressante, nous avons trouvé une prédominance de la mutation L858R, présente dans la majorité des cas positifs, avec l'existence des cas ayant une double mutation, la concomitance de la mutation L858R avec une délétion dans l'exon 19, ce qui est désaccord avec les données de la littérature en termes de la répartition de ces deux mutations.

L'incidence de la double mutation semble être rare (Harrison et al, 2020) et la réponse aux EGFR-TKIs de ce sous-groupe des patients par rapport à ceux qui présentent une seule mutation reste controversée (Peng et al, 2018). Par ailleurs, les deux mutations sont associées à une sensibilité aux EGFR-TKIs avec un taux de réponse élevé (Lynch et al, 2004 ; Pao et al, 2004 ; Corte-Funes et al, 2005 ; Han et al, 2005 ; Taron et al, 2005, Mitsudomi et al, 2005 ; Riely et al, 2006). Ces deux mutations pourraient être associées à des implications pronostiques distinctes nécessitant des stratégies thérapeutiques individualisées (Liu et al, 2016 ; Kobayashi et Mitsudomi, 2016). D'autre part, la combinaison de TKI Erlotinib et l'agent anti-angiogénique Ramucirumab (un antagoniste de VEGFR2) a montré un bénéfice similaire dans les deux mutations en termes de la survie sans progression chez les patients atteints de CBNPC (Nakagawa et al, 2019).

- **Profil clinicopathologique des patients présentant une mutation de l'EGFR**

En ce qui concerne la présence de mutations de l'EGFR et les caractéristiques clinicopathologiques des patients atteints de CBNPC. Dans notre étude, en tenant compte de l'indisponibilité des données cliniques pour certains patients, nous avons évalué l'association de la présence de mutations de l'EGFR avec le type histologique, l'âge, le sexe, le statut tabagique et le stade clinique de la maladie.

L'incidence de ces mutations semble être indépendante de l'âge et du stade clinique de la maladie. Le type histologique « adénocarcinome » est l'un des facteurs prédictifs le plus important dans le test de mutations de l'EGFR. Selon les données de la littérature, ces mutations sont associées à certaines caractéristiques clinicopathologiques. Elles sont généralement plus fréquentes chez les patients porteurs d'un adénocarcinome, avec une prédominance de femmes et non-fumeurs.

Une prédominance plus marquée d'adénocarcinome que les autres types histologiques dans les CBNPC a été observée chez les patients porteurs ces mutations, représentant près de 38% dans l'adénocarcinome et 11.7% dans les autres types histologiques (Zhang et al, 2016). Nos résultats sont en accord avec ceux décrits dans la littérature, en particulier pour les échantillons dont le résultat du diagnostic anatomopathologique était confirmé pour le sous-type histologique. Par ailleurs, pour les autres types histologiques, nous avons trouvé un taux élevé dans le groupe de patients ayant un CBNPC en faveur d'un carcinome épidermoïde, en précisant que la majorité de prélèvements était des petites biopsies. Ces

résultats correspondent à ceux de l'étude menée par Ho et *al.* (2019) qui a révélé une fréquence élevée de mutations de l'EGFR dans les cas de carcinome épidermoïde ou CBNPC en faveur d'un carcinome épidermoïde diagnostiqué à partir des petites biopsies, en indiquant que ces cas peuvent être des carcinomes adénoquameux. Il a été démontré que ces mutations sont fréquentes chez les patients porteurs d'un carcinome adénoquameux (Powrózek et *al.*, 2014). Par conséquent, il est utile de recommander ce test pour les cas ayant un CBNPC en faveur d'un carcinome épidermoïde.

Notre analyse du sous-groupe de patients ayant un adénocarcinome a montré que le taux de ces mutations était peu élevé chez les femmes et les non-fumeurs, mais ces différences ne sont pas significatives. En tenant compte du nombre de femmes et du manque de données du statut tabagique et du stade clinique pour certains patients ce qui pourrait influencer nos résultats. Les données de la littérature indiquent que les mutations de l'EGFR sont plus fréquentes chez les non-fumeurs et les femmes (Tseng et *al.*, 2017). En termes de l'association entre la réponse aux EGFR-TKIs et ces caractéristiques cliniques, une méta-analyse réalisée par Xiao et *al.* (2020) a montré que la réponse aux EGFR-TKIs semble être indépendante du statut tabagique, mais une survie globale plus longue a été observée chez les femmes comparées aux hommes. Même si certains sous-groupes de patients sont plus susceptibles d'avoir ces mutations tels que les non-fumeurs et les femmes, le test moléculaire de l'EGFR est actuellement recommandé pour tous les patients porteurs d'un CBNPC non épidermoïde de stade avancé, quelles que soient leurs caractéristiques cliniques (Pennell et *al.*, 2019).

En ce qui concerne l'évaluation de l'incidence de mutations de l'EGFR selon les stades cliniques de la maladie, dans notre série, les mutations de l'EGFR sont plus fréquentes chez les patients diagnostiqués à des stades non métastatiques (les stades de I à III) comparés aux ceux avec un stade métastatique, ce qui est en désaccord avec les données de la littérature (Pi et *al.*, 2018). Ces résultats pourraient être attribuables aux choix de la démarche méthodologique. Les mutations ont été détectées plus souvent dans les prélèvements chirurgicaux comparativement aux biopsies. En effet, le séquençage capillaire reste la technique idéale pour détecter les mutations de l'EGFR, mais cette méthode est mieux adaptée pour détecter les mutations dans les prélèvements de pièces chirurgicales (Liang et *al.*, 2018). Par ailleurs, et comme cela a déjà été noté précédemment, les caractéristiques des patients et le contexte clinique sélectionnés dans

plusieurs études pourraient contribuer à expliquer ces différences. Le test de mutations de l'EGFR est indiqué en pratique clinique en premier lieu pour les cas porteurs d'un adénocarcinome métastatique ce qui est le cas pour plusieurs études. En outre, compte tenu du risque de récurrence élevé dans les CBNPC à des stades II et III (Sasaki et *al*, 2014), la recommandation du test moléculaire de l'EGFR pour les patients porteurs d'un CBNPC à des stades précoces non métastatiques pourrait être utile pour des stratégies thérapeutiques plus efficaces pour ces patients. De plus, il a été montré un bénéfice d'EGFR-TKIs contre une chimiothérapie ou un placebo, en termes de survie sans récurrence, chez les patients porteurs d'un CBNPC de stade précoce résécable ayant une mutation de l'EGFR (Cheng et *al*, 2019).

- **Expression de la protéine EGFR**

Dans notre série, l'analyse de l'expression de l'EGFR que nous avons effectué par la technique d'immunohistochimie a révélé une surexpression de l'EGFR dans environ le tiers des cas ce qui indique qu'environ 60% de nos patients ayant présentant une altération de l'EGFR, soit par une mutation activatrice, soit par une surexpression protéique.

En ce qui concerne l'association de la surexpression de l'EGFR avec les caractéristiques clinico-pathologiques, une différence de cette surexpression a été observée selon le type histologique. La surexpression de l'EGFR a été plus fréquente chez les patients porteurs d'un carcinome épidermoïde que dans ceux ayant un adénocarcinome, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Hirsch et *al*, 2003 ; Sharma, 2007 ; Gazdar, 2010 ; Liang et *al*, 2010 ; Chang et *al*, 2017).

D'autre part, nos résultats ont montré qu'il n'y avait pas d'association entre l'incidence des mutations et la surexpression protéique de l'EGFR, environ 12.5% des cas présentaient un EGFR muté et surexprimé. En effet, la surexpression et l'amplification génique de l'EGFR n'ont pas été prouvées comme marqueurs prédictifs de sensibilité aux EGFR-TKIs dans le traitement du CBNPC. Cependant, les patients ayant un EGFR muté avec une surexpression protéique ou surtout une amplification génique (détectée par la FISH) semblent avoir une survie sans progression plus longue et surtout un meilleur taux de réponse aux EGFR-TKI (Cappuzzo et *al*, 2005 ; Sequist et *al*, 2007 ; Dahabreh et *al*, 2011 ; Shan, 2015).

III. Modalités thérapeutiques

Basés sur les données disponibles de l'étude épidémiologique concernant les modalités thérapeutiques, nos résultats ont montré que la chimiothérapie a été préconisée chez 60% des sujets, dont 81% des cas ont reçu une chimiothérapie de première ligne du traitement, tandis que 26,3% et 12,8% des cas étaient traités par radiothérapie et résection chirurgicale, respectivement. Ces résultats reflètent le fait que la majorité des patients ayant été diagnostiqués à un stade avancé de la maladie.

Le taux de survie relative à 5 ans du CBP dans la région MENA a été estimé de 8% seulement, avec des taux de mortalité de 15% en Algérie, 20.4% au Maroc et 21.9% en Tunisie (Jazieh et al, 2019-a). En effet, la prise en charge du CBP dépend principalement de trois variables, le type histologique, le statut fonctionnel du patient et l'extension tumorale (Berghmans et al, 2019). Dans la population maghrébine, l'étude de Ben Amar et al. (2016), qui a évalué le pronostic des patients tunisiens atteints de CBNPC de stades avancés, a démontré que la survie médiane globale était de 6 mois et les facteurs pronostiques pouvant l'influencer étaient principalement le délai de prise en charge, l'indice de performance et le traitement antitumoral, ce qui suggère de prendre en considération ces facteurs pour définir une prise en charge optimale.

Dans notre étude, en plus du taux élevé de mutations de l'EGFR observé, la majorité des patients étaient porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade métastatique, ce qui suggère qu'un fort pourcentage des patients pourraient être éligible pour le test moléculaire de l'EGFR et bénéficier de traitements anticancéreux basés sur les EGFR-TKIs. Une prise en charge optimale du CBNPC nécessite donc de faciliter l'accès de nos patients aux tests moléculaires pour l'EGFR et les autres marqueurs tumoraux et d'accélérer ainsi l'enregistrement des médicaments de thérapies ciblées innovantes, déjà validées par les agences internationales du médicament (EMA et FDA).

CONCLUSION

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans ce travail, nous avons décrit le profil clinico-pathologique d'une cohorte de 169 patients pour lesquels ont été portés un diagnostic et/ou un traitement d'un cancer broncho-pulmonaire au niveau du CHU Benbadis de Constantine, durant la période de juin 2015 à décembre 2020. L'étude du statut EGFR ont a été effectuée chez 58 patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules.

Les résultats de notre étude épidémiologique sont comparables aux résultats obtenus au niveau national et au Maghreb sur l'âge, le sexe et le stade de la maladie. Notre étude a permis d'affirmer que le cancer broncho-pulmonaire touche principalement les patients âgés de plus de 50 ans, avec une prédominance chez l'homme. Alors que le tabagisme actif reste le principal facteur de risque chez l'homme, l'incidence du cancer broncho-pulmonaire chez les non-fumeurs semble être augmentée, ce qui suggère probablement d'autres facteurs de risques, en particulier chez les femmes. L'adénocarcinome représentait le type histologique le plus fréquent. La majorité des patients ont été diagnostiqués à un stade avancé, ce qui reflète les choix thérapeutiques indiqués, où près de la moitié des patients ont reçu une chimiothérapie de première ligne de traitement. Le diagnostic tardif du cancer broncho-pulmonaire peut être expliqué principalement par la symptomatologie non spécifique et l'absence d'un outil validé de dépistage précoce.

Les résultats de l'étude du statut EGFR, constituant une cohorte unique à l'échelle nationale, ont démontré que les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules dans notre cohorte présentent un taux élevé des mutations de l'EGFR (près de 40%) comparé aux ceux rapportés chez les patients Caucasiens. Alors que les mutations classiques les plus fréquentes ont été détectées (L858R dans l'exon 21 et délétions dans l'exon 19), il y avait une répartition spécifique de ces deux mutations avec une prédominance de la mutation L858R. Ces mutations étaient plus fréquentes chez les patients porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade non métastatique, tandis que leur incidence était indépendante de l'âge, du genre et du statut tabagique. De plus, ces mutations ont été détectées souvent dans les échantillons obtenus à partir des prélèvements chirurgicaux comparé aux petites biopsies. La surexpression de la protéine EGFR était associée au carcinome épidermoïde comparé à l'adénocarcinome et indépendamment à la présence des mutations.

Notre étude a permis de définir certains aspects épidémiologiques et moléculaires du cancer broncho-pulmonaire dans l'Est algérien. Les particularités du cancer broncho-pulmonaire dans notre cohorte étudiée pourraient justifier une prise en charge spécifique en prenant en compte l'importance de la recherche des mutations de l'EGFR. Un fort pourcentage des patients pourrait être éligibles pour le test moléculaire de l'EGFR et bénéficier de traitements anticarcéaux basés sur les inhibiteurs de tyrosine kinase anti-EGFR. De même, il est important de mettre en place un système d'enregistrement accéléré pour les thérapies innovantes déjà validées par les agences internationales du médicament. L'application de ces différentes stratégies constitue d'une part à une meilleure prise en charge du cancer broncho-pulmonaire et d'autre part une meilleure manière de réduire la mortalité du cancer broncho-pulmonaire.

▪ **Recommandations**

- Instaurer des plateformes de génétique moléculaire dans tous les centres de lutte contre le cancer.
- Promouvoir la politique de lutte contre le cancer broncho-pulmonaire primitif en particulier en améliorant le registre des cancers régional et national afin de pouvoir apprécier de façon exhaustive le profil épidémiologique.
- Établir une stratégie de dépistage en renforçant les programmes de lutte contre le tabac et d'aide au sevrage tabagique et ceux du diagnostic précoce en introduisant les nouvelles techniques diagnostiques.

▪ **Perspectives**

- Encourager la recherche pour réaliser d'autres études en vue de confirmer le statut mutationnel de l'EGFR dans notre population et évaluer le bénéfice des thérapies ciblées anti-EGFR.
- Étudier d'autres biomarqueurs émergents du cancer broncho-pulmonaire tels que ALK, KRAS et PDL1.
- Étudier les profils génomiques des cancer broncho-pulmonaires, en utilisant des techniques de la génomique NGS (*Next Generation Sequencing*), en vue d'identifier de marqueurs moléculaires d'intérêt diagnostique, pronostique et/ou thérapeutique.

**RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES**

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Agustoni, F., Suda, K., Yu, H., Ren, S., Rivard, C. J., Ellison, K., Caldwell, C., Rozeboom, L., Brovsky, K., Hirsch, F. R. (2019). EGFR-directed monoclonal antibodies in combination with chemotherapy for treatment of non-small-cell lung cancer: an updated review of clinical trials and new perspectives in biomarkers analysis. *Cancer Treatment Reviews*, 72, 15–27. doi:10.1016/j.ctrv.2018.08.002
- Antoine, M. (2007). Qu'apporte l'immunohistochimie à la prise en charge du cancer bronchique ? De la morphologie au diagnostic et au traitement. *Revue de pneumologie clinique*, 63(3), 183–192. doi:10.1016/s0761-8417(07)90123-6
- Arfaoui Toumi, A., Blel, A., Aloui, R., Zaibi, H., Ksentinini, M., Boudaya, M. S., Znaïdi, N., Zidi, Y., Rammeh Rommani, S. (2018). Assessment of EGFR mutation status in Tunisian patients with pulmonary adenocarcinoma. *Current Research in Translational Medicine*, 66(3), 65–70. doi:10.1016/j.retram.2018.02.004
- ARISTOT (2021). Cancer bronchique non à petites cellules. *Référentiels Auvergne Rhône-Alpes en oncologie thoracique*, 17ème édition.
- Barros-Filho, M. C., Guisier, F., D. Rock, L., D. Becker-Santos, D., P. Sage, A., Marshall, E., Lam, W. (2019). Tumour suppressor genes with oncogenic roles in lung cancer. *Genes and Cancer*. doi:10.5772/intechopen.85017
- Barta, J. A., Powell, C. A., Wisnivesky, J. P. (2019). Global epidemiology of lung cancer. *Annals of Global Health*, 85(1). doi:10.5334/aogh.2419
- Belmokhtar, K. Y., Tajir, M., Boulouiz, R., Bennani, A., Brahmi, S. A., Alloubi, I., Kouismi, H., Kamaoui, I., Skiker, I., Afqir, S., Abda, N., Bellaoui, M., Mezouar, L. (2019). Cancer du poumon au Maroc Oriental: où en sommes-nous? *The Pan African medical journal*, 34, 177. doi:10.11604/pamj.2019.34.177.19934
- Ben Amar, J., Ben Safta, B., Zaibi, H., Dhahri, B., Baccar, MA., Azzabi, S. (2016). Facteurs pronostiques du cancer bronchique non à petites cellules localement avancé et métastatique. *LA TUNISIE MEDICALE*, 94(5).
- Berghmans, T., Grigoriu, B., Giroux-Leprieur, E., Revel, MP. (2019). La classification TNM en pratique [The TNM classification in practice]. *Revue des Maladies Respiratoires Actualités*, 11(3), 218-225.
- Beveridge, R., Pintos, J., Parent, M.-E., Asselin, J., Siemiatycki, J. (2010). Lung cancer risk associated with occupational exposure to nickel, chromium VI, and cadmium in two population-based case-control studies in Montreal. *American Journal of Industrial Medicine*, 53(5), 476–485. doi:10.1002/ajim.20801
- Boffetta, P. (2002). Involuntary smoking and lung cancer. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health*, 28 (2), 30–40.
- Boundedjar, A., Benkali, R., Badoui, L., Abada, M., Moumeni, A., Marouani, A., Sedkaoui, C., Ammour, H., Dib, A., Braikia, S., Reggad, R., Zidane, H., Taieb, L., Mahfouf, H., Belacel, A., Mechiat Z., Maachou Y., Souilah S., Gamaz M., Reguig F., Tabouri S., Bouannika M., Ghomari S., Rostane A., Ougdi W., Belbachir L., Bousahba A., Seghier F., Megaiz A., Mesli Mohamed A., & Kedar, M. (2020). Incidence of lung cancer in males and females in Algeria: The lung cancer registry in Algeria (LuCaReAl). *Cancer Epidemiology*, 69, 101799. doi:10.1016/j.canep.2020.101799

- Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R. L., Torre, L. A., Jemal, A. (2018). Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer Journal for Clinicians*, 68(6), 394–424. doi:10.3322/caac.21492
- Brenner, D. R., McLaughlin, J. R., Hung, R. J. (2011). Previous lung diseases and lung cancer risk: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One*, 6(3), e17479. doi:10.1371/journal.pone.0017479
- Brosseau, S., Viala, M., Varga, A., Planchard, D., Besse, B., Soria, J.C. (2015). Les TKI de 3^e génération dans le cancer pulmonaire non à petites cellules EGFR muté ayant acquis une résistance secondaire T790M [3rd generation's TKI in lung cancer non-small cell EGFR-mutated having acquired a secondary T790M resistance]. *Bull Cancer*, 102(9), 749-57. doi:10.1016/j.bulcan.2015.05.001
- Cancer Genome Atlas Research Network (2014). Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature*, 511(7511), 543-50. doi.org/10.1038/nature13385
- Cappuzzo, F., Gregorc, V., Rossi, E., Cancellieri, A., Magrini, E., Paties, C. T., Ceresoli, G., Lombardo, L., Bartolini, S., Calandri, C., de Rosa, M., Villa, E., Crino, L. (2003). Gefitinib in pretreated non-small-cell lung cancer (NSCLC): analysis of efficacy and correlation with HER2 and epidermal growth factor receptor expression in locally advanced or metastatic NSCLC. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(14), 2658–2663. doi:10.1200/JCO.2003.01.039
- Cappuzzo, F. (2005). Erlotinib in gliomas: should selection be based on EGFR and Akt analyses?. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(12), 868–869. doi:10.1093/jnci/dji169
- Carpenter, G., Cohen, S. (1990). Epidermal growth factor. *J Biol Chem*, 265(14), 7709-7712.
- Chalhoub, N., Baker, S. J. (2009). PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology*, 4(1), 127–150. doi:10.1146/annurev.pathol.4.110807.092311.
- Chapman, A. M., Sun, K. Y., Ruestow, P., Cowan, D. M., Madl, A. K. (2016). Lung cancer mutation profile of EGFR, ALK, and KRAS: Meta-analysis and comparison of never and ever smokers. *Lung Cancer*, 102, 122–134. doi:10.1016/j.lungcan.2016.10.010
- Chen, W., Li, Z., Bai, L., Lin, Y. (2011). NF-kappaB in lung cancer, a carcinogenesis mediator and a prevention and therapy target. *Frontiers in Bioscience*, 16(3), 1172–1185. doi:10.2741/3782
- Cheng, H., Li, X.-J., Wang, X.-J., Chen, Z.-W., Wang, R.-Q., Zhong, H.-C., Wu, T.C., Cao, Q.-D. (2019). A meta-analysis of adjuvant EGFR-TKIs for patients with resected non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 137, 7–13. doi:10.1016/j.lungcan.2019.08.002
- Cheng, Z., Shan, F., Yang, Y., Shi, Y., Zhang, Z. (2017). CT characteristics of non-small cell lung cancer with epidermal growth factor receptor mutation: a systematic review and meta-analysis. *BMC Medical Imaging*, 17(1), 5. doi:10.1186/s12880-016-0175-3
- Ciardiello, F., Tortora, G. (2003). Epidermal growth factor receptor (EGFR) as a target in cancer therapy: understanding the role of receptor expression and other molecular determinants that could influence the response to anti-EGFR drugs. *European Journal of Cancer*, 39(10), 1348–1354. doi:10.1016/s0959-8049(03)00235-1
- Ciardiello, F., Tortora, G. (2008). EGFR antagonists in cancer treatment. *The New England Journal of Medicine*, 358(11), 1160–1174. doi:10.1056/NEJMra0707704
- Colavolpe, C., Bonardel, G., Guedj, E., Cammilleri, S., Mundler, O., Barlesi, F. (2012). Intérêt de la TEP-FDG dans le cancer pulmonaire non à petites cellules de stade IIIAN2. *Revue des maladies respiratoires*, 29(2), 149–160. doi:10.1016/j.rmr.2011.05.017
- Cortes-Funes, H., Gomez, C., Rosell, R., Valero, P., Garcia-Giron, C., Velasco, A., Izquierdo, A., Diz, P., Camps, C., Castellanos, D., Alberola, V., Cardenal, F., Gonzalez-Larriba, J.L., Vieitez, J.M., Maeztu, I., Sanchez, J.J., Queralt, C., Mayo, C., Mendez, P., Moran, T., Taron, M. (2005).

- Epidermal growth factor receptor activating mutations in Spanish gefitinib-treated non-small-cell lung cancer patients. *Annals of Oncology*, 16(7), 1081–1086. doi:10.1093/annonc/mdi221
- Cortot, A. B., Jänne, P. A. (2014). Molecular mechanisms of resistance in epidermal growth factor receptor-mutant lung adenocarcinomas. *European Respiratory Review: An Official Journal of the European Respiratory Society*, 23(133), 356–366. doi:10.1183/09059180.00004614
- Dahabreh, I. J., Linardou, H., Kosmidis, P., Bafaloukos, D., Murray, S. (2011). EGFR gene copy number as a predictive biomarker for patients receiving tyrosine kinase inhibitor treatment: a systematic review and meta-analysis in non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 22(3), 545–552. doi:10.1093/annonc/mdq432
- Darby, S., Hill, D., Auvinen, A., Barros-Dios, J. M., Baysson, H., Bochicchio, F., ... Doll, R. (2005). Radon in homes and risk of lung cancer: collaborative analysis of individual data from 13 European case-control studies. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 330(7485), 223. doi:10.1136/bmj.38308.477650.63
- de Cremoux, P., Robert, J. (2012). Signalisation cellulaire et cancer : caractérisation de cibles thérapeutiques. *Pathologie-biologie*, 60(4), 217–222. doi:10.1016/j.patbio.2012.05.006
- de Koning, H. J., van der Aalst, C. M., de Jong, P. A., Scholten, E. T., Nackaerts, K., Heuvelmans, M. A., Oudkerk, M. (2020). Reduced lung-cancer mortality with volume CT screening in a randomized trial. *The New England Journal of Medicine*, 382(6), 503–513. doi:10.1056/NEJMoa1911793
- Dearden, S., Stevens, J., Wu, Y.-L., Blowers, D. (2013). Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Annals of Oncology*, 24(9), 2371–2376. doi:10.1093/annonc/mdt205
- Demiray, A., Yaren, A., Karagenç, A., Bir, F., Demiray, Ag., Karagür, Er., Tokgün, O., Elmas, L., Akça, H. (2018). The frequency of EGFR and KRAS mutations in the Turkish population with non-small cell lung cancer and their response to erlotinib therapy. *Balkan Journal of Medical Genetics: BJMG*, 21(2), 21–26. doi:10.2478/bjmg-2018-0022
- Deng, W., Lei, Y., Liu, S., Yang, J., Tu, H., Yan, H., Wu, Y. (2016). Comparing overall survival between first generation EGFR-TKIs and chemotherapy in lung cancer patients with Del19/L858R. *Chung-Kuo Yen Cheng Yen Chiu [Chinese Journal of Cancer Research]*, 28(3), 339–347. doi:10.21147/j.issn.1000-9604.2016.03.08
- Denholm, R., Schüz, J., Straif, K., Stücker, I., Jöckel, K.-H., Brenner, D. R., Olsson, A. C. (2014). Is previous respiratory disease a risk factor for lung cancer? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(5), 549–559. doi:10.1164/rccm.201402-0338OC
- National Lung Screening Trial Research Team. (2019). Lung cancer incidence and mortality with extended follow-up in the National Lung Screening Trial. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 14(10), 1732–1742. doi:10.1016/j.jtho.2019.05.044
- Detterbeck, F. C., Boffa, D. J., Kim, A. W., Tanoue, L. T. (2017). The eighth edition lung cancer stage classification. *Chest*, 151(1), 193–203. doi:10.1016/j.chest.2016.10.010
- Dhieb, D., Belguith, I., Capelli, L., Chiadini, E., Canale, M., Bravaccini, S., Yangui, I., Boudawara, O., Jlidi, R., Boudawara, T., Calistri, D., Keskes, L. A., Ulivi, P. (2019). Analysis of Genetic Alterations in Tunisian Patients with Lung Adenocarcinoma. *Cells*, 8(6), 514. <https://doi.org/10.3390/cells8060514>
- Greulich, H., Muzny, D. M., Morgan, M. B., Fulton, L., Fulton, R. S., Zhang, Q., Wendl, M. C., Lawrence, M. S., Larson, D. E., Chen, K., Dooling, D. J., Sabo, A., Hawes, A. C., Wilson, R. K. (2008). Somatic mutations affect key pathways in lung adenocarcinoma. *Nature*, 455(7216), 1069–1075. <https://doi.org/10.1038/nature07423>

- DOLL, R., HILL, A. B. (1950). Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report. *British medical journal*, 2(4682), 739–748. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.4682.739>
- Dutkowska, A. E., Antczak, A. (2016). Comorbidities in lung cancer. *Pneumonologia i Alergologia Polska*, 84(3), 186–192. doi:10.5603/PiAP.2016.0022
- Errihani, H., Inrhaoun, H., Boukir, A., Kettani, F., Gamra, L., Mestari, A., Jabri, L., Bensouda, Y., Mrabti, H., Elghissassi, I. (2013). Frequency and type of epidermal growth factor receptor mutations in moroccan patients with lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 8(9), 1212–1214. doi:10.1097/JTO.0b013e31829f6b4a
- Fakhruddin, N., Mahfouz, R., Farhat, F., Tfayli, A., Abdelkhalik, R., Jabbour, M., Zaatari, G. (2014). Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in lung adenocarcinoma: a retrospective study of the Lebanese population. *Oncology Reports*, 32(5), 2223–2229. doi:10.3892/or.2014.3406
- Fallet, V., Wislez, M., Poulot, V., Lacave, R., Antoine, M., Cadranet, J. (2016). Mutation de résistance EGFR T790M dans le cancer bronchique : une nouvelle cible thérapeutique [EGFR T790M resistance mutation: a novel therapeutic target]. *Correspondances en Onco-Théranostic*, 4.
- Fiala, O., Pesek, M., Finek, J., Svaton, M., Minarik, M., Benesova, L., Bortlicek, Z., Kucera, R., Topolcan, O. (2016). Pemetrexed versus erlotinib in the second-line treatment of patients with advanced-stage non-squamous NSCLC harboring wild-type EGFR gene. *Anticancer Research*, 36(1), 447–453.
- Finlay, M. R. V., Anderton, M., Ashton, S., Ballard, P., Bethel, P. A., Box, M. R., Wrigley, G. L. (2014). Discovery of a potent and selective EGFR inhibitor (AZD9291) of both sensitizing and T790M resistance mutations that spares the wild type form of the receptor. *Journal of Medicinal Chemistry*, 57(20), 8249–8267. doi:10.1021/jm500973a
- Fletcher, J. W., Djulbegovic, B., Soares, H. P., Siegel, B. A., Lowe, V. J., Lyman, G. H., Shields, A. F. (2008). Recommendations on the use of 18F-FDG PET in oncology. *Journal of Nuclear Medicine: Official Publication, Society of Nuclear Medicine*, 49(3), 480–508. doi:10.2967/jnumed.107.047787
- Flynn, J. F., Wong, C., Wu, J. M. (2009). Anti-EGFR Therapy: Mechanism and Advances in Clinical Efficacy in Breast Cancer. *Journal of oncology*, 2009, 526963. <https://doi.org/10.1155/2009/526963>
- Galvez-Nino, M., Ruiz, R., Pinto, J. A., Roque, K., Mantilla, R., Raez, L. E., Mas, L. (2020). Lung cancer in the young. *Lung*, 198(1), 195–200. doi:10.1007/s00408-019-00294-5
- Gamble, J. F., Nicolich, M. J., & Boffetta, P. (2012). Lung cancer and diesel exhaust: an updated critical review of the occupational epidemiology literature. *Critical reviews in toxicology*, 42(7), 549–598. <https://doi.org/10.3109/10408444.2012.690725>
- Gaughan, E.M., Cost, D.B. (2011). Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on EGFR, KRAS, and ALK gene abnormalities. *Therapeutic Advances in Medical Oncology*, 3, 113-25.
- Gazdar, A. F. (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, 28 (S1), S24-31. doi:10.1038/onc.2009.198
- Gibault, L., Cazes, A., Narjoz, C., Blons, H. (2014). Biologie moléculaire et prise en charge des patients atteints d'adénocarcinomes du poumon. *Revue de pneumologie clinique*, 70(1–2), 47–62. doi:10.1016/j.pneumo.2013.11.005

- GLOBOCAN (2020). Global Cancer Observatory: Cancer Today. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. <https://gco.iarc.fr/today>
- Goldstraw, P., Chansky, K., Crowley, J., Rami-Porta, R., Asamura, H., Eberhardt, W. E. E. & International Association for the Study of Lung Cancer Staging and Prognostic Factors Committee Advisory Boards and Participating Institutions. (2016). The IASLC lung cancer Staging project: Proposals for revision of the TNM Stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*, 11(1), 39–51. doi:10.1016/j.jtho.2015.09.009
- Gray, A., Read, S., McGale, P., Darby, S. (2009). Lung cancer deaths from indoor radon and the cost effectiveness and potential of policies to reduce them. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 338(061), a3110. doi:10.1136/bmj.a3110
- Graziano, S. L., Gamble, G. P., Newman, N. B., Abbott, L. Z., Rooney, M., Mookherjee, S., & Poiesz, B. J. (1999). Prognostic significance of K-ras codon 12 mutations in patients with resected stage I and II non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 17(2), 668–675. doi:10.1200/JCO.1999.17.2.668
- Greenman, C., Wooster, R., Futreal, P. A., Stratton, M. R., & Easton, D. F. (2006). Statistical analysis of pathogenicity of somatic mutations in cancer. *Genetics*, 173(4), 2187–2198. doi:10.1534/genetics.105.044677
- Guibert, N., Pradines, A., Farella, M., Casanova, A., Gouin, S., Keller, L., & Mazieres, J. (2016). Monitoring KRAS mutations in circulating DNA and tumor cells using digital droplet PCR during treatment of KRAS-mutated lung adenocarcinoma. *Lung Cancer (Amsterdam, Netherlands)*, 100, 1–4. doi:10.1016/j.lungcan.2016.07.021
- Haley, J., Whittle, N., Bennet, P., Kinchington, D., Ullrich, A., & Waterfield, M. (1987). The human EGF receptor gene: structure of the 110 kb locus and identification of sequences regulating its transcription. *Oncogene Research*, 1(4), 375–396.
- Hallberg, B., Rayter, S. I., Downward, J. (1994). Interaction of Ras and Raf in intact mammalian cells upon extracellular stimulation. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(6), 3913–3916. doi:10.1016/s0021-9258(17)41718-2
- Hamard, C., Ruppert, A.-M., Lavole, A., Rozensztajn, N., Antoine, M., Cadranet, J., & Wislez, M. (2016). Actualités sur les thérapies ciblées dans les cancers bronchiques non à petites cellules, hors immunothérapie. *Annales de pathologie*, 36(1), 63–72. doi:10.1016/j.annpat.2015.11.002
- Hamdi Cherif, M., Bidoli, E., Birri, S., Mahnane, A., Zaidi, Z., Boukharouba, H., & Serraino, D. (2015). Cancer estimation of incidence and survival in Algeria 2014. *Journal of cancer research & therapy*, 3(9), 100–104. doi:10.14312/2052-4994.2015-14
- Hamdi Cherif M, Kara L, Atoui S, Boudefar F. Données épidémiologiques du cancer dans l'Est et le Sud-Est Algérien, 2014-2017 (2020). *Algerian Journal of Health Sciences*, 2 (S2), S14-S31.
- Han, S.-W., Kim, T.-Y., Hwang, P. G., Jeong, S., Kim, J., Choi, I. S., & Kim, N. K. (2005). Predictive and prognostic impact of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 23(11), 2493–2501. doi:10.1200/JCO.2005.01.388
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70.
- Hanahan, D., Weinberg, R. A. (2000). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, 144(5), 646-74.
- Harrison, P.T., Vyse, S., Huang, P. H. (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*, 61, 167-79.

- Harir, N., Zeggai, S., Maalem, A. (2014). Epidemiological and pathological profile of lung cancer in West Algeria: About 772 cases. *J Afr Cancer*, 7, 22–26
- Harizi, C., Bellali, H., Hchaichi, A., Hamzaoui, A., Chahed, M. K. (2018). Cost estimation of medical care management of lung cancer in Tunisia. *East Mediterr Health J*, 24(10), 988-993.
- HAS (2009). Haute Autorité de Santé (HAS) & Institut National du Cancer (INCa). *Cancers broncho-pulmonaires*.
- HAS (2013). Haute Autorité de Santé (HAS) & Institut National du Cancer (INCa). *Guide parcours de soins cancers broncho-pulmonaires*.
- He, M., Capelletti, M., Nafa, K., Yun, C.-H., Arcila, M. E., Miller, V. A., & Oxnard, G. R. (2012). EGFR exon 19 insertions: a new family of sensitizing EGFR mutations in lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 18(6), 1790–1797. doi:10.1158/1078-0432.CCR-11-2361
- Herbst, R. S., Heymach, J. V., Lippman, S. M. (2008). Lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 359(13), 1367–1380. doi:10.1056/NEJMra0802714
- Hill, A., Gupta, R., Zhao, D., Vankina, R., Amanam, I., & Salgia, R. (2019). Targeted therapies in non-small-cell lung cancer. *Cancer Treatment and Research*, 178, 3–43. doi:10.1007/978-3-030-16391-4_1
- Hirayama, T. (1981). Non-smoking wives of heavy smokers have a higher risk of lung cancer: a study from Japan. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)*, 282(6259), 183–185. doi:10.1136/bmj.282.6259.183
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Bunn, P. A., Jr, Di Maria, M. V., Veve, R., Bremmes, R. M., & Franklin, W. A. (2003). Epidermal growth factor receptor in non-small-cell lung carcinomas: correlation between gene copy number and protein expression and impact on prognosis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(20), 3798–3807. doi:10.1200/JCO.2003.11.069
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Cappuzzo, F., McCoy, J., Bemis, L., Xavier, A. C., & Bunn, P. A., Jr. (2007). Combination of EGFR gene copy number and protein expression predicts outcome for advanced non-small-cell lung cancer patients treated with gefitinib. *Annals of Oncology*, 18(4), 752–760. doi:10.1093/annonc/mdm003
- Hirsch, F. R., Varella-Garcia, M., Cappuzzo, F. (2009). Predictive value of EGFR and HER2 overexpression in advanced non-small-cell lung cancer. *Oncogene*, 28 (S1), S32-37. doi:10.1038/onc.2009.199
- Ho, H.-L., Kao, H.-L., Yeh, Y.-C., Chou, T.-Y. (2019). The importance of EGFR mutation testing in squamous cell carcinoma or non-small cell carcinoma favor squamous cell carcinoma diagnosed from small lung biopsies. *Diagnostic Pathology*, 14(1), 59. doi:10.1186/s13000-019-0840-2
- Hong, D. S., Fakih, M. G., Strickler, J. H., Desai, J., Durm, G. A., Shapiro, G. I., & Li, B. T. (2020). KRASG12C inhibition with sotorasib in advanced Solid Tumors. *The New England Journal of Medicine*, 383(13), 1207–1217. doi:10.1056/NEJMoa1917239
- Hsuan, J. J. (1993). Oncogene regulation by growth factors. *Anticancer Research*, 13(6B), 2521–2532.
- Huang, L., Fu, L. (2015). Mechanisms of resistance to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Acta Pharmaceutica Sinica. B*, 5(5), 390–401. doi:10.1016/j.apsb.2015.07.001
- Hynes, N. E., MacDonald, G. (2009). ErbB receptors and signaling pathways in cancer. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(2), 177–184. doi:10.1016/j.ceb.2008.12.010

- IARC (2004). International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, No. 83.
- Inamura, K. (2017). Lung cancer: Understanding its molecular pathology and the 2015 WHO classification. *Frontiers in Oncology*, 7, 193. doi:10.3389/fonc.2017.00193
- INCa (2017). Institut National du Cancer (INCa), Guide parcours de soins cancers broncho-pulmonaires.
- Inoue, A., Kobayashi, K., Maemondo, M., Sugawara, S., Oizumi, S., Isobe, H., & North-East Japan Study Group. (2013). Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin–paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Annals of Oncology*, 24(1), 54–59. doi:10.1093/annonc/mds214
- Jänne, P. A., Engelman, J. A., Johnson, B. E. (2005). Epidermal growth factor receptor mutations in non-small-cell lung cancer: implications for treatment and tumor biology. *Journal of Clinical Oncology*, 23(14), 3227–3234. doi:10.1200/JCO.2005.09.985
- Jänne, P. A., Yang, J. C.-H., Kim, D.-W., Planchard, D., Ohe, Y., Ramalingam, S. S., & Ranson, M. (2015). AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(18), 1689–1699. doi:10.1056/NEJMoa1411817
- Jänne, P. A., Rybkin, I. L., Spira, A. I., Riely, G. J., Papadopoulos, K. P., et al J K. Sabari Johnson, M. L., Heist, S., Bazhenova, L., Barve, M., Pacheco, J. M., Chao, R. C., & Ou S. H.-I. (2020). KRYSTAL-1: Activity and Safety of Adagrasib (MRTX849) in Advanced/ Metastatic Non-Small-Cell Lung Cancer (NSCLC) Harboring KRAS G12C Mutation. *EJC*, 138(2), S1-S2.
- Jazieh, A. R., Jaafar, H., Jaloudi, M., Mustafa, R. S., Rasul, K., Zekri, J., & Gasmelseed, A. (2015). Patterns of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancers in the Gulf region. *Molecular and Clinical Oncology*, 3(6), 1371–1374. doi:10.3892/mco.2015.644
- Jazieh, A. R., Algwaiz, G., Errihani, H., Elghissassi, I., Mula-Hussain, L., Bawazir, A. A., & Gaafar, R. (2019). Lung cancer in the middle east and north Africa region. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(11), 1884–1891. doi:10.1016/j.jtho.2019.02.016 (a)
- Jazieh, A. R., Bounedjar, A., Al Dayel, F., Fahem, S., Tfayli, A., Rasul, K., & in collaboration with the Arab Collaborative Hematology Oncology Group (ACHOG) (2019). The study of druggable targets in nonsquamous non-small-cell lung cancer in the Middle East and North Africa. *Journal of Immunotherapy and Precision Oncology*, 2(1), 4–7. doi:10.4103/jipo.jipo_22_18 (b)
- Jeon, Y. K., Sung, S.-W., Chung, J.-H., Park, W.-S., Seo, J.-W., Kim, C. W., & Chung, D. H. (2006). Clinicopathologic features and prognostic implications of epidermal growth factor receptor (EGFR) gene copy number and protein expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 54(3), 387–398. doi:10.1016/j.lungcan.2006.08.015
- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., & Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research*, 284(1), 31–53. doi:10.1016/s0014-4827(02)00098-8
- Ketfi, A., Zanoun, N., Laouedj, I., Gharnaout, M., Fraga, S. (2020). Cancer bronchique primitif et risques professionnels dans une population Nord-Africaine [Primary lung cancer and occupational exposure in a North African population]. *The Pan African medical journal*, 37, 120. doi:10.11604/pamj.2020.37.120.21755
- Kim, S. M., Kwon, O.-J., Hong, Y. K., Kim, J. H., Solca, F., Ha, S.-J., & Cho, B. C. (2012). Activation of IL-6R/JAK1/STAT3 signaling induces de novo resistance to irreversible EGFR inhibitors in non-small cell lung cancer with T790M resistance mutation. *Molecular Cancer Therapeutics*, 11(10), 2254–2264. doi:10.1158/1535-7163.MCT-12-0311

- Kobayashi, Y., Mitsudomi, T. (2016). Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Science*, 107(9), 1179–1186. doi:10.1111/cas.12996
- Lachgar, A., Tazi, M. A., Afif, M., Er-Raki, A., Kebdani, T., & Benjaafar, N. (2016). Lung cancer: Incidence and survival in Rabat, Morocco. *Revue d'épidémiologie et de Santé Publique*, 64(6), 391–395. doi:10.1016/j.respe.2016.02.012
- Lakehal, A. H., Khirani, B., Afcil, K. S., Mehazem, S., Kifouche, I., Boudaoud, S. (2021). Registre du cancer de population de la wilaya de Constantine : Rapport de l'année 2018.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno analyse & biologie spécialisée*, 23(5), 260–279. doi:10.1016/j.immbio.2008.07.016
- Lee, Y. J., Shim, H. S., Kang, Y. A., Hong, S. J., Kim, H. K., Kim, H., & Cho, B. C. (2010). Dose effect of cigarette smoking on frequency and spectrum of epidermal growth factor receptor gene mutations in Korean patients with non-small cell lung cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 136(12), 1937–1944. doi:10.1007/s00432-010-0853-4
- Le Faou, A. L., Scemama, O. (2005). Épidémiologie du tabagisme [Epidemiology of tobacco smoking]. *Revue des maladies respiratoires*, 22(6 Pt 2), 8S27-32.
- Lemarié, E. (2011). Épidémiologie, facteurs de risque, dépistage des cancers broncho-pulmonaires. In: Oncologie thoracique. *Oncologie pratique*. Springer, Paris.
- Lemen, R. A., Dement, J. M., Wagoner, J. K. (1980). Epidemiology of asbestos-related diseases. *Environmental Health Perspectives*, 34, 1–11. doi:10.1289/ehp.80341
- Lemine Sow, M., El Yacoubi, H., Moukafih, B., Balde, S., Akimana, G., Najem, S., & Errihani, H. (2021). Frequency and types of EGFR mutations in Moroccan patients with non-small cell lung cancer. *Tumori*, 107(4), 335–340. doi:10.1177/0300891620964571
- Lemmon, M. A., Bu, Z., Ladbury, J. E., Zhou, M., Pinchasi, D., Lax, I., & Schlessinger, J. (1997). Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. *The EMBO Journal*, 16(2), 281–294. doi:10.1093/emboj/16.2.281
- Levy, M. A., Lovly, C. M., Pao, W. (2012). Translating genomic information into clinical medicine: lung cancer as a paradigm. *Genome Research*, 22(11), 2101–2108. doi:10.1101/gr.131128.111
- Li, H., Pan, Y., Li, Y., Li, C., Wang, R., Hu, H., & Chen, H. (2013). Frequency of well-identified oncogenic driver mutations in lung adenocarcinoma of smokers varies with histological subtypes and graduated smoking dose. *Lung Cancer*, 79(1), 8–13. doi:10.1016/j.lungcan.2012.09.018
- Li, Z., Zhao, R., Wu, X., Sun, Y., Yao, M., Li, J., & Gu, J. (2005). Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB Journal*, 19(14), 1978–1985. doi:10.1096/fj.05-4058com
- Li, Z., Zhao, R., Wu, X., Sun, Y., Yao, M., Li, J., & Gu, J. (2005). Identification and characterization of a novel peptide ligand of epidermal growth factor receptor for targeted delivery of therapeutics. *FASEB Journal*, 19(14), 1978–1985. doi:10.1096/fj.05-4058com
- Liang, C., Wu, Z., Gan, X., Liu, Y., You, Y., Liu, C., & Zhang, J. (2018). Detection of rare mutations in EGFR-ARMS-PCR-negative lung adenocarcinoma by Sanger sequencing. *Yonsei Medical Journal*, 59(1), 13–19. doi:10.3349/ymj.2018.59.1.13
- Liu, Y., Ren, Z., Wang, J., Zhang, S. (2016). Epidermal growth factor receptor-tyrosine kinase inhibitor therapy is especially beneficial to patients with exon 19 deletion compared with exon 21 L858R mutation in non-small-cell lung cancer: Systematic review and meta analysis. *Thoracic Cancer*, 7(4), 406–414. doi:10.1111/1759-7714.12343

- Liang, Z., Zhang, J., Zeng, X., Gao, J., Wu, S., Liu, T. (2010). Relationship between EGFR expression, copy number and mutation in lung adenocarcinomas. *BMC Cancer*, 10(1), 376. doi:10.1186/1471-2407-10-376
- Lodish, H. F. (2016). *Molecular Cell Biology*. 8th ed. New York: W.H. Freeman.
- Losanno, T., Rossi, A., Maione, P., Napolitano, A., Gridelli, C. (2016). Anti-EGFR and antiangiogenic monoclonal antibodies in metastatic non-small-cell lung cancer. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 16(6), 747–758. doi:10.1517/14712598.2016.1163333
- Lynch, T. J., Bell, D. W., Sordella, R., Gurubhagavatula, S., Okimoto, R. A., Brannigan, B. W., & Haber, D. A. (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine*, 350(21), 2129–2139. doi:10.1056/NEJMoa040938
- Le Marchand, L., Derby, K. S., Murphy, S. E., Hecht, S. S., Hatsukami, D., Carmella, S. G., & Wang, H. (2008). Smokers with the CHRNA lung cancer-associated variants are exposed to higher levels of nicotine equivalents and a carcinogenic tobacco-specific nitrosamine. *Cancer Research*, 68(22), 9137–9140. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2271
- MacNee, W. (2005). Treatment of stable COPD: antioxidants. *European Respiratory Review*, 14(94), 12–22. doi:10.1183/09058180.05.00009402
- Majeed, U., Manochakian, R., Zhao, Y., Lou, Y. (2021). Targeted therapy in advanced non-small cell lung cancer: current advances and future trends. *Journal of Hematology & Oncology*, 14(1), 108. doi:10.1186/s13045-021-01121-2
- Marsit, C. J., Zheng, S., Aldape, K., Hinds, P. W., Nelson, H. H., Wiencke, J. K., Kelsey, K. T. (2005). PTEN expression in non-small-cell lung cancer: evaluating its relation to tumor characteristics, allelic loss, and epigenetic alteration. *Human Pathology*, 36(7), 768–776. doi:10.1016/j.humpath.2005.05.006
- Mazieres, J., Cropet, C., Montané, L., Barlesi, F., Souquet, P. J., Quantin, X., & Blay, J. Y. (2020). Vemurafenib in non-small-cell lung cancer patients with BRAF^{V600} and BRAF^{nonV600} mutations. *Annals of Oncology*, 31(2), 289–294. doi:10.1016/j.annonc.2019.10.022
- Midha, A., Dearden, S., McCormack, R. (2015). EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *American Journal of Cancer Research*, 5(9), 2892–2911.
- Missaoui, N., Hmissa, S., Landolsi, H., Korbi, S., Joma, W., Anjorin, A., & Mokni, M. (2011). Lung cancer in central Tunisia: epidemiology and clinicopathological features. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 12(9), 2305–2309.
- Mitsudomi, T., Kosaka, T., Endoh, H., Horio, Y., Hida, T., Mori, S., & Yatabe, Y. (2005). Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. *Journal of Clinical Oncology*, 23(11), 2513–2520. doi:10.1200/JCO.2005.00.992
- Mohammadzadeh, S., Jowkar, Z., Mirzai, M., Geramizadeh, B. (2019). Epidermal growth factor receptor (EGFR) gene mutation analysis in adenocarcinoma of lung, the first report from Iran. *Iranian Journal of Pathology*, 14(1), 1–7. doi:10.30699/IJP.14.1.1
- Mok, T., Wu, Y. L., Zhang, L. (2009). A small step towards personalized medicine for non-small cell lung cancer. *Discovery Medicine*, 8(43), 227–231.
- Mraihi, Z., Ben Amar, J., Bouacha, H., Rammeh, S., Hila, L. (2018). EGFR mutation status in Tunisian non-small-cell lung cancer patients evaluated by mutation-specific immunohistochemistry. *BMC Pulmonary Medicine*, 18(1), 132. doi:10.1186/s12890-018-0706-5

- Mubarak, A., Aljufairi, E., Almahari, S. A. (2020). Lung cancer in Bahrain: Histological and molecular features. *The Gulf Journal of Oncology*, 1(34), 48–51.
- Murray, S., Dahabreh, I. J., Linardou, H., Manoloukos, M., Bafaloukos, D., Kosmidis, P. (2008). Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *Journal of Thoracic Oncology*, 3(8), 832–839. doi:10.1097/JTO.0b013e31818071f3
- Naderi, S., Ghorra, C., Haddad, F., Kourie, H. R., Rassy, M., El Karak, F., & Kattan, J. (2015). EGFR mutation status in Middle Eastern patients with non-squamous non-small cell lung carcinoma: A single institution experience. *Cancer Epidemiology*, 39(6), 1099–1102. doi:10.1016/j.canep.2015.08.016
- Nakagawa, K., Garon, E. B., Seto, T., Nishio, M., Ponce Aix, S., Paz-Ares, L., & RELAY Study Investigators. (2019). Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *The Lancet Oncology*, 20(12), 1655–1669. doi:10.1016/S1470-2045(19)30634-5
- National Lung Screening Trial Research Team (2019). Lung cancer incidence and mortality with extended follow-up in the National Lung Screening Trial. *Journal of Thoracic Oncology*, 14(10), 1732–1742. doi:10.1016/j.jtho.2019.05.044
- Nicholson, R. I., Gee, J. M., Harper, M. E. (2001). EGFR and cancer prognosis. *European Journal of Cancer*, 37(S4), S9-15. doi:10.1016/s0959-8049(01)00231-3
- O’Leary, C. G., Andelkovic, V., Ladwa, R., Pavlakis, N., Zhou, C., Hirsch, F., & O’Byrne, K. (2019). Targeting BRAF mutations in non-small cell lung cancer. *Translational Lung Cancer Research*, 8(6), 1119–1124. doi:10.21037/tlcr.2019.10.22
- Ohtsuka, K., Ohnishi, H., Fujiwara, M., Kishino, T., Matsushima, S., Furuyashiki, G., & Watanabe, T. (2007). Abnormalities of epidermal growth factor receptor in lung squamous-cell carcinomas, adenosquamous carcinomas, and large-cell carcinomas: tyrosine kinase domain mutations are not rare in tumors with an adenocarcinoma component. *Cancer*, 109(4), 741–750. doi:10.1002/cncr.22476
- Okonechnikov, K., Golosova, O., Fursov, M., & the UGENE team (2012). Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*, 28, 1166-1167.
- OMS (2004). Gender in lung cancer and smoking research / Sarah Payne. *World Health Organization*.
- Onn, A., Correa, A. M., Gilcrease, M., Isobe, T., Massarelli, E., Bucana, C. D., & Herbst, R. S. (2004). Synchronous overexpression of epidermal growth factor receptor and HER2-neu protein is a predictor of poor outcome in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 10(1 Pt 1), 136–143.
- Ono, M., Kuwano, M. (2006). Molecular mechanisms of epidermal growth factor receptor (EGFR) activation and response to gefitinib and other EGFR-targeting drugs. *Clinical Cancer Research*, 12(24), 7242–7251. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0646
- Oukabli, M., Rharrassi, I., Damiri, A., Qamouss, O., Chahdi, H., Zoubir, Y., Albouzidi, A. (2011). Cancers bronchopulmonaires: étude clinique et anatomopathologique. À propos de 163 cas. *African Journal of Cancer*, 3(1), 29–35. doi:10.1007/s12558-010-0130-4
- Paez, J. G., Jänne, P. A., Lee, J. C., Tracy, S., Greulich, H., Gabriel, S., & Meyerson, M. (2004). EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science*, 304(5676), 1497–1500. doi:10.1126/science.1099314

- Paik, P. K., Arcila, M. E., Fara, M., Sima, C. S., Miller, V. A., Kris, M. G., & Riely, G. J. (2011). Clinical characteristics of patients with lung adenocarcinomas harboring BRAF mutations. *Journal of Clinical Oncology*, 29(15), 2046–2051. doi:10.1200/JCO.2010.33.1280
- Pao, W., Miller, V., Zakowski, M., Doherty, J., Politi, K., Sarkaria, I., & Varmus, H. (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from ‘never smokers’ and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36), 13306–13311. doi:10.1073/pnas.0405220101
- Pao, W., Miller, V. A. (2005). Epidermal growth factor receptor mutations, small-molecule kinase inhibitors, and non-small-cell lung cancer: current knowledge and future directions. *Journal of Clinical Oncology*, 23(11), 2556–2568. doi:10.1200/JCO.2005.07.799
- Pastorino, U., Silva, M., Sestini, S., Sabia, F., Boeri, M., Cantarutti, A., & Marchianò, A. (2019). Prolonged lung cancer screening reduced 10-year mortality in the MILD trial: new confirmation of lung cancer screening efficacy. *Annals of Oncology*, 30(7), 1162–1169. doi:10.1093/annonc/mdz117
- Pedersen, M. W., Meltorn, M., Damstrup, L., Poulsen, H. S. (2001). The type III epidermal growth factor receptor mutation. Biological significance and potential target for anti-cancer therapy. *Annals of Oncology*, 12(6), 745–760. doi:10.1023/a:1011177318162
- Peng, M., Weng, Y. M., Liu, H. L., Yang, G. F., Yao, Y., Han, G., Song, Q. B. (2018). Clinical characteristics and survival outcomes for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor double mutations. *BioMed Research International*, 2018, 7181368. doi:10.1155/2018/7181368
- Pennell, N. A., Arcila, M. E., Gandara, D. R., West, H. (2019). Biomarker testing for patients with advanced non-small cell lung cancer: Real-world issues and tough choices. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. Meeting, 39(39), 531–542. doi:10.1200/EDBK_237863
- Perez-Soler, R., Donato, N. J., Shin, D. M., Rosenblum, M. G., Zhang, H. Z., Tornos, C., & Hong, W. K. (1994). Tumor epidermal growth factor receptor studies in patients with non-small-cell lung cancer or head and neck cancer treated with monoclonal antibody RG 83852. *Journal of Clinical Oncology*, 12(4), 730–739. doi:10.1200/JCO.1994.12.4.730
- Pleasant, E. D., Stephens, P. J., O’Meara, S., McBride, D. J., Meynert, A., Jones, D., & Campbell, P. J. (2010). A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature*, 463(7278), 184–190. doi:10.1038/nature08629
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., Johnson, G. T. (2008). *Cell biology*. Philadelphia: Saunders/Elsevier.
- Pope, C. A., 3rd, Burnett, R. T., Thun, M. J., Calle, E. E., Krewski, D., Ito, K., & Thurston, G. D. (2002). Lung cancer, cardiopulmonary mortality, and long-term exposure to fine particulate air pollution. *JAMA*, 287(9), 1132–1141. doi:10.1001/jama.287.9.1132
- Pope, C. A., 3rd, Thun, M. J., Namboodiri, M. M., Dockery, D. W., Evans, J. S., Speizer, F. E., Heath, C. W., Jr. (1995). Particulate air pollution as a predictor of mortality in a prospective study of U.S. adults. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 151(3 Pt 1), 669–674. doi:10.1164/ajrccm/151.3_Pt_1.669
- Postmus, P. E., Kerr, K. M., Oudkerk, M., Senan, S., Waller, D. A., Vansteenkiste, J., & ESMO Guidelines Committee. (2017). Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology*, 28(suppl_4), iv1–iv21. doi:10.1093/annonc/mdx222
- Powrózek, T., Krawczyk, P., Ramlau, R., Sura, S., Wojas-Krawczyk, K., Kucharczyk, T., & Milanowski, J. (2014). EGFR gene mutations in patients with adenosquamous lung carcinoma. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*, 10(4), 340–345. doi:10.1111/ajco.12177

- Qu, Y.-L., Liu, J., Zhang, L.-X., Wu, C.-M., Chu, A.-J., Wen, B.-L., Hou, S.-J. (2017). Asthma and the risk of lung cancer: a meta-analysis. *Oncotarget*, 8(7), 11614–11620. doi:10.18632/oncotarget.14595
- Quoix, E., Lemarié, E. (2011). Épidémiologie du cancer bronchique primitif : aspects classiques et nouveautés. *Revue des maladies respiratoires*, 28(8), 1048–1058. doi:10.1016/j.rmr.2010.12.015
- Ramadhan, H. H., Taaban, D. F., Hassan, J. K. (2021). The frequency of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) mutations in Iraqi patients with Non-Small Cell Lung Cancer (NSCLC). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 22(2), 591–596. doi:10.31557/APJCP.2021.22.2.591
- Rebuzzi, S. E., Zullo, L., Rossi, G., Grassi, M., Murianni, V., Tagliamento, M., & Genova, C. (2021). Novel emerging molecular targets in non-small cell lung cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(5), 2625.. doi:10.3390/ijms22052625
- Ren, J.-H., He, W.-S., Yan, G.-L., Jin, M., Yang, K.-Y., Wu, G. (2012). EGFR mutations in non-small-cell lung cancer among smokers and non-smokers: a meta-analysis. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 53(1), 78–82. doi:10.1002/em.20680
- Riely, G. J., Pao, W., Pham, D., Li, A. R., Rizvi, N., Venkatraman, E. S., & Miller, V. A. (2006). Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clinical Cancer Research*, 12(3 Pt 1), 839–844. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-1846
- Riely, G. J., Kris, M. G., Rosenbaum, D., Marks, J., Li, A., Chitale, D. A., & Ladanyi, M. (2008). Frequency and distinctive spectrum of KRAS mutations in never smokers with lung adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research*, 14(18), 5731–5734. doi:10.1158/1078-0432.CCR-08-0646
- Riely, G. J., Marks, J., Pao, W. (2009). KRAS mutations in non-small cell lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society*, 6(2), 201–205. doi:10.1513/pats.200809-107LC
- Roskoski, R., Jr. (2014). The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. *Pharmacological Research*, 79, 34–74. doi:10.1016/j.phrs.2013.11.002
- Ruppert, A.-M., Wislez, M., Poulot, V., Lacave, R., Antoine, M., Cadranel, J. (2011). A simple view on lung cancer biology: The EGFR pathway. *Revue des maladies respiratoires*, 28(4), 565–577. doi:10.1016/j.rmr.2011.03.005
- Sakhri, L., Bertocchi, M. (2019). Cancer bronchique et tabac : mise à jour. *Revue des maladies respiratoires*, 36(10), 1129–1138. doi:10.1016/j.rmr.2018.06.013
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463–5467. doi:10.1073/pnas.74.12.5463
- Santillan, A. A., Camargo, C. A., Jr, Colditz, G. A. (2003). A meta-analysis of asthma and risk of lung cancer (United States). *Cancer Causes & Control*, 14(4), 327–334. doi:10.1023/a:1023982402137
- Sasaki, H., Suzuki, A., Tatematsu, T., Shitara, M., Hikosaka, Y., Okuda, K., & Fujii, Y. (2014). Prognosis of recurrent non-small cell lung cancer following complete resection. *Oncology Letters*, 7(4), 1300–1304. doi:10.3892/ol.2014.1861
- Sasaoka, T., Langlois, W. J., Leitner, J. W., Draznin, B., & Olefsky, J. M. (1994). The signaling pathway coupling epidermal growth factor receptors to activation of p21ras. *The Journal of Biological Chemistry*, 269(51), 32621–32625. doi:10.1016/s0021-9258(18)31679-x
- Schabath, M. B., Cote, M. L. (2019). Cancer progress and priorities: Lung cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 28(10), 1563–1579. doi:10.1158/1055-9965.EPI-19-0221

- Scheffler, M., Bos, M., Gardizi, M., König, K., Michels, S., Fassunke, J., & Wolf, J. (2015). PIK3CA mutations in non-small cell lung cancer (NSCLC): genetic heterogeneity, prognostic impact and incidence of prior malignancies. *Oncotarget*, 6(2), 1315–1326. doi:10.18632/oncotarget.2834
- Selvaggi, G., Novello, S., Torri, V., Leonardo, E., De Giuli, P., Borasio, P., & Scagliotti, G. V. (2004). Epidermal growth factor receptor overexpression correlates with a poor prognosis in completely resected non-small-cell lung cancer. *Annals of Oncology*, 15(1), 28–32. doi:10.1093/annonc/mdh011
- Sequist, L. V., Joshi, V. A., Jänne, P. A., Muzikansky, A., Fidias, P., Meyerson, M., & Lynch, T. J. (2007). Response to treatment and survival of patients with non-small cell lung cancer undergoing somatic EGFR mutation testing. *The Oncologist*, 12(1), 90–98. doi:10.1634/theoncologist.12-1-90
- Sequist, L. V., Soria, J.-C., Goldman, J. W., Wakelee, H. A., Gadgeel, S. M., Varga, A., & Camidge, D. R. (2015). Rociletinib in EGFR-mutated non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine*, 372(18), 1700–1709. doi:10.1056/NEJMoa1413654
- Serhier, Z., Bendahhou, K., Soulimane, A., Bennani Othmani, M., Ben Abdelaziz, A. (2018). Prevalence of smoking in the Maghreb: a systematic review and meta-analysis. *La Tunisie Medicale*, 96(10–11), 545–556.
- Shan, L., Wang, Z., Guo, L., Sun, H., Qiu, T., Ling, Y., & Ying, J. (2015). Concurrence of EGFR amplification and sensitizing mutations indicate a better survival benefit from EGFR-TKI therapy in lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer*, 89(3), 337–342. doi:10.1016/j.lungcan.2015.06.008
- Sharma, S. V., Bell, D. W., Settleman, J., Haber, D. A. (2007). Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. *Nature Reviews Cancer*, 7(3), 169–181. doi:10.1038/nrc2088
- Shi, Z., Stack, M. (2015). An Update on Immunohistochemistry in Translational Cancer Research. *Cancer translational medicine*, 1(4), 115-22. doi:10.4103/2395-3977.163802
- Sigel, K., Wisnivesky, J. P. (2017). Comorbidity profiles of patients with lung cancer: A new approach to risk stratification?. *Annals of the American Thoracic Society*, 14(10), 1512–1513. doi:10.1513/AnnalsATS.201706-442ED
- Skoulidis, F., Li, B. T., Dy, G. K., Price, T. J., Falchook, G. S., Wolf, J., & Govindan, R. (2021). Sotorasib for lung cancers with KRAS p.G12C mutation. *The New England Journal of Medicine*, 384(25), 2371–2381. doi:10.1056/NEJMoa2103695
- Steenland, K., Loomis, D., Shy, C., Simonsen, N. (1996). Review of occupational lung carcinogens. *American Journal of Industrial Medicine*, 29(5), 474–490. doi:10.1002/(SICI)1097-0274(199605)29:5<474::AID-AJIM6>3.0.CO;2-M
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F. (2021). Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. doi:10.3322/caac.21660
- Jang, T. W., Oak, C. H., Chang, H. K., Suo, S. J., Jung, M. H. (2009). EGFR and KRAS mutations in patients with adenocarcinoma of the lung. *The Korean Journal of Internal Medicine*, 24(1), 48–54. doi:10.3904/kjim.2009.24.1.43
- Tagu, D., Méreau, A., Jaubert-Possamai, S. (2018). Principes des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3ème Edi, Quæ.
- Takahashi, H., Ogata, H., Nishigaki, R., Broide, D. H., Karin, M. (2010). Tobacco smoke promotes lung tumorigenesis by triggering IKKbeta- and JNK1-dependent inflammation. *Cancer Cell*, 17(1), 89–97. doi:10.1016/j.ccr.2009.12.008

- Tanaka, T., Matsuoka, M., Sutani, A., Gemma, A., Maemondo, M., Inoue, A., & Hagiwara, K. (2010). Frequency of and variables associated with the EGFR mutation and its subtypes. *International Journal of Cancer*, 126(3), 651–655. doi:10.1002/ijc.24746
- Taron, M., Ichinose, Y., Rosell, R., Mok, T., Massuti, B., Zamora, L., & Moran, T. (2005). Activating mutations in the tyrosine kinase domain of the epidermal growth factor receptor are associated with improved survival in gefitinib-treated chemorefractory lung adenocarcinomas. *Clinical Cancer Research*, 11(16), 5878–5885. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-2618
- Tazi, M. A., Er-Raki, A., Benjaafar, N. (2013). Cancer incidence in Rabat, Morocco: 2006-2008. *Ecancermedicalscience*, 7, 338. doi:10.3332/ecancer.2013.338
- Tezel, G. G., Şener, E., Aydın, Ç., Önder, S. (2017). Prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer in Turkish population. *Balkan Medical Journal*, 34(6), 567–571. doi:10.4274/balkanmedj.2017.0297
- Tfayli, A., Rafei, H., Mina, A., Khalil, M., Fakhreddin, N., Mahfouz, R., & Zaatari, G. (2017). Prevalence of EGFR and ALK mutations in lung adenocarcinomas in the Levant area - a prospective analysis. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 18(1), 107–114. doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.107
- Travis, W. D., Brambilla, E., Noguchi, M., Nicholson, A. G., Geisinger, K. R., Yatabe, Y., & Yankelwitz, D. (2011). International association for the study of lung cancer/American thoracic society/European respiratory society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma. *Journal of Thoracic Oncology*, 6(2), 244–285. doi:10.1097/jto.0b013e318206a221
- Travis, W. D., Brambilla, E., Nicholson, A. G., Yatabe, Y., Austin, J. H. M., Beasley, M. B., & WHO Panel. (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. *Journal of Thoracic Oncology*, 10(9), 1243–1260. doi:10.1097/JTO.0000000000000630
- Tseng, C.-H., Chiang, C.-J., Tseng, J.-S., Yang, T.-Y., Hsu, K.-H., Chen, K.-C., & Chang, G.-C. (2017). EGFR mutation, smoking, and gender in advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, 8(58), 98384–98393. doi:10.18632/oncotarget.21842
- Turner, M. C., Andersen, Z. J., Baccarelli, A., Diver, W. R., Gapstur, S. M., Pope, C. A., 3rd, & Cohen, A. (2020). Outdoor air pollution and cancer: An overview of the current evidence and public health recommendations. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 70(6), 460–479. doi:10.3322/caac.21632
- Unal, O. U., Oztop, I., Calibasi, G., Baskin, Y., Koca, D., Demir, N., & Yilmaz, A. U. (2013). Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer in western Turkey. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP*, 14(6), 3705–3709. doi:10.7314/apjcp.2013.14.6.3705
- Vaillancourt, R. R., Harwood, A. E., Winitz, S. (1994). Analysis of guanine nucleotides associated with protooncogene ras. *Methods in enzymology*, 238(C), 255–258. doi:10.1016/0076-6879(94)38023-6
- van Meerbeeck, J. P., Fennell, D. A., De Ruyscher, D. K. M. (2011). Small-cell lung cancer. *Lancet*, 378(9804), 1741–1755. doi:10.1016/S0140-6736(11)60165-7
- Véronique, M. (2010). Manuel de techniques d'anatomo-cytopathologie : Théorie et Pratique, 1ere Edi, Masson.
- Vida, S., Pintos, J., Parent, M.-E., Lavoué, J., Siemiatycki, J. (2010). Occupational exposure to silica and lung cancer: pooled analysis of two case-control studies in Montreal, Canada. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*, 19(6), 1602–1611. doi:10.1158/1055-9965.EPI-10-0015

- Viel, E., Curtit, E., Mansi, L., Vignot, S. (2012). EGFR/HER1 : histoire d'une cible thérapeutique. *Bulletin du cancer*, 99(2), 181–189. doi:10.1684/bdc.2011.1385
- Villaruz, L. C., Socinski, M. A., Cunningham, D. E., Chiosea, S. I., Burns, T. F., Siegfried, J. M., Dacic, S. (2013). The prognostic and predictive value of KRAS oncogene substitutions in lung adenocarcinoma. *Cancer*, 119(12), 2268–2274. doi:10.1002/cncr.28039
- Vineis, P., Forastiere, F., Hoek, G., Lipsett, M. (2004). Outdoor air pollution and lung cancer: recent epidemiologic evidence. *International Journal of Cancer. Journal International du Cancer*, 111(5), 647–652. doi:10.1002/ijc.20292
- Wang, C., Qiao, W., Jiang, Y., Zhu, M., Shao, J., Wang, T., & Li, W. (2020). The landscape of immune checkpoint inhibitor plus chemotherapy versus immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4913–4927. doi:10.1002/jcp.29371
- Wang, C., Qiao, W., Jiang, Y., Zhu, M., Shao, J., Wang, T., & Li, W. (2020). The landscape of immune checkpoint inhibitor plus chemotherapy versus immunotherapy for advanced non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Cellular Physiology*, 235(5), 4913–4927. doi:10.1002/jcp.29371
- Wang, G.-Z., Cheng, X., Li, X.-C., Liu, Y.-Q., Wang, X.-Q., Shi, X., & Zhou, G.-B. (2015). Tobacco smoke induces production of chemokine CCL20 to promote lung cancer. *Cancer Letters*, 363(1), 60–70. doi:10.1016/j.canlet.2015.04.005
- Wang, S., Wong, M. L., Hamilton, N., Davoren, J. B., Jahan, T. M., Walter, L. C. (2012). Impact of age and comorbidity on non-small-cell lung cancer treatment in older veterans. *Journal of Clinical Oncology*, 30(13), 1447–1455. doi:10.1200/JCO.2011.39.5269
- Wang, Y., Wang, Y., Li, J., Li, J., Che, G. (2020). Clinical significance of PIK3CA gene in non-small-cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *BioMed Research International*, 2020, 3608241. doi:10.1155/2020/3608241
- Wei, Z., An, T., Wang, Z., Chen, K., Bai, H., Zhu, G., & Wang, J. (2014). Patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) double mutations had a lower objective response rate than those with a single mutation in non-small cell lung cancer when treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Thoracic Cancer*, 5(2), 126–132. doi:10.1111/1759-7714.12068
- Weinstein, I. B. (2002). Review of Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heal of cancer. *Science*, 297(5578), 63–64. doi:10.1126/science.1073096
- Weinstein, I. B., Joe, A. (2008). Oncogene addiction. *Cancer Research*, 68(9), 3077–3080; discussion 3080. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-3293
- Wu, J.-Y., Yu, C.-J., Chang, Y.-C., Yang, C.-H., Shih, J.-Y., Yang, P.-C. (2011). Effectiveness of tyrosine kinase inhibitors on 'uncommon' epidermal growth factor receptor mutations of unknown clinical significance in non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research*, 17(11), 3812–3821. doi:10.1158/1078-0432.CCR-10-3408
- Xiao, J., Zhou, L., He, B., Chen, Q. (2020). Impact of sex and smoking on the efficacy of EGFR-TKIs in terms of overall survival in non-small-cell lung cancer: A meta-analysis. *Frontiers in Oncology*, 10, 1531. doi:10.3389/fonc.2020.01531
- Yarden, Y. (2001). The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *European Journal of Cancer*, 37(S4), S3-8. doi:10.1016/s0959-8049(01)00230-1
- Yokota, J., Shiraishi, K., & Kohno, T. (2010). Genetic basis for susceptibility to lung cancer: Recent progress and future directions. *Advances in Cancer Research*, 109, 51–72. doi:10.1016/B978-0-12-380890-5.00002-8

- Zhang, G.-C., Lin, J.-Y., Wang, Z., Zhou, Q., Xu, C.-R., Zhu, J.-Q., & Wu, Y.-L. (2007). Epidermal growth factor receptor double activating mutations involving both exons 19 and 21 exist in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Clinical Oncology*, 19(7), 499–506. doi:10.1016/j.clon.2007.04.006
- Zhang, S., Che, D., Yang, F., Chi, C., Meng, H., Shen, J., & Yu, Y. (2017). Tumor-associated macrophages promote tumor metastasis via the TGF- β /SOX9 axis in non-small cell lung cancer. *Oncotarget*, 8(59), 99801–99815. doi:10.18632/oncotarget.21068
- Zhang, X., Gureasko, J., Shen, K., Cole, P. A., Kuriyan, J. (2006). An allosteric mechanism for activation of the kinase domain of epidermal growth factor receptor. *Cell*, 125(6), 1137–1149. doi:10.1016/j.cell.2006.05.013
- Zhang, Y.-L., Yuan, J.-Q., Wang, K.-F., Fu, X.-H., Han, X.-R., Threapleton, D., & Tang, J.-L. (2016). The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, 7(48), 78985–78993. doi:10.18632/oncotarget.12587
- Zheng, M. (2016). Classification and pathology of lung cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America*, 25(3), 447–468. doi:10.1016/j.soc.2016.02.003
- Zhou, C., Wu, Y. L., Chen, G., Feng, J., Liu, X.-Q., Wang, C., & You, C. (2015). Final overall survival results from a randomised, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Annals of Oncology*, 26(9), 1877–1883. doi:10.1093/annonc/mdv276

ANNEXES

Annexe A : Autorisation d'accès au CHU Benbadis de Constantine.



Faculté des sciences de la nature et de la Vie
Département de Biologie animale

N°/696/BA/SPC -

Constantine le 19 /09/2016

Monsieur le Chef de Département de Biologie animale
A
Monsieur le Directeur du CHU Benbadis Constantine

Objet : autorisation d'accès,

Monsieur le Directeur,

Je vous prie de bien vouloir autoriser l'accès au CHU de Constantine pour Mr lahmadi Mohamed, et ce dans le cadre de la préparation de sa thèse de doctorat en Biologie animale, (intitulé de la thèse : « étude des marqueurs biologiques et moléculaires cancer du poumon »).

21/09/2016
Favorable

المدير العام
السيد: محمد بن يوسف



Le Chef de Département

رئيس قسم بيولوجية الحيوان
مداسي ابراهيم

OK
Pr Aïcha DEMAÏ
Née BENJAZZA
Chef de Service
Radiothérapie - Oncologie
C.H.U. Constantine

Professeur
F. FILALI
Spécialité: Médecine

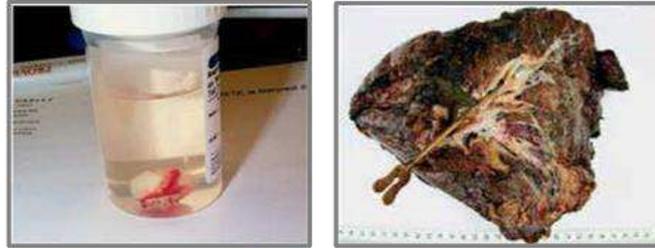
C.H.U. Constantine
S^{co} NEUROLOGIE
Pr : A. HAMRI
CHEF DE SERVICE

Annexe B : Attestation du comité consultatif d'éthique du centre de recherche en biotechnologie.



Annexe C : Technique histopathologique pour préparation des échantillons FFPE.

Fixation au formol & Analyse macroscopique



Déshydratation



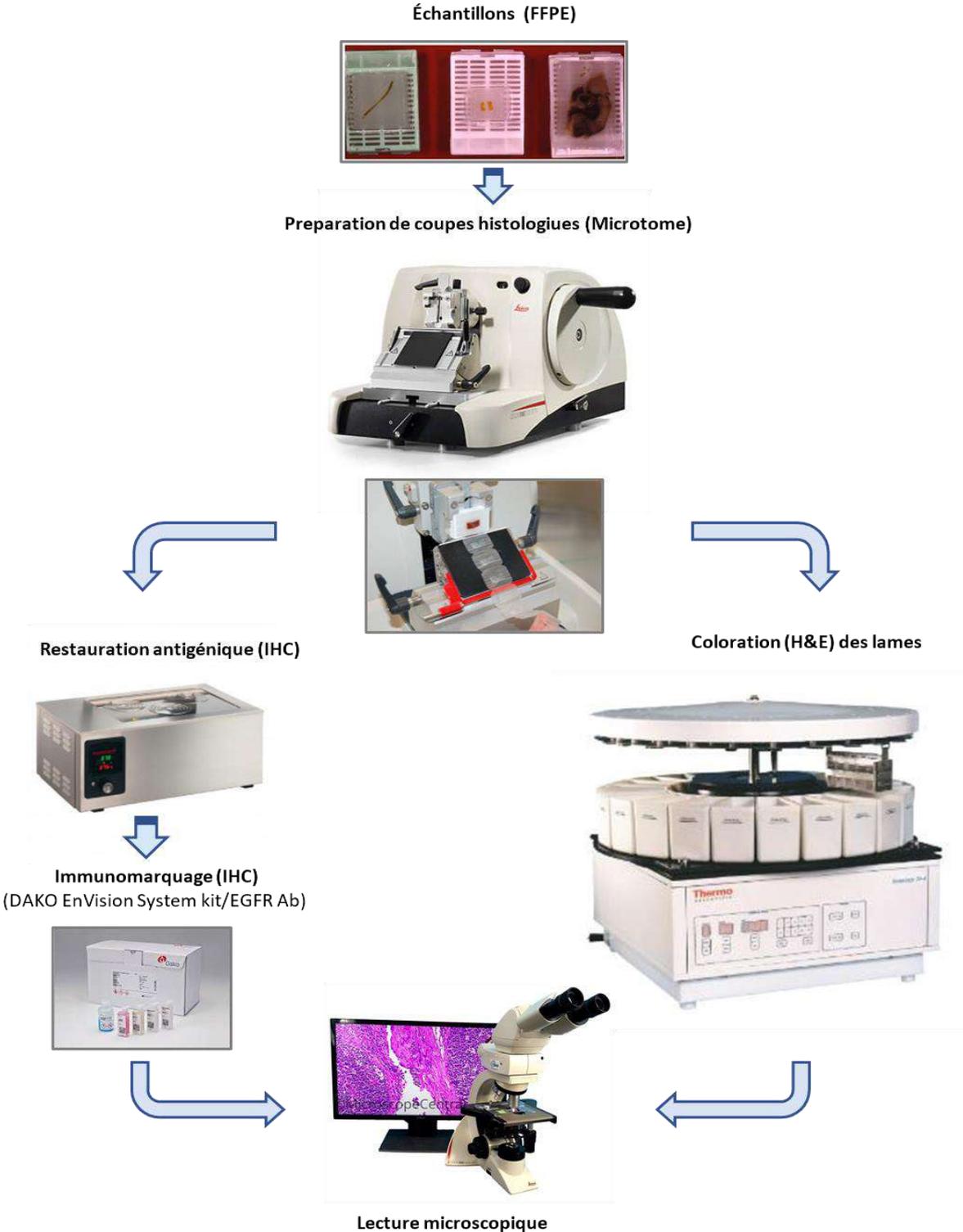
Inclusion à la paraffine



Tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE)



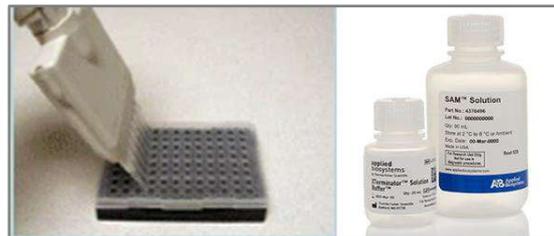
Annexe D : Techniques de coloration histologique (H&E) et d'immunohistochimie.



Annexe E : Procédures du séquençage capillaire.



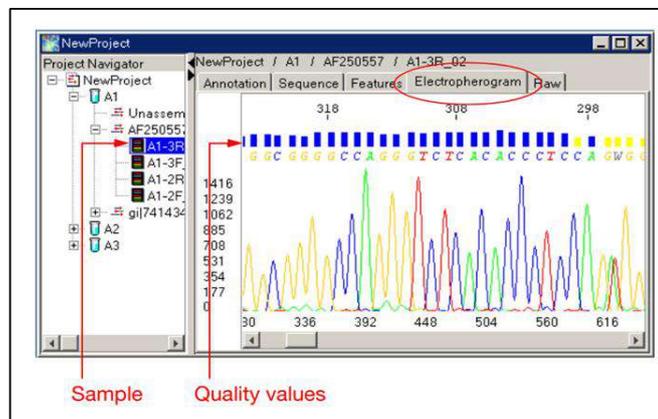
Cycle Sequencing (Bigdye Terminator v3.1 kit)



DNA sequencing product purification (BigDye XTerminator kit)



Capillary Electrophoresis (3500xL Genetic Analyzer)

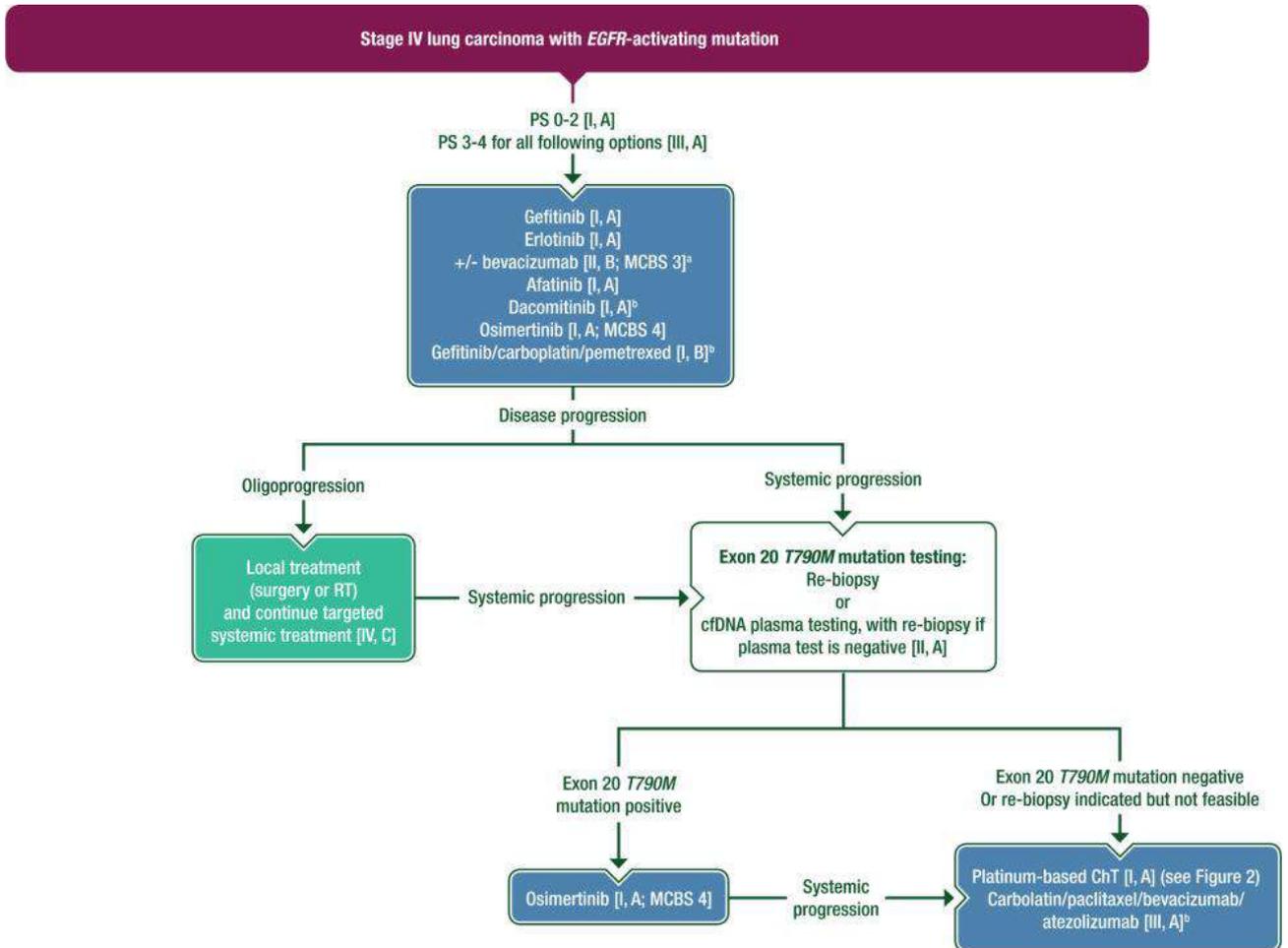


SeqScape Software v.3 (3500xL Genetic Analyzer)

Annexe F : La 8^{ème} classification TNM du cancer broncho-pulmonaire

T - Tumeur	
Tx	Tumeur primaire non connue ou tumeur prouvée par la présence de cellules malignes dans les sécrétions broncho-pulmonaires mais non visible aux examens radiologiques et endoscopiques.
T0	Absence de tumeur identifiable.
Tis	Carcinome <i>in situ</i> .
T1	Tumeur de 3 cm ou moins dans ses plus grandes dimensions, entourée par du poumon ou de la plèvre viscérale, sans évidence d'invasion plus proximale que les bronches lobaires à la bronchoscopie (pas dans les bronches souches).
T1a(mi)	Adénocarcinome minimalement-invasif
T1a	≤ 1 cm
T1b	> 1 cm et ≤ 2 cm
T1c	> 2 cm et ≤ 3 cm
T2	Tumeur de plus de 3 cm, mais de moins de 5 cm OU avec un quelconque des éléments suivants : Envahissement d'une bronche souche quelle que soit sa distance par rapport à la carène mais sans envahissement de la carène, Envahissement de la plèvre viscérale, Existence d'une atélectasie ou pneumonie obstructive
T2a	> 3 cm mais ≤ 4 cm
T2b	> 4 cm mais ≤ 5 cm
T3	Tumeur de plus de 5 cm et de moins de 7 cm , OU associée à un(des) nodule(s) tumoral(aux) distinct(s) dans le même lobe , OU envahissant directement : la paroi thoracique (incluant les tumeurs du sommet), le nerf phrénique, la plèvre pariétale ou le péricarde pariétal.
T4	Tumeur de plus de 7 cm OU associée à des nodules tumoraux séparés dans deux lobes différents du même poumon, OU envahissant directement : le médiastin, le cœur ou les gros vaisseaux, la trachée, ou la carène, le diaphragme, le nerf récurrent, l'œsophage, un(des) corps vertébral(ux).
N - Adénopathies	
Nx	Envahissement locorégional inconnu.
N0	Absence de métastase dans les ganglions lymphatiques régionaux.
N1	Métastases ganglionnaires péri-bronchiques homolatérales et/ou hilaires homolatérales incluant une extension directe.
N2	Métastases dans les ganglions médiastinaux homolatéraux ou dans les ganglions sous-caténaux
N3	Métastases ganglionnaires médiastinales controlatérales ou hilaires controlatérales ou scaléniques, sus claviculaires homo- ou controlatérales.
M - Métastases	
M0	Pas de métastase à distance.
M1	Existence de métastases :
M1a	Nodule(s) tumoral(ux) séparés dans un lobe controlatéral, ou nodules pleuraux ou pleurésie maligne ou péricardite maligne
M1b	Une seule métastase extra-thoracique dans un seul organe
M1c	Plusieurs métastases extra-thoraciques dans un seul ou plusieurs organes

Annexe G : Algorithme de traitement de 1^{re} ligne des CBNPC en situation métastatique avec mutation activatrice de l'EGFR (ESMO, 2020).



Annexe H : Prévalence des mutations de l'EGFR chez les patients atteints de CBNPC selon les origines géographiques et ethniques (d'après Zhang et *al*, 2016).

Variable / Sous-groupe	Nombre des études	Taux des mutations (%)
<u>Ethnicité</u>		
Caucasien	96	17.4 (15.8 - 18.9)
Asiatique	301	38.8 (36.8 - 40.8)
Africain-américain	5	17.2 (5.7 - 28.8)
Mixé	32	27 (22.6 - 31.4)
Ambigu	22	19.3 (16.4 - 22.2)
<u>Localisation</u>		
Asie	96	38.4 (36.5 - 40.3)
Amérique (Nord et Sud)	81	24.4 (22.1 - 26.8)
Europe	62	14.1 (12.7 - 15.5)

Annexe I : Prévalence des mutations de l'EGFR par région/pays chez les patients ayant un adénocarcinome pulmonaire (d'après Midha et *al*, 2015).

Variable / Sous-groupe	Nombre des études	N	Taux des mutations (%)
<u>Europe</u>			~ 15 (6-41)
Italie	9	2223	14 (10 - 33)
Allemagne	7	1573	11 (6 - 41)
France	2	1289	15 (15 - 17)
Pologne	3	678	13 (11 - 14)
Pays-Bas	2	1110	15 (11 - 20)
Espagne	1	1634	17
Royaume-Uni	1	89	12
Grec	2	137	22 (20 - 22)
République de chèque	1	101	21
Russie	2	240	22 (20-31)
<u>Amérique du Nord</u>			~ 22 (3-42)
États unis	16	6663	23 (3-42)
Canada	2	612	14
États unis (Américain africain)	1	121	19
<u>Asie-Pacifique</u>			~ 47 (20-76)
Chine	18	2949	48 (27-66)
Japon	33	4619	45 (21-68)
République de Corée	17	2884	43 (20-56)
Malaisie	2	599	45 (39-47)
Taiwan	9	739	57 (36-76)
<u>Amérique du Sud</u>			~ 36 (9-67)
Argentine	1	244	19
Brésil	3	239	28 (9 - 34)
Peru	1	203	67
<u>Sous-continent indien</u>			~ 26 (22-27)
Bangladesh	1	61	23
Inde	3	1018	26 (22-26)
Pakistan	1	11	27
Australie	4	570	~ 12 (7-36)

Annexe J : Prévalence des mutations de l'EGFR chez les patients atteints de CBNPC
selon les caractéristiques clinicopathologiques (d'après Zhang et *al*, 2016).

Variable / Groupe	Nombre des études	Taux des mutations (%)
<u>Histologie</u>		
Adénocarcinome	307	38 (36.0 - 40.1)
Non-adénocarcinome	203	11.7 (10.6 - 12.7)
<u>Sexe</u>		
Homme	322	24 (22.5 - 25.4)
Femme	331	43.7 (41.5 - 45.9)
<u>Statut tabagique</u>		
Non-fumeur	284	49.3 (47.2 - 51.4)
Fumeur ou ex-fumeur	280	21.5 (20.2 - 22.7)

Analysis of EGFR Mutation Status in Algerian Patients with Non-Small Cell Lung Cancer

Mohamed Lahmadi^{1,2*}, Leila Beddar³, Amira Lyna Rouibah², Ali Boumegoura², Houda Boufendi², Asma Temim², Anissa Nini², Ferial Sellam², Dalila Satta¹

Abstract

Background and objective: Epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation status is used as a predictive biomarker for the tyrosine kinase inhibitors therapy in non-small cell lung cancer (NSCLC). The incidence of EGFR mutations appears to vary according to ethnic and geographical backgrounds. This retrospective study aimed to investigate the EGFR mutation status in Algerian NSCLC patients and its association with clinicopathological features. **Methods:** We examined the presence of EGFR mutations (Exons 19-21) in 58 unselected NSCLC samples using PCR followed by direct sequencing. **Results:** The present study included 53 (91.4%) men and 5 (8.6%) women, with a median age of 59 (ranging from 44 to 94 years old). EGFR mutations were detected in 23 patients, with an overall rate of 39.6%. There were 21 (91.3%) cases with the exon-21 L585R single mutation and two (8.7%) with dual mutations of exon-19 deletions and L585R. EGFR mutations were more frequently found in patients with confirmed adenocarcinoma (14/27, 51.8%) than in non-adenomatous NSCLC subtypes (3/14, 21.4%; $p=0.03$). Furthermore, early stages of the disease were significantly associated with a higher rate of EGFR mutations (14/27, 51.8%) compared with those at advanced stage (5/21, 23.8%; $p=0.02$). There were no significant differences in EGFR mutation frequency by age, gender, or smoking status. **Conclusion:** We found that Algerian NSCLC patients exhibited a high rate of EGFR mutations, which was quite similar to that in Asians population rather than Caucasian patients. Thus, TKI-based treatments may be more beneficial for Algerian patients with NSCLC. Further studies using a large number of patients are required to confirm our preliminary findings.

Keywords: Non-small cell lung cancer- Mutation- EGFR gene- Algeria

Asian Pac J Cancer Prev, 22 (4), 1063-1068

Introduction

Lung cancer remains the leading cause of cancer-related mortality worldwide. According to the latest global cancer statistics, it is responsible for an estimated 1.7 million deaths (18.4% of the total cases) in 2018, and its 5-year survival rate is still at a low level (Bray et al., 2018). Lung cancer is the most commonly diagnosed cancer among males in the Northwest African or Maghreb region, including Algeria (nearly 13.6% of the total cases), Morocco (22.9%), Tunisia (20.2%), and Libya (18.9%). In Algeria, lung cancer is the leading cause of cancer-related death in men, and ranked second in both sexes after breast cancer, with a global age-standardized mortality rate of 10 per 100,000 (<https://gco.iarc.fr/today/>).

Non-small cell lung cancer (NSCLC) accounts for approximately 85% of all lung cancer cases, which is further classified as adenocarcinoma, squamous cell carcinoma, large cell carcinoma, and other rare subtypes (Travis et al., 2015). The discovery of several

targetable genetic alterations in NSCLC and subsequent development of targeted therapies for these patients' subsets have revolutionized the diagnosis and treatment of advanced NSCLCs. The epidermal growth factor receptor (EGFR) and anaplastic lymphoma kinase (ALK) are the most clinically relevant oncogenic drivers in NSCLC (Gaughan and Cost, 2011; Levy et al., 2012). EGFR mutations have been proved to be relevant to NSCLC adenocarcinomas as a predictive biomarker for the tyrosine kinase inhibitors (TKIs) therapy in EGFR-mutant patients. The activating EGFR mutations involve four exons (18–21) within the tyrosine kinase domain, including the largest portion in-frame deletions of exon 19 (Ex19del) and L858R missense point mutation in exon 21 (Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004; Murray et al., 2008). However, tumors eventually acquire resistance to EGFR-TKI therapy. The most common mechanism of acquired resistance is a secondary mutation at exon 20, T790M gatekeeper mutation, occurring in approximately 50% of the NSCLC patients harboring EGFR mutations

¹Department of Animal Biology, University of Mentouri Brothers Constantine 1, Constantine, Algeria. ²Biotechnology Research Center (CRBt), Constantine, Algeria. ³Department of Anatomical Pathology, Ben-Badis Hospital, Faculty of Medicine University of Constantine 3, Constantine, Algeria. *For Correspondence: lahmedi.m@hotmail.com

with acquired resistance to the TKIs (Gazdar, 2009).

The EGFR mutations in NSCLC are primarily found in patients with adenocarcinoma, non-smokers, and females. Ethnic and demographic differences in the prevalence of these driver mutations have been previously reported, with low rates in white patients (~10–20%) and high rates in those of Asian descent (~40–50%) (Midha et al., 2015; Zhang et al., 2016). The prevalence of these mutations and the characteristics of NSCLC patients in the North African region have not been determined. Therefore, our objective in this study was to examine the EGFR mutation status in a sample group of Algerian NSCLC patients and its correlation with clinicopathological features.

Materials and Methods

Patients and samples

This study was conducted at Ben-Badis University Hospital of Constantine between October 2015 and November 2018. It was carried out on 58 samples from unselected patients with histologically confirmed NSCLC who were mainly from the eastern Algerian regions. The formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissue samples prepared using biopsy or surgical specimens were obtained from Department of Anatomic Pathology. The available clinicopathological information, including patient age, gender, smoking status, and cancer staging, were gained from Department of Pneumology and Thoracic Surgery.

DNA extraction

Genomic DNA was extracted from FFPE samples, 10-µm-thick tissue sections, using the AllPrep DNA/RNA FFPE Kit (Qiagen, Hidden, Germany) according to the manufacturer instructions. Then, it was quantified by NanoDrop 8000 Spectrophotometer (ThermoFisher, Waltham, USA).

EGFR mutation analysis

One hundred nanograms of DNA were amplified in a 25 µL reaction solution containing 12,5 µL of 2x AmpliTaq Gold 360 Master Mix with 0,5 µL of GC enhancer (Applied Biosystems, ThermoFisher, Waltham, USA), and 0.3µM of each primer pair for EGFR exons 19, 20 and 21 (Exon 19F: 5'-ATGTGGCACCATCTCACAATTGCC, 19R: 5'-CCACACAGCAAAGCAGA AACTCAC, Exon 20F: 5'-CATTCA TGCCTCTTCACCTG, 20R: 5'-CATATCCCCATGGCA AACTC, Exon 21F: 5'-GCTC AGAGCCTGGCATGAA, 21R: 5'-CATCCTCCCCTGCATGTGT).

The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 95°C for 15 minutes, followed by 35 cycles of denaturation at 95°C for 30 seconds, annealing at 57°C for 30 seconds and extension at 72°C for 45 seconds, followed by a final extension step of 7 minutes at 72 °C. The PCR products were separated in a 2% agarose gel electrophoresis and further purified with a Purelink Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit (Invitrogen, ThermoFisher, Waltham, USA) according to the manufacturer's instructions. The sequencing reaction was performed using the Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) with

sequence-specific primers in both directions. Sequencing data were generated with the ABI-Prism 3500xl Genetic Analyzer and captured by the SeqScape software v3.0 (Applied Biosystems). Sequences were aligned to the EGFR GenBank reference sequence (NG_007726.3), and data were analyzed using Unipro UGENE software (v.34.0).

Statistical analysis

Data were analyzed using the GraphPad Prism software (version 7.0). Chi-square test was done to compare two groups. p <0.05 was considered as statistically significant.

Results

Patients' characteristics

This study investigated 58 samples from patients with NSCLC, including 53 (91.4%) men and 5 (8.6%) women. The patients' median age at diagnosis was 59 (ranging from 44 to 94 years old). They were histologically classified as 27 (46.5%) adenocarcinomas (ADC) and 14 (24%) non-adenomatous NCSCLs (non-ADC), which included 8 squamous cell carcinoma (SqCC) and 6 other subtypes. In addition, 9 (15.5%) cases were NCSCL favor ADC and 8 (14%) favor SqCC. The smoking history and clinical disease staging data were available for 40 (69%) and 48 (82.7%) patients, respectively. Twenty three of the patients (57.5%) were smokers and 17 (42.5%) nonsmokers. Regarding clinical stages of the disease, 27 (56%) cases were at the early-stage of disease (I-III) and

Table 1. EGFR Mutation Status and Clinicopathological Characteristics of Patients

	Overall N = 58 (100%)	Mutant N = 23 (39.6)	Wildtype N = 35 (60.4)	p-value
Age, year				
Median (range)	59 (44-94)	58 (47-73)	60 (44-94)	
< 60	28 (48.3)	12 (42.86)	16 (57.14)	0.29
≥ 60	28 (46.5)	10 (35.71)	18 (66.7)	
Gender				
Male	53 (91.4)	22 (41.5)	31 (58.5)	0.17
Female	5 (8.6)	1 (20)	4 (80)	
Smoking status				
Smoker	23 (39.6)	9 (39.1)	14 (60.9)	0.4
Non-smoker	17 (29.3)	6 (35.3)	11 (64.7)	
Unknown	18 (31.1)	8 (44.4)	10 (55.6)	
Histology				
ADC	27 (46.5)	14 (51.8)	13 (48.2)	0.03*
SqCC	8 (14)	2 (25)	6 (75)	
Favor ADC	9 (15.5)	2 (22.2)	7 (77.8)	
Favor SqCC	8 (14)	4 (50)	4 (50)	
Other types	6 (10)	1 (16.6)	5 (83.4)	
Disease Stage				
I - III	27 (46.5)	14 (51.85)	13 (48.15)	0.02*
IV	21 (36.2)	5 (23.81)	16 (76.19)	
Unspecified	10 (17.2)	4 (40)	6 (60)	

*, Statistically significant.

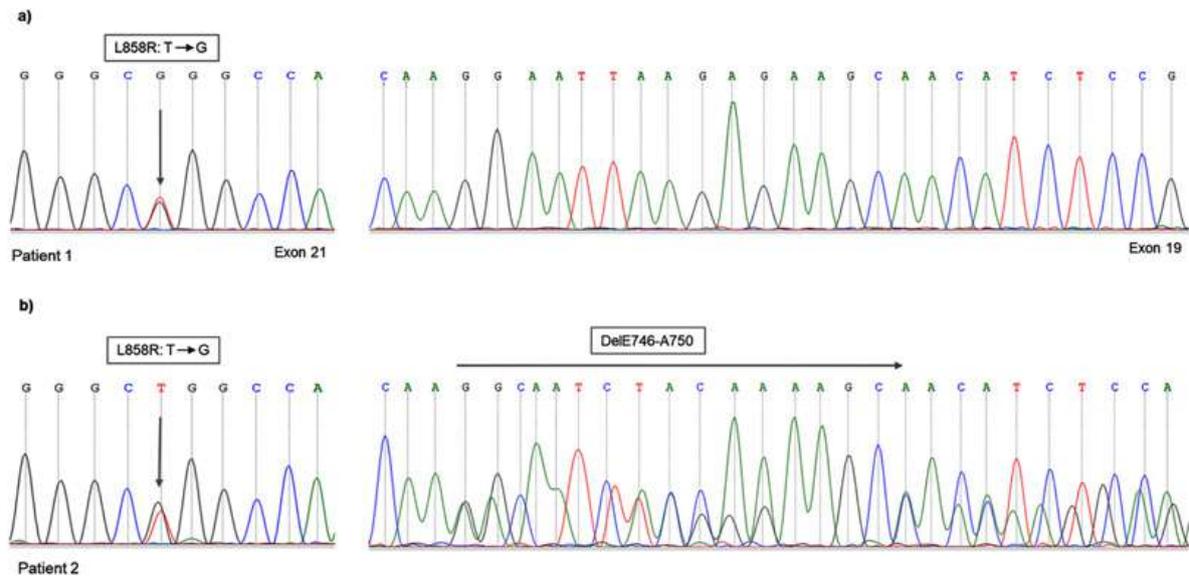


Figure 1. Examples of EGFR Mutation-Positive NSCLC Cases. (a) Patient 1, harboring L858R (Leu858Arg) missense mutation (T to G) in exon 21 with wild-type exon 19. (b) Patient 2, with dual mutations of L858R and in-frame deletion in exon 19 (DelE746-A750) mutations.

21 (44%) were at the advanced stage or metastatic (IV).

EGFR mutation status and its association with clinicopathological characteristics

Table 1 shows the clinicopathological characteristics of patients according to EGFR mutation status. We detected EGFR mutations in 23 out of 58 samples with an overall mutation rate of 39.6%. The median age of patients with EGFR-mutated was 58 (ranging from 47 to 73 years old). According to histological subtypes, a significantly higher incidence of EGFR mutation was observed in patients with confirmed ADC (14/27, 51.8%) compared to those with non-ADC (3/14, 21.4%; p=0.03). Moreover, a high mutation frequency was noted in patients with NSCLC favor SqCC 50% (4/8). Exon 21 L858R single mutation was detected in most patients harboring EGFR mutations, which represent 91.3% (21/23). The

co-occurring of L858R and Ex19del (dual mutations) were identified in 2 (8.7%) cases. Both patients harboring dual mutations were diagnosed with ADC, one woman had L858R and DelL747_P753insS, and one man showed L858R and DelE746_A750 mutations (Figure 1).

Considering the clinical staging of cancer, early stages were significantly associated with a high frequency of EGFR mutations (14/27, 51.8%) compared to advanced stage (5/21, 23.8%; p=0.02). On the other hand, no significant relationship between EGFR mutation rate and age, gender, and smoking status was found. Furthermore, in subgroups of patients diagnosed with ADC, one (33.4%) of three women was harboring mutation and was nonsmoker, while among the evaluated male patients, EGFR mutations were detected in 13 (54%) of 24 of men, including 4/6 (66.6%) nonsmokers versus 6/14 (42.8%) smokers.

Table 2. The Frequency of EGFR Mutations Reported from the Regions of North-Africa and the Middle East

	Frequency (%)	N	Histology	Method	Study
North Africa					
Algeria	39.6	58	NSCLC	Sanger	This study
Morocco	21	120	ADC	TaqMan & Sanger	Errihani et al.
Tunisia	5.5	73	ADC	Sanger	Dhieb et al.
	44	50	ADC	IHC	Mraihi et al.
	11.5	26	ADC	ARMS/Scorpion	Arfaoui et al.
Middle East					
Gulf region	28.7	230	NSCLC	qPCR	Jazieh et al.
Levant region	15.6	205	ADC	ARMS/Scorpion	Tfayli et al.
Lebanon	11.9	201	Non-SqCC	ARMS/Scorpion	Naderi et al.
	8.5	106	ADC	ARMS/Scorpion	Fakhraddin et al.
Turkey	16.7	959	NSCLC	qPCR	Tezel et al.
	32.3	300	ADC	Pyrosequencing	Demiray et al.
	42.6	48	NSCLC	Sanger	Unal et al.

ARMS, Amplification-refractory mutation system; IHC, Immunohistochemistry; qPCR, Quantitative PCR.

Discussion

The presence of EGFR mutations was shown to be associated with increased sensitivity to TKIs therapy in NSCLC (Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004). Currently, EGFR-TKIs gefitinib and erlotinib are considered to be effective as first-line treatments for advanced NSCLC patients with EGFR-mutant (Inoue et al., 2013; Zhou et al., 2015). Furthermore, the incidence of EGFR mutations appears to be dependent on tumor histological type, gender, smoking history, and ethnic background (Midha et al., 2015; Zhang et al., 2016). In the present study, we investigated the EGFR mutation status in NSCLC patients from eastern Algeria.

We found that the EGFR mutation rate was 39.6%, a frequency higher than that reported in Caucasian and quite similar to that in Asian patients. Varying results have been reported in ethnic groups closed to our population, such as North Africa and Middle East regions (Table 2). In contrast with our findings, Errihani et al., (2013) found a frequency of 21% regarding EGFR mutations among Moroccan patients with lung ADC. Besides, Dhieb et al., (2019) in Tunisia reported 5,5% EGFR mutations in patients with ADC. Similarly, Arfaoui et al., (2018) reported 11,5% EGFR mutations. Nevertheless, Mraïhi et al., (2018) found a frequency of 44% in a cohort of Tunisian patients using mutation-specific immunohistochemistry, which was in line with our results. Studies conducted in Arab countries reported frequencies ranging from 8.5-12% for Lebanon (Fakhruddin et al., 2014; Naderi et al., 2015), 15,6% for the Levant region (Tfayli et al., 2017), and up to 28.7 for the Gulf region (Jazieh et al., 2015). In the Turkish population, a previous study by Unal et al., (2013) revealed EGFR mutation frequency of 42.6% in NSCLC patients from western Turkey, but in recent large-scale studies, Tezel et al., (2017) showed that the mutation rate in Turkish NSCLC patients was 16,7%. However, it was 32.3% in patients with ADC in a study by Demiray et al., (2018). These findings could support the heterogeneity in the prevalence of EGFR mutations. For example, reports from extensively evaluated populations also showed large variability with EGFR mutation frequencies in patients with lung ADC ranging between 6-41% in Europe, 3-42% in North America, and 20-76% in Asia-Pacific (Midha et al., 2015). Moreover, according to a meta-analysis of 456 studies conducted by Zhang et al., (2016), there was a significant heterogeneity in all analyzed variables related to the prevalence of EGFR mutations in NSCLC patients. Besides ethnic backgrounds, patient characteristics, clinical setting, and methodology may contribute to these differences. Thus, the data currently available do not enable us to arrive at a precise conclusion about this issue.

Lung ADC histology represents one of the most important predictors for the testing and treatment of EGFR-mutant patients. EGFR mutations are primarily found in patients with ADC (~38%), and less frequent (~12%) in non-adenomatous NSCLCs (Zhang et al., 2016). In the same line, in our study, we found that EGFR mutations were more frequent in patients with ADC compared to those with confirmed non-ADC

subtypes. Nonetheless, there was a high mutation frequency in NSCLC favor SqCC subtype. This finding may be explained by the fact that most positive cases tumor specimen originated from small biopsies. These results were consistent with previous findings by Ho et al., (2019) showing a high rate of mutations in small biopsy-diagnosed SqCC or favor SqCC, which may be adenosquamous carcinoma. Therefore, the testing of EGFR mutations could be recommended for patients with squamous NSCLC diagnosed from small biopsies.

Ex19del and L858R mutations represent approximately 47% and 41% of total EGFR mutations, respectively (Harrison et al., 2020). These two mutations have been reported to be associated with distinct prognostic implications in NSCLC and may require individualized treatment strategies (Liu et al., 2016; Kobayashi and Mitsudomi, 2016). Interestingly, we found frequencies pattern different from those reported in other studies, with the predominance of L858R single mutation and the presence of dual mutations of L858R/Ex19del. Although these two mutations lead to high sensitivity to EGFR-TKIs (Lynch et al., 2004; Pao et al., 2004; Riely et al., 2006), some studies demonstrated that patients with Ex19del mutation had a higher response and survival rates than those with L858R (Jackman et al., 2006; Wang et al., 2015; Jiang et al., 2019). However, in a meta-analysis done by Lee et al., (2015), there was a significantly longer progression-free survival (PFS) in patients harboring L858R than those with Ex19del mutation randomly assigned to chemotherapy. Furthermore, similar PFS benefit was observed in both mutations in NSCLC patients treated with TKI erlotinib in combination with VEGFR2 antagonist Ramucirumab (Nakagawa et al., 2019). On the other hand, dual mutations of L858R/Ex19del seem to be uncommon (Harrison et al., 2020), and the response of this subset of patients to EGFR-TKIs compared with those with a single mutation remains controversial (Zhang et al., 2007; Wei et al., 2014; Peng et al., 2018).

Regarding the relationship between EGFR mutations and patients' clinical characteristics, data from the literature revealed that EGFR mutations were more frequent in never-smokers and female patients (Ren et al., 2012; Zhang et al., 2016; Tseng et al., 2017). In contrast to several reports, the evaluation of available clinical data in our patients showed no correlation between EGFR mutations and women and non-smoking status. Though, we found that patients diagnosed at early stage of the disease exhibited higher EGFR mutation frequency compared with those with metastatic or at advanced stage. This may due to the quality of the specimen, as most of our patients at advanced stage were diagnosed with small biopsies.

Sanger sequencing remains the gold standard method to detect EGFR mutations, preferably rare and unknown mutations, but it has a relatively low sensitivity and more suitable for detecting mutations in surgical specimens (Liang et al., 2018). Moreover, considering the high recurrence rate in NSCLC patients at stages II and III (Sasaki et al., 2014), testing EGFR mutations in patients at early stage would be useful to pave the way toward

more effective therapeutic strategies. Although, some subgroups of NSCLC patients are more likely harboring mutations such as Asian females, never-smokers, with ADC, and Caucasian non-smokers (Zhang et al., 2016), the EGFR mutation testing is recommended by different organizations' guidelines (CAP, AMP, IASLC, and ESMO) for all patients with advanced nonsquamous NSCLC regardless of clinical characteristics, including some patients with SqCC such as non-smokers or youngers (Pennell et al., 2019).

This study included some limitations. First, the sample size was relatively small, especially the scarce number of female patients. Second, some patients did not have clinical data (i.e. smoking and stage of the disease). Finally, the patients involved in our study were mostly from the Eastern region of Algeria. Despite the limitations, our results may predict a high benefit for Algerian NSCLC patients from EGFR-TKI therapy and help to select patients eligible for future research, particularly prospective investigations on the response of patients with EGFR mutation to TKI-based treatments.

In conclusion, our study suggested that approximately 40% of Algerian NSCLC patients would harbor EGFR mutations and therefore would be eligible for TKI-based therapy. The observed EGFR mutation frequency was quite similar to that found in Asian population rather than Caucasian population. These findings demonstrated the need to implement reflex EGFR testing in daily clinical practice. We suggest patients with NSCLC to be tested for EGFR mutations, especially those with adenocarcinoma regardless of clinical characteristics. Nonetheless, these preliminary data require further investigations on a large number of patients.

Ethics approval

This study was conducted according to the international guideline of the Helsinki Declaration (1964) and our national legislation for medical research ethics.

Conflicts of interest/Competing interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

Arfaoui Toumi A, Blel A, Aloui R, et al (2018). Assessment of EGFR mutation status in Tunisian patients with pulmonary adenocarcinoma. *Curr Res Transl Med*, **66**, 65-70.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, et al (2018). Global cancer statistics, 2018: GLOBOCAN Estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*, **68**, 394-424.

Demiray A, Yaren A, Karagenc A, et al (2018). The frequency of EGFR and KRAS mutations in the Turkish population with non-small cell lung cancer and their response to erlotinib therapy. *Balkan J Med Genet*, **21**, 21-6.

Dhieb D, Belguith I, Capelli L, et al (2019). Analysis of genetic alterations in Tunisian patients with lung adenocarcinoma. *Cells*, **8**, 514.

Errihani H, Inrhaoun H, Boukir A, et al (2013). Frequency and type of epidermal growth factor receptor mutations in Moroccan patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac*

Oncol, **8**, 1212-4.

Fakhruddin N, Mahfouz R, Farhat F, et al (2014). Epidermal growth factor receptor and KRAS mutations in lung adenocarcinoma: A retrospective study of the Lebanese population. *Oncol Rep*, **32**, 2223-9.

Gaughan EM, Cost DB (2011). Genotype-driven therapies for non-small cell lung cancer: focus on EGFR, KRAS, and ALK gene abnormalities. *Ther Adv Med Oncol*, **3**, 113-25.

Gazdar AF (2009). Activating and resistance mutations of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene*, **28**, 24-31.

Harrison PT, Vyse S, Huang PH (2020). Rare epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations in non-small cell lung cancer. *Semin Cancer Biol*, **61**, 167-79.

Ho HL, Kao HL, Yeh YC, Chou TY (2019). The importance of EGFR mutation testing in squamous cell carcinoma or non-small cell carcinoma favor squamous cell carcinoma diagnosed from small lung biopsies. *Diagn Pathol*, **14**, 59.

Inoue A, Kobayashi K, Maemondo M, et al (2013). Updated overall survival results from a randomized phase III trial comparing gefitinib with carboplatin-paclitaxel for chemo-naïve non-small cell lung cancer with sensitive EGFR gene mutations (NEJ002). *Ann Oncol*, **24**, 54-9.

International Agency for Research on Cancer: GLOBOCAN 2018, Population Fact Sheets. <http://gco.iarc.fr/today/>.

Jackman DM, Yeap BY, Sequist LV, et al (2006). Exon 19 deletion mutations of epidermal growth factor receptor are associated with prolonged survival in non-small cell lung cancer patients treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*, **12**, 3908-14.

Jazieh AR, Jaafar H, Jaloudi M, et al (2015). Patterns of epidermal growth factor receptor mutation in non-small-cell lung cancers in the gulf region. *Mol Clin Oncol*, **3**, 1371-4.

Jiang H, Zhu M, Li Y, Li Q (2019). Association between EGFR exon 19 or exon 21 mutations and survival rates after first-line EGFR-TKI treatment in patients with non-small cell lung cancer. *Mol Clin Oncol*, **11**, 301-8.

Kobayashi Y, Mitsudomi T (2016). Not all epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer are created equal: Perspectives for individualized treatment strategy. *Cancer Sci*, **107**, 1179-86.

Lee CK, Wu YL, Ding PN, et al (2015). Impact of specific epidermal growth factor receptor (EGFR) mutations and clinical characteristics on outcomes after treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors versus chemotherapy in EGFR-mutant lung cancer: a meta-analysis. *J Clin Oncol*, **33**, 1958-65.

Levy MA, Lovly CM, Pao W (2012). Translating genomic information into clinical medicine: Lung cancer as a paradigm. *Genome Res*, **22**, 2101-8.

Liang C, Wu Z, Gan X, et al (2018). Detection of rare mutations in EGFR-ARMS-PCR-negative lung adenocarcinoma by sanger sequencing. *Yonsei Med J*, **59**, 13-9.

Liu Y, Ren Z, Wang J, Zhang S (2016). Epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor therapy is especially beneficial to patients with exon 19 deletion compared with exon 21 L858R mutation in non-small-cell lung cancer: Systematic review and meta-analysis. *Thorac Cancer*, **7**, 406-14.

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al (2004). Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med*, **350**, 2129-39.

Midha A, Dearden S, McCormack R (2015). EGFR mutation incidence in non-small-cell lung cancer of adenocarcinoma histology: a systematic review and global map by ethnicity (mutMapII). *Am J Cancer Res*, **5**, 2892-911.

- Mraih Z, Ben Amar J, Bouacha H, Rammeh S, Hila L (2018). EGFR mutation status in Tunisian non-small-cell lung cancer patients evaluated by mutation-specific immunohistochemistry. *BMC Pulm Med*, **18**, 132.
- Murray S, Dahabreh IJ, Linardou H, et al (2008). Somatic mutations of the tyrosine kinase domain of epidermal growth factor receptor and tyrosine kinase inhibitor response to TKIs in non-small cell lung cancer: an analytical database. *J Thorac Oncol*, **3**, 832-9.
- Naderi S, Ghorra C, Haddad F, et al (2015). EGFR mutation status in Middle Eastern patients with non-squamous non-small cell lung carcinoma: A single-institution experience. *Cancer Epidemiol*, **39**, 1099-102.
- Nakagawa K, Garon EB, Seto T, et al (2019). Ramucirumab plus erlotinib in patients with untreated, EGFR-mutated, advanced non-small-cell lung cancer (RELAY): a randomized, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Oncol*, **20**, 1655-69.
- Pao W, Miller V, Zakowski M, et al (2004). EGF receptor gene mutations are common in lung cancers from “never smokers” and are associated with sensitivity of tumors to gefitinib and erlotinib. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 13306-11.
- Peng M, Weng YM, Liu HL, et al (2018). Clinical characteristics and survival outcomes for non-small-cell lung cancer patients with epidermal growth factor receptor double mutations. *BioMed Res Int*, **2018**. <https://doi.org/10.1155/2018/7181368>.
- Pennell NA, Arcila ME, Gandara DR, West H (2019). Biomarker testing for patients with advanced non-small cell lung cancer: real-world issues and tough choices. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*, **39**, 531-42.
- Ren JH, He WS, Yan GL, et al (2012). EGFR mutations in non-small-cell lung cancer among smokers and non-smokers: a meta-analysis. *Environ Mol Mutagen*, **53**, 78-82.
- Riely GJ, Pao W, Pham D, et al (2006). Clinical course of patients with non-small cell lung cancer and epidermal growth factor receptor exon 19 and exon 21 mutations treated with gefitinib or erlotinib. *Clin Cancer Res*, **12**, 839-44.
- Sasaki H, Suzuki A, Tatematsu T, et al (2014). Prognosis of recurrent non-small cell lung cancer following complete resection. *Oncol Lett*, **7**, 1300-4.
- Tezel GG, Şener E, Aydın C, Önder S (2017). Prevalence of epidermal growth factor receptor mutations in patients with non-small cell lung cancer in the Turkish population. *Balkan Med J*, **34**, 567-71.
- Tfayli A, Rafei H, Mina A, et al (2017). Prevalence of EGFR and ALK mutations in lung adenocarcinomas in the Levant area – A prospective analysis. *Asian Pac J Cancer Prev*, **18**, 107-14.
- Travis WD, Brambilla E, Nicholson AG, et al (2015). The 2015 World Health Organization classification of lung tumors. *J Thorac Oncol*, **10**, 1243-60.
- Tseng CH, Chiang CJ, Tseng JS, et al (2017). EGFR mutation, smoking, and gender in advanced lung adenocarcinoma. *Oncotarget*, **8**, 98384-93.
- Unal OU, Oztop I, Calibasi G, et al (2013). Relationship between epidermal growth factor receptor gene mutations and clinicopathological features in patients with non-small cell lung cancer in Western Turkey. *Asian Pac J Cancer Prev*, **14**, 3705-9.
- Wang Y, Li RQ, Ai YQ, et al (2015). Exon 19 deletion was associated with better survival outcomes in advanced lung adenocarcinoma with mutant EGFR treated with EGFR-TKIs as second-line therapy after first-line chemotherapy: a retrospective analysis of 128 patients. *Clin Transl Oncol*, **17**, 727-36.
- Wei Z, An T, Wang Z, et al (2014). Patients harboring epidermal growth factor receptor (EGFR) double mutations had a lower objective response rate than those with a single mutation in non-small cell lung cancer when treated with EGFR-tyrosine kinase inhibitors. *Thorac Cancer*, **5**, 126-32.
- Zhang GC, Lin JY, Wang Z, et al (2007). Epidermal growth factor receptor double activating mutations involving both exons 19 and 21 exist in Chinese non-small cell lung cancer patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*, **19**, 499-506.
- Zhang YL, Yuan JQ, Wang KF, et al (2016). The prevalence of EGFR mutation in patients with non-small cell lung cancer: A systematic review and meta-analysis. *Oncotarget*, **7**, 78985-93.
- Zhou C, Wu YL, Chen G, et al (2015). Final overall survival results from a randomized, phase III study of erlotinib versus chemotherapy as first-line treatment of EGFR mutation-positive advanced non-small-cell lung cancer (OPTIMAL, CTONG-0802). *Ann Oncol*, **26**, 1877-83.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

ABSTRACT

Lung cancer is the most commonly diagnosed cancer and the leading cause of cancer-related death in men in Algeria. We carried out this study to assess clinicopathological aspects and risk factors of lung cancer in Eastern Algeria and to investigate EGFR mutation status in a cohort of patients with non-small cell lung cancer (NSCLC).

A retrospective study was conducted on 169 cases of lung cancer at the Benbadis university hospital, between Jun 2015 and December 2020. Clinical and pathological parameters were investigated based on the data found in the patients' medical records. EGFR mutations and protein expression were examined in 58 NSCLC FFPE samples using capillary sequencing and immunohistochemistry, respectively.

Patients with lung cancer showed a male predominance with a sex-ratio of 7.4, with a median age of 61 years. The smoking was estimated as 78.2% in men, while all women were non-smokers. Histologically, adenocarcinoma was the most common histological type (56.2%), followed by squamous cell carcinoma (23%), while small cell carcinoma represented 5.4%. Majority of our patient (over 77%) have advanced stage at the time of diagnosis. The EGFR mutations were found in 39.6% of NSCLC patients, with the predominance of L585R point mutation. They were associated with histologically confirmed adenocarcinoma and early stages of the disease, while had no relationship with age, gender, or smoking status.

In conclusion, our study revealed that most patients with lung cancer were diagnosed with adenocarcinoma and at an advanced stage, with smoking as the most important risk factor in men. Our NSCLC patients exhibited a high rate of EGFR mutations. Thus, the primary prevention, based mainly on tobacco control, and the access to anti-EGFR based treatments, may be the best strategies to reduce lung cancer morbidity and mortality.

Keywords: Lung cancer, Clinicopathological features, EGFR, Mutations, Algeria.

ملخص

سرطان الرئة هو السرطان الأكثر انتشاراً و أكبر متسبب بالوفيات المتعلقة بالسرطان بين الرجال في الجزائر. الهدف من هذه الدراسة كان تقييم الخصائص السريرية و المرضية لسرطان الرئة في شرق الجزائر و كذلك دراسة طفرات الجينية و البروتينية لمستقبل عامل نمو البشرة في مجموعة من مرضى سرطان الرئة ذو خلايا غير الصغيرة.

دراسة وبائية شملت 169 حالة من سرطان الرئة على مستوى مستشفى ابن باديس بقسنطينة خلال الفترة الممتدة ما من جوان 2015 الى ديسمبر 2020. دراسة المتغيرات المتعلقة بالخصائص السريرية و المرضية تم بناء على المعطيات الموجودة في ملفات المرضى. تمت دراسة طفرات جين و بروتين "مستقبل عامل نمو البشرة" في 58 عينة من سرطان الرئة ذو خلايا غير الصغيرة باستعمال تقنية سانجر لمعرفة تنابعات دنيا و تقنية دراسة الانسجة المناعية.

اغلب المرضى كانوا رجال بنسبة 7.4 رجال/نساء, مع معدل عمر 61 سنة. قدرت نسبة التدخين ب78 بالمئة عندالرجال. من ناحية التوزيع الهستولوجي مثل النوع النسيجي ادينوكارسينوما نسبة 56 بالمئة , 23 بالمئة للسكاموكارسينوما و 5.4 بالمئة لسرطان الخلايا الصغيرة. اغلب المرضى كان تشخيصهم متأخر في مرحلة 4 او 3 من المرض بنسبة 77 بالمئة. نسبة وجود طفرات مستقبل عامل نمو البشرة كانت 39.6 بالمئة. هذه الطفرات كانت اكثر عند المرضى مشخصين بادينوكارسينوما و في مراحل مبكرة للمرض, فيما لم تكن علاقة لها مع العمر, الجنس و التدخين.

كخلاصة, دراستنا بينت ان اغلب مرضى سرطان الرئة تم تشخيصهم في مرحلة متأخرة و بنوع الادينوكارسينوما, و التدخين كعامل خطر رئيسي عند الرجال. طفرات مستقبل عامل نمو البشرة كانت بنسبة عالية. لهذا احسن الأساليب لتخفيض من حدوث و وفيات سرطان الرئة هي الوقاية الأولية, معتمدة أساسا على مراقبة التدخين , و استعمال العلاجات الحديثة المعتمدة على استهداف طفرات معينة مثل طفرات مستقبل عامل نمو البشرة.

كلمات مفتاحية : سرطان الرئة, الخصائص السريرية و المرضية, مستقبل عامل نمو البشرة, طفرات, الجزائر.

THEME**Étude du marqueur moléculaire EGFR dans le cancer broncho-pulmonaire**

**Thèse en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat en Sciences
En Biologie et Physiologie Moléculaire**

RÉSUMÉ

Le cancer broncho-pulmonaire (CBP) est le cancer le plus fréquent chez l'homme en Algérie et représente la première cause de mortalité par cancer tous âges confondus. Cette étude a été réalisée dans le but d'évaluer le profil clinico-pathologique des patients atteints de CBP dans l'Est algérien et d'examiner le statut mutationnel de l'EGFR chez les patients atteints de cancer broncho-pulmonaire non à petites cellules (CBNPC).

Notre étude épidémiologique rétrospective a été portée sur 169 patients ayant un CBP au niveau du CHU Benbadis de Constantine, entre juin 2015 et décembre 2020. Les mutations de l'EGFR ont été analysées dans une cohorte de 58 patients atteints d'un CBNPC, en utilisant la technique du séquençage capillaire, l'expression de la protéine EGFR a été évaluée par immunohistochimie.

Notre étude a démontré que le CBP touche principalement les patients âgés de plus de 50 ans (âge médian de 61 ans), avec une prédominance chez les hommes. Le tabagisme reste le principal facteur de risque chez l'homme (78.2%). De plus, l'adénocarcinome représente le type histologique le plus fréquent avec plus de 56% des cas, suivi de carcinome épidermoïde avec 23%, tandis que 5.4% des cas ayant un CBPC. La majorité des patients (77%) ont été diagnostiqués à un stade avancé (stade III ou IV). Les mutations de l'EGFR ont été détectées dans 39.6% des cas, avec une prédominance de la mutation L858R. Ces mutations étaient plus fréquentes chez les patients porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade non métastatique, tandis qu'elles étaient indépendantes de l'âge, du genre et du statut tabagique.

Dans notre population d'étude, la majorité des patients étaient porteurs d'un adénocarcinome et diagnostiqués à un stade avancé, avec le tabagisme comme le principal facteur de risque chez l'homme. Les patients ayant un CBNPC présentent un taux élevé de mutations de l'EGFR. Une prévention primaire s'appuyant principalement sur l'application des politiques de lutte contre le tabagisme et l'accès aux thérapies ciblées anti-EGFR constituent une meilleure stratégie pour réduire la morbidité et la mortalité du CBP.

Mots clés : Cancer broncho-pulmonaire, Profil clinico-pathologique, EGFR, Mutations, Algérie.

Laboratoire de recherche : Centre de Recherche en Biotechnologie (CRBt), Constantine, Algérie