



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH  
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES FES



**THESE**

Présentée

TB  
259

En vue de l'obtention du

**DOCTORAT NATIONAL EN BIOLOGIE**

Spécialité : Biotechnologie

**Par**

**Fouad ABBASS**

**Titre**

**Etude épidémiologique et moléculaire du cancer du sein dans la région Nord-Est du Maroc et effet des anti-PARP-1 sur la cytotoxicité des anticancéreux dans des cellules triple négatives en culture**

**Soutenue publiquement le 24 juin 2013**

**Membres de jury:**

<b>AMARTI RIFFI Afaf</b>	<b>Professeur à la FMP-Fès</b>	<b>Présidente</b>
<b>BENCHEKROUN Mohammed Nabil</b>	<b>Professeur à la FST-Mohammedia</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>NEJJARI Chakib</b>	<b>Professeur à la FMP-Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>MIKOU Karima</b>	<b>Professeur à la FST-Fès</b>	<b>Rapporteur</b>
<b>EI MESBAHI Omar</b>	<b>Professeur à FMP-Fès</b>	<b>Examineur</b>
<b>BENNIS Sanae</b>	<b>Professeur à la FMP-Fès</b>	<b>Invitée</b>
<b>AMRANI JOUTEI Khalid</b>	<b>Professeur à la FST-Fès</b>	<b>Directeur de thèse</b>

**Laboratoire de recherche : Laboratoire des Molécules Bioactives**

**Directeur de thèse : Pr. AMRANI JOUTEI Khalid**

## Résumé

Le profil épidémiologique, clinicopathologique et moléculaire du cancer du sein a été déterminé sur une population de 366 patientes ayant un cancer invasif du sein de la région Nord-est du Maroc. Cette population est caractérisée par un âge jeune, un diagnostic tardif, une taille tumorale importante, un haut grade histologique, des taux élevés d'envahissement ganglionnaire et des métastases à distance. Par la suite, en se basant sur l'immunohistochimie, nous avons classé ces cancers, en cinq groupes moléculaires [luminal A (53.6%), luminal B (16.4%), Her2-positif (12.5%) et triple négatif (17.5%) qui est divisé en deux groupes basal-like (12.5%) et non classé (5%)]. Et nous avons souligné l'importance du contrôle qualité en immunohistochimie (IHC) et hybridation in situ en fluorescence (FISH).

Nous avons également établi une corrélation entre les facteurs clinicopathologiques, la survie globale et la survie sans progression avec les différents groupes moléculaires obtenus. Ainsi, le groupe du triple négatif constitue le groupe ayant le pronostic le plus péjoratif par rapport aux autres groupes.

Contrairement aux patientes Her2-positif et/ou récepteurs hormonaux positifs, les patientes ayant des tumeurs triple négatives ne bénéficient pas de thérapies ciblées. Pour améliorer le pronostic de ce groupe moléculaire, nous avons réalisé une étude expérimentale sur deux lignées cellulaires en culture issues du cancer du sein humain : les cellules triples négatives MDA-MB-231 et les cellules de type luminal MCF7, et nous avons étudié l'effet potentialisateur de la cytotoxicité cellulaire par les inhibiteurs de PARP-1 en association avec les anthracyclines ou sels de platines ou les poisons du fuseau sur les cellules MDA-MB-231. A travers cette étude, nous avons montré une potentialisation des effets cytotoxiques du taxol et du cisplatine par les inhibiteurs de PARP-1 (3-aminobenzamide et 4-aminobenzamide) en traitement séquentiel pour les cellules MDA-MB-231. Toutefois, le mécanisme d'action des inhibiteurs de PARP-1 n'est pas encore élucidé. Ainsi, la compréhension de mode d'action de ces inhibiteurs permettrait de développer des médicaments plus efficaces et extrêmement prometteurs dans les essais cliniques.

**Mots clés :** cancer du sein, profil épidémiologique, classification moléculaire, immunohistochimie, FISH, triple négatif, inhibiteurs de PARP-1.

## Abstract

We determined the epidemiological, clinicopathologic and molecular profiles of 366 patients with invasive breast cancer in the North-eastern Morocco.

These patients were characterized by a young age, late diagnosis, large tumor size, high histological grade, high rates of lymph node and distant metastases. Subsequently, based on immunohistochemistry, we classified these cancers on five molecular groups (luminal A (53.6%), luminal B (16.4%), Her2-positive (12.5%) and triple negative (17.5%) which is divided into two groups: basal-like (12.5%) and non-classified (5%). And we emphasized the importance of quality control in immunohistochemistry (IHC) and Hybridation in situ en fluorescence (FISH).

We also found a correlation between clinicopathological factors, overall survival and progression-free survival with distinct molecular groups.

Patients with triple-negative tumors have a relatively poor outcome and cannot be treated with endocrine therapy or therapies targeted to human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2), in contrast with hormonal receptor positive and HER2+ breast cancers. To improve the prognosis of this molecular group, we conducted an experimental study on two cultured cell lines derived from human breast cancer: MDA-MB-231 triple negative cells and MCF7 luminal cells, and we studied potentiating effect of cellular cytotoxicity by PARP-1 inhibitors in combination with anthracyclines or platinum drugs or mitotic spindle on MDA-MB-231 cells.

Through this study, we have shown a potentiation of cytotoxic drugs (taxol, cisplatin) by PARP-1 inhibitors (3-aminobenzamide and 4-aminobenzamide) in a sequential treatment for MDA-MB-231 cells. However, the mechanism of action of inhibitors of PARP-1 is still unclear. Thus, understanding the mechanism of action for PARP inhibitors would develop more effective drugs and extremely promising in clinical trials.

**Keywords:** breast cancer, epidemiological profile, molecular classification, immunohistochemistry, FISH, triple negative, PARP-1 inhibitors

# SOMMAIRE

<b>Introduction générale</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre I : Etude bibliographique</b> .....	<b>6</b>
<b>A. Epidémiologie et facteurs de risque des cancers du sein</b> .....	<b>7</b>
<b>I. Epidémiologie</b> .....	<b>7</b>
<b>II. Facteurs de risque</b> .....	<b>7</b>
<b>B. Glande mammaire</b> .....	<b>8</b>
<b>I. Anatomie et histologie</b> .....	<b>8</b>
<b>II. Physiologie et physiopathologie de la glande mammaire</b> .....	<b>10</b>
<b>C. Cancérogenèse mammaire</b> .....	<b>13</b>
<b>I. Histoire naturelle du cancer du sein</b> .....	<b>13</b>
<b>II. Mécanismes cellulaires et moléculaires de la cancérogenèse</b> .....	<b>14</b>
1. Cancérogenèse .....	14
a. <u>Initiation</u> .....	14
b. <u>Promotion</u> .....	15
c. <u>Dissémination</u> .....	15
2. Néoangiogenèse.....	16
3. Mécanismes du processus métastatique .....	16
4. Échappement à la veille immunologique.....	18
<b>D. Diagnostic et facteurs pronostiques et prédictifs</b> .....	<b>18</b>
<b>I. Moyen du diagnostic</b> .....	<b>18</b>
1. Diagnostic précoce .....	18
2. Examen clinico-radiologique.....	19
3. Examen cyto-pathologique .....	19
4. Classification histologique du cancer de sein selon l'OMS .....	19
a. <u>Carcinomes non infiltrants</u> .....	19
b. <u>Carcinomes infiltrants</u> .....	19
5. Classification T-N-M (Taille-Nodule-Métastase) .....	21
<b>II. Facteurs pronostiques et prédictifs dans le cancer du sein</b> .....	<b>21</b>
1. Facteurs pronostiques cliniques et histologiques.....	21
a. <u>Age</u> .....	21

b. <u>Taille tumorale</u> .....	21
c. <u>Type histologique</u> .....	22
d. <u>Grade histologique Scarff Bloom Richardson (SBR)</u> .....	22
e. <u>Embols vasculaires péritumoraux</u> .....	23
f. <u>Envahissement ganglionnaire (N)</u> .....	23
g. <u>Métastase à distance (M)</u> .....	23
2. Principaux facteurs pronostiques et prédictifs biologiques.....	23
a. <u>Récepteurs hormonaux</u> .....	23
b. <u>Récepteur Her2/neu</u> .....	24
c. <u>Marqueurs de prolifération : antigène Ki-67</u> .....	24
d. <u>Gène TP53</u> .....	25
e. <u>Autres</u> .....	25
3. Nouveaux moyens pronostiques.....	26
<b>E. Classification moléculaire du cancer du sein</b> .....	<b>26</b>
<b>I. Groupes luminal A et luminal B</b> .....	<b>27</b>
<b>II. Groupe Her2 /neu +</b> .....	<b>28</b>
<b>III. Groupe triple négatifs - basal-like</b> .....	<b>28</b>
<b>IV. Groupe normal-like</b> .....	<b>29</b>
<b>F. Modalités thérapeutiques</b> .....	<b>29</b>
<b>I. Traitement local</b> .....	<b>29</b>
1. Chirurgie.....	29
2. Radiothérapie.....	29
<b>II. Traitement systémique</b> .....	<b>30</b>
1. Chimiothérapie classique.....	30
a. <u>Poisons du fuseau</u> .....	30
b. <u>Cisplatine</u> .....	31
c. <u>Anthracyclines</u> .....	32
2. Hormonothérapie.....	32
3. Thérapeutique ciblée anti-Her2.....	33
4. Vers l'émergence de thérapies ciblées des tumeurs triple négatives.....	33
<b>III. Développement d'une nouvelle thérapeutique ciblée pour les tumeurs triple négatives</b> .....	<b>34</b>

<b>Chapitre II : Matériel et méthodes.....</b>	<b>37</b>
<b>A. Classification histologique et moléculaire du cancer du sein .....</b>	<b>38</b>
<b>I. Etude histologique .....</b>	<b>38</b>
1. Fixation du tissu.....	38
2. Etude macroscopique.....	38
3. Préparation et coloration des coupes .....	39
<b>II. Etude immunohistochimique.....</b>	<b>39</b>
1. Détection des récepteurs hormonaux, des cytokératines et du Ki-67.....	40
2. Détection de l'oncoprotéine Her2.....	41
3. Lecture des lames .....	41
<b>III. Etude par technique d'hybridation fluorescente in situ .....</b>	<b>42</b>
1. Détection de l'amplification du gène Her2.....	42
2. Lecture des lames .....	43
<b>IV. Assurance qualité en immunohistochimie et en FISH.....</b>	<b>43</b>
<b>V. Recueil des données et analyse statistique .....</b>	<b>44</b>
<b>B. Séquençage du gène BRCA1 .....</b>	<b>44</b>
<b>I. Extraction d'ADN génomique aux sels.....</b>	<b>44</b>
1. Lyse des globules rouges.....	44
2. Lyse des globules blancs et Protéolyse.....	45
3. Extraction aux sels.....	45
4. Dissolution et estimation de la concentration de l'ADN.....	45
<b>II. Réaction en chaîne par polymérase (PCR) .....</b>	<b>45</b>
1. Conditions et programmation de la PCR.....	46
2. Electrophorèse sur gel d'agarose.....	47
<b>III. Réaction de séquence et purification .....</b>	<b>47</b>
1. Purification du produit PCR.....	47
2. Réaction de séquence et purification .....	47
<b>C. Pharmacologie des lignées cellulaires triple négatives .....</b>	<b>48</b>
<b>I. Culture cellulaire.....</b>	<b>48</b>
1. Lignées cellulaires étudiées .....	48
a. <u>Lignée MCF7</u> .....	48
b. <u>Lignée MDA-MB-231</u> .....	48

2. Conditions de culture cellulaire .....	48
3. Conservation des lignées cellulaires à long terme .....	49
4. Médicaments anticancéreux utilisés .....	49
a. <u>Détermination du temps d'incubation</u> .....	50
b. <u>Détermination de la concentration optimale des inhibiteurs de PARP1</u> .....	52
c. <u>Le choix de la combinaison de traitements dans les deux lignées cellulaires</u> .....	53
<b>II. Détermination de la cytotoxicité des lignées cellulaires par le test MTT ..</b>	<b>54</b>
1. Expériences préliminaires au test MTT .....	55
2. Détermination de l'IC50 .....	55
<b>III. Mesure de l'apoptose par cytométrie en flux .....</b>	<b>56</b>
<b>IV. Analyse du cycle cellulaire par cytométrie en flux.....</b>	<b>56</b>
<b>Résultats .....</b>	<b>58</b>
<b>Chapitre III: Assurance qualité en immunohistochimie et en hybridation in situ en fluorescence .....</b>	<b>59</b>
<b>I. Introduction .....</b>	<b>60</b>
<b>II. Assurance qualité en immunohistochimie.....</b>	<b>61</b>
1. Conditions de fixation du tissu .....	61
2. Durée et type de démasquage des sites antigéniques .....	62
a. <u>Récepteur Her2</u> .....	62
b. <u>Récepteurs hormonaux</u> .....	63
3. Anticorps et système de révélation .....	64
4. Inhibition des activités enzymatiques endogènes .....	65
5. Contre coloration .....	66
6. Utilisation des contrôles internes.....	66
7. Interprétation de l'immunomarquage et seuil de positivité .....	68
8. Contrôle du pourcentage des cas positifs .....	69
9. Compte rendu détaillé.....	69
<b>III. Contrôle qualité de la technique FISH .....</b>	<b>69</b>
1. Sonde utilisée.....	70
2. Fixation du tissu.....	71
3. Epaisseur de la coupe .....	72

4. Digestion enzymatique par la pepsine .....	73
5. Dénaturation .....	74
7. Calibrage des deux techniques IHC et FISH .....	74
<b>IV. Discussion .....</b>	<b>75</b>

**Chapitre IV: Le profil épidémiologique, histologique et immunophénotypique du cancer du sein dans la région Nord-est du Maroc.....80**

<b>I. Introduction .....</b>	<b>81</b>
<b>II. Etude épidémiologique et histologique .....</b>	<b>82</b>

1. Epidémiologie.....	82
2. Répartition des patientes selon l'âge.....	82
3. Taille macroscopique de la tumeur (T).....	83
4. Différents types histologiques .....	84
5. Classification selon le grade histologique SBR "Scarf-Bloom et Richardson" .....	85
6. Corrélation entre le grade SBR et la taille tumorale.....	85
7. Corrélation entre le grade SBR et la tranche d'âge des patientes.....	86
8. Envahissement ganglionnaire (N) .....	87
9. Métastases à distance (M).....	88
10. Classification selon "American Joint Committee on Cancer "AJCC .....	88
11. Embols vasculaires péri-tumoraux .....	89

**III. Etude immunophénotypique.....89**

1. Statut des récepteurs hormonaux.....	89
2. Statut de l'oncogène Her2 .....	90
3. Corrélation entre les récepteurs (hormonaux et Her2) et la tranche d'âge des patientes.....	92
4. Détermination de l'expression du marqueur de prolifération Ki-67 .....	93

**IV. Discussion .....**

**94**

<b>Chapitre V : Classification moléculaire du cancer du sein et corrélation avec les facteurs clinicopathologiques dans la région Nord-est du Maroc</b>	<b>100</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>101</b>
<b>II. Classification moléculaire du cancer du sein</b>	<b>103</b>
1. Prévalence des groupes moléculaires	103
2. Corrélation des groupes moléculaires avec l'âge des patientes	103
3. Corrélation des groupes moléculaires avec la taille tumorale	104
4. Corrélation des groupes moléculaires avec le grade histologique SBR	105
5. Corrélation des groupes moléculaires avec les embols vasculaires	106
6. Corrélation des groupes moléculaires avec l'envahissement ganglionnaire	106
7. Corrélation des groupes moléculaires avec le statut métastatique à distance	107
<b>III. Survie globale et survie sans progression des patientes en fonction du groupe moléculaire</b>	<b>107</b>
1. Analyse univariée	107
2. Analyse multivariée	109
<b>IV. Séquençage du gène BRCA1 chez 3 patientes présentant une prédisposition génétique au cancer du sein</b>	<b>110</b>
<b>V. Discussion</b>	<b>113</b>

<b>Chapitre VI: Effet potentialisateur des inhibiteurs de poly(ADP-ribose) polymérase 1 sur la cytotoxicité cellulaire des cellules triple négatives induite par des agents anticancéreux</b>	<b>121</b>
<b>I. Introduction</b>	<b>122</b>
<b>II. Effet des agents anticancéreux seuls et en association avec les anti-PARP-1</b>	<b>122</b>
1. Effet cytotoxique de la doxorubicine avec les anti-PARP-1	123
2. Effet cytotoxique du cisplatine avec les anti-PARP-1	126
2. Effet cytotoxique du taxol avec les anti-PARP-1	128



<b>III. Test d'apoptose.....</b>	<b>131</b>
1. Effet apoptotique de la combinaison du cisplatine et de l'inhibiteur de PARP-1 .....	131
3. Effet apoptotique de la combinaison du taxol et de l'inhibiteur de PARP-1 .....	134
<b>IV. Effet des agents cytotoxiques et anti-PARP-1 sur le cycle cellulaire.....</b>	<b>136</b>
1. Effet des inhibiteurs de PARP-1 sur la répartition des cellules dans le cycle cellulaire des cellules MDA-MB-231 .....	138
2. Effet du cisplatine et des inhibiteurs de PARP-1 sur la répartition des cellules MDA-MB-231 dans les phases du cycle cellulaire .....	140
3. Effet du taxol et des inhibiteurs de PARP-1 sur la répartition des cellules MDA-MB-231 dans le cycle cellulaire.....	143
<b>V. Discussion.....</b>	<b>146</b>
<b>Conclusion générale et perspectives.....</b>	<b>153</b>
<b>Références bibliographiques.....</b>	<b>156</b>