

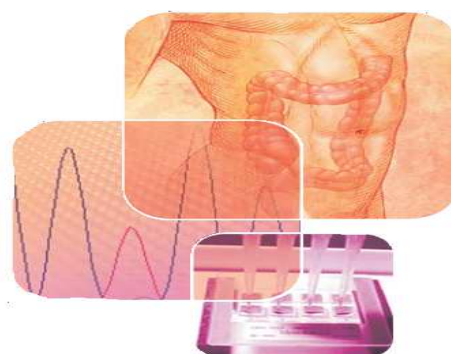
MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour obtenir :

Le diplôme de Master Sciences et Techniques

Spécialité : Biotechnologie microbienne

Implication prédictive des mutations des gènes KRAS et BRAF dans le traitement du cancer colorectal métastatique Un pas vers la médecine personnalisée



Présenté et Soutenu

publiquement:

le: 28 juin 2011

par: *Mlle AOULLAY ZINEB*

Devant les membres du jury:

- Pr GUISSI. S.(FSTF): Encadrante
- Pr .BENNIS. S.(FMPF): Encadrante
- Pr ELHASSOUNI. M.(FSDM): Examineur
- Pr OULDIM. K.(FMPF) : Examineur

Dédicace

A cœur vaillant rien d'impossible

A conscience tranquille tout est accessible

Quand il y a la soif d'apprendre

Tout vient à point à qui sait attendre

Quand il y a le souci de réaliser un dessein

Tout devient facile pour arriver à nos fins

Malgré les obstacles qui s'opposent

En dépit des difficultés qui s'interposent

Les études sont avant tout

Notre unique et seul atout

Ils représentent la lumière de notre existence

L'étoile brillante de notre réjouissance

Comme un vol de gerfauts hors du charnier natal

Nous partons ivres d'un rêve héroïque et brutal

Espérant des lendemains épiques

Un avenir glorieux et magique

Souhaitant que le fruit de nos efforts fournis

Jour et nuit, nous mènera vers le bonheur fleuri

Aujourd'hui, ici rassemblés auprès de jury,

Nous prions dieu que cette soutenance

Fera signe de persévérance

Et que nous serions enchantés

Par notre travail

Z A



Je dédie ce mémoire à



A mes parents, Ghita et Hassan

Pour m'avoir permis d'être ce que je suis et pour tout ce que vous m'avez inculqué et appris.

Vous avez su me transmettre des valeurs justes et honnêtes auxquelles je souhaite continuer à aspirer toute au long de ma vie.

Maman, merci pour ton investissement quotidien, tous tes petits mots d'encouragement et toutes nos discussions. Je te suis absente aujourd'hui mais suis de tout cœur avec toi.

Papa, pour ton investissement dans mes études, l'intérêt que tu portes à ce domaine et ton humour sans pareil.

Merci pour votre présence et votre exemple.

Que ce mémoire vous témoigne de ma reconnaissance et de mon amour.

*A mon frère REDA et mes sœurs, FADOUA, BASSMA et SARA,
Pour tous les moments de bonheur partagés ensemble et tous ceux que l'on partagera encore.*

Le plaisir que nous avons à être réunis est le symbole de mon amour pour vous.

A toute ma famille,

De près ou de loin, vous avez toujours su m'offrir votre soutien, votre compréhension et vos encouragements.

Merci pour toute cette affection et pour toutes les valeurs que vous m'avez transmises.

A tous mes chers amis,

Asmae KH, Meryem T, Lina M, Oumaima B, Rhizlane S, Asmae G, Asmae L, Med Amine EM, Samir T, et Karim T;

Pour votre présence à mes côtés, pour vos conseils, pour tous ces grands moments partagés, et pour votre amitié de longue date. Soyez assurés de mon amitié. Merci d'avoir supporté mes nombreux doutes et découragements et merci pour votre optimisme et votre motivation résistant à toutes épreuves. Merci à tous ceux qui ont partagés les bancs de la fac avec moi, ces six années resteront inoubliables.

« La véritable culture, celle qui est utile, est toujours une synthèse entre le savoir accumulé et l'inlassable observation de la vie. »

Francesco Alberoni

Remerciements

Remerciements

A Monsieur le Pr Iraqui Houssaini Mohamed, chef de Master de Biotechnologie Microbienne à la faculté des sciences et techniques de Fès. Durant nos études, nous avons apprécié bénéficier de votre enseignement. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de ma reconnaissance.

A Madame le Pr GUISSI Sanae, J'ai eu le privilège d'être encadrée par vous, et d'apprécier vos qualités et vos valeurs. Vos compétences, Votre sérieux, votre sens du devoir, votre disponibilité, vos conseils avisés et l'intérêt que vous avez porté à ce travail ainsi que votre bonté d'âme, m'ont énormément marqués. Veuillez trouver ici l'expression de ma respectueuse considération et ma profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour moi l'occasion de vous témoigner ma profonde gratitude.

A Madame le Pr BENNIS Sanae, Vous m'avez fait le grand honneur de me confier ce travail sous votre direction. Tout au long de son élaboration, j'ai eu la chance de profiter de votre expérience. *L'ADN* qui m'était autrefois de la science fiction, aujourd'hui n'a plus de secret pour moi, et cela je vous le dois. Je vous remercie de votre disponibilité et votre accueil toujours chaleureux. Veuillez trouver dans ce travail, l'expression de mon respect et de ma gratitude.

A Monsieur le Pr OULDIM Karim, je vous remercie de m'avoir accueilli au sein du laboratoire UGMO, et vous m'avez fait l'honneur d'accepter avec grande sympathie de siéger parmi notre jury. Je vous prie Monsieur, de trouver ici l'expression de mes sincères et profonds reconnaissances.

A Monsieur le Pr EL HASSOUNI Mohammed, Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de juger ce travail. Je vous prie Monsieur, de trouver ici l'expression de mes sincères et profonds remerciements.

A toute l'équipe du laboratoire UGMO, techniciens et doctorants, BOULOUZ Amal, KANDIL Zineb, ABBASSI Meriame, ABBASS Fouad, BENMAKHOULF Kawtar, EL HAMDAOUI Hassna, et OTHMANI Ihssane.

lieu de stage : lieu de stage :

Le Laboratoire Central d'Analyses Médicales est situé au bâtiment J. Il représente un pôle d'activité hospitalière comportant plusieurs spécialités d'analyses médicales. Ce bâtiment comprend :

- Une salle de réception;
- Une salle de prélèvements;
- Plusieurs laboratoires, à savoir :
 - ☞ Laboratoire de biochimie/Pharmacotoxicologie;
 - ☞ Laboratoire d'hématologie;
 - ☞ Laboratoire de bactériologie /Immunologie;
 - ☞ Laboratoire de parasitologie;
 - ☞ Laboratoire de génétique;
 - ☞ Laboratoire d'anatomie pathologique.

L'unité de génétique médicale et d'oncogénétique est subdivisée en trois disciplines (Clinique, cytogénétique et moléculaire). Elle assure des activités variées qui comprennent:

- Génétique clinique (activité clinique) :
 - ☞ Consultation de génétique (au centre du diagnostic) ;
 - ☞ Conseil génétique (au centre du diagnostic) ;
 - ☞ Consultation d'oncogénétique (au centre du diagnostic) ;
 - ☞ Avis du médecin généticien dans les services cliniques.
- Génétique chromosomique (analyse des chromosomes) :
 - ☞ Cytogénétique classique (caryotype) ;
 - ☞ Cytogénétique moléculaire (FISH : Hybridation In Situ en Fluorescence) ;
- Génétique moléculaire (analyse des gènes : PCR, électrophorèse...).



Font partis des ressources humaines de l'unité de génétique moléculaire et d'oncogénétique :

- Pr. AMARTI RIFI Afaf ; chef de service et Professeur de l'enseignement supérieur, Anatomopathologie ;
- Pr. OULDIM Karim ; Professeur assistant de génétique médicale ;
- Pr. BENNIS Sanae ; Professeur assistant de biologie cellulaire ;
- Mlle HAMDAOUI Ihsane et Mlle OTHMANI Hasna ; techniciennes en génétique médicale.

AVANT PROPOS

Ce travail a été réalisé à l'unité de Génétique Médicale et d'Oncogénétique au CHU Hassan II ; dans le cadre de la réalisation du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master Sciences et Techniques

Je remercie pour cela, Mme AMARTI AFAF RIFIE, Chef de service du laboratoire central du CHU Hassan II, pour son accueil, son orientation scientifique son soutien, et pour le bon déroulement de ce travail.

ADN Désoxyribonucléique	: Acide	IHC Immunohistochimie	:
AMM au Marché	: Autorisation de Mise	KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog	
APC Adenomatous Polyposis Coli	:	LOH Of Heterozygosity	: Loss
BER Repair	: Base Excision	MICI Inflammatoires Chroniques Intestinales	: Maladies
BET d'Ethidium	: Bromure	MLH1 L Homolog 1	: human Mut
BRAF : B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase		MMR Repair	: MisMatch
CCR m métastatique	: Cancer colorectal	MSH2 et MSH6 Homolog 2 et 6	: human Mut s
CIN	: instabilité chromosomique	MSI Microsatellite Instability	:
dATP tri-phosphate	: désoxy Adénine	MSS Microsatellite Stable	:
dCTP tri-phosphate	: désoxy Cytosine	MUTYH Homolog	: Mut Y
dGTP tri-phosphate	: désoxy Guanine	PAF Adénomateuse Familiale	: Polypose
dTTP tri-phosphate	: désoxy thymine	PBS buffered saline	: Phosphate
EDTA acétique	: Ethylène diamine tétra	PCR Chain Reaction	: Polymerase
EGFR Receptor	: Epidermal Growth Factor	Pb Paire de base	:
		PTEN : Phosphatase and TENsin homolog	
		RER Replication Error	:

GDP	: Guanosine DiPhosphate	Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
GTP TriPhosphate	: Guanosine	μl : microlitre
HNPCC	: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer	ng : nanogramme
HES Safran	: Hematoxyline Eosine	sec : seconde
IGF growth Factor	: Insulin	min : minute
IGFR Factor Receptor	: Insulin-like Growth	

Liste des figures

Liste des figures

- **Figures partie bibliographique :**

Figure. 1 : Anatomie du colo-rectum

Figure. 2 : Glandes de Lieberkhun

Figure 3 : Structure de la paroi du côlon

Figure .4 : Les Polypes

Figure. : Chronologie de cancérisation d'un polype

Figure 6 : Carcinome **du côlon**

Figure.7 : Correspondance entre la classification de Dukes et la classification TNM

Fig.8 : Mutations conduisant à l'apparition d'un adénocarcinome colorectal.

Figure 9: voies de signalisation simplifiée des MAP kinases et PI3K/AKT.

Figure.10 : Inactivation et réactivation de la protéine RAS

Figure. 11 : Cascade miteogen activated protein kinases (MAPK).

Figure 12 : Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaires RAS/RAF/MAPK et PI13K/AKT en aval.

Figure 13: Structure du récepteur à l'EGF

Figure 14 : Mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR

Figure 15 : Localisation chromosomique du gène KRAS sur le chromosome 12

Figure16 : Survie en fonction du statut de KRAS

Figure 17 : Réponse thérapeutique selon le statu mutationnel de KRAS

Figure 18 : Localisation chromosomique du gène BRAF sur le chromosome 7

- **Figures matériel et méthodes**

Figure. 1 : Correspondance entre la zone cerclée par l'anatomopathologiste et le bloc

Figure 2 : Spectrophotomètre : SmartSpec Plus spectrophotometerBioRad.

Figure 3 : Différentes étapes d'une PCR.

Figure 4 : Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique.

- **Figures résultats et discussion**

Figure 1: répartition du CCR selon le sexe

Figure 2: répartition du CCR selon le milieu de résidence.

Figure 3. adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation

Figure. 4 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène KRAS exon 2

Figure 5 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène KRAS (amorce KRAS2 bis)

Figure 6: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène KRAS (amorce KRAS2 bis)

Figure 7: Profils d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène KRAS exon 2

Figure 8 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15.

Figure 9. Alignement entre le segment du gène KRAS (brin anti-sens) du patient amplifié par l'amorce KRAS 2- et le segment de référence de base de données.

Figure.10. chromatogramme de séquençage de l'exon 2 du gène KRAS

Figure.11. chromatogramme de séquençage de l'exon 2 du gène KRAS (substitution de G en C sur le codon 13)

Figure 12. Alignement entre le segment du gène BRAF (brin sens) du patient, amplifié par l'amorce BRAF-F et le segment de référence de base de données.

Figure 1 3 : Chromatogramme de séquençage de l'exon 15 du gène BRAF

Liste des tableaux

Liste des tableaux

- **Tableaux étude bibliographique**

Tableau 1 : Stades Dukes et TNM

TABLEAU 2 : Anomalies génétiques des cancers colorectaux en fonction du phénotype LOH+ et MSI+.

Tableau 3 : molécules ciblant l'EGFR

Tableau 4 : Localisation des mutations KRAS

- **Tableaux matériel et méthodes**

Tableau 1 : Composition du mélange réactionnel pour l'étude du codon 12 et 13 exon 2 du gène KRAS

Tableau 2 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène KRAS (KRAS 2bis+/-) exon 2 (115pb)

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour l'étude du codon 600 exon 15 (147 pb) du gène BRAF

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène BRAF

Tableau 5 : cycles de température pour la purification par Exo SAP

Tableau 6 : Composition du mélange de réaction de séquence :

Introduction

Chaque année dans le monde, près d'un million de personnes développent un cancer colorectal et environ 655 000 personnes décèdent des suites de ce cancer. Ces données en font la seconde cause de décès due au cancer (*Jemal et al., 2006*) et le troisième en termes de fréquence dans le monde, après celui de la prostate et du sein.

La probabilité d'être atteint de CCR au cours de la vie est de 5 % (*OLSCHWANG S., 2009*)

En France, un quart des CCR sont métastatiques au moment du diagnostic. Malgré les progrès à la fois chirurgicaux et pharmacologiques dans la prise en charge de ce cancer, son pronostic reste mauvais, avec environ 15 000 décès par an et 50% de survie à 5ans (*Magali S., et*

al., 2010 ; OLSCHWANG S., 2009)

Le cancer colorectal est une maladie hétérogène d'un point de vue moléculaire, avec deux principales voies de cancérogénèse. En effet, les avancées récentes dans la compréhension de la cancérogénèse colorectale et des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans la carcinogénèse et des altérations oncogénétiques somatiques survenant au sein des tumeurs colorectales, a permis d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques, et de développer ainsi des thérapies « ciblées » qui sont désormais utilisées dans le traitement des CCR métastatiques. Seuls les anticorps monoclonaux, associés à la polychimiothérapie conventionnelle, ont prouvé leur efficacité en augmentant la médiane de survie globale à plus de 24 mois. Ces molécules ciblent le *vascularendotheliumgrowth factor* (VEGF) circulant, le facteur de stimulation de la néoangiogénèse, et le récepteur de l'*epidermalgrowth factor* (REGF).

Ces thérapies ciblées, adaptées à chaque patient selon les caractéristiques génétiques de la tumeur, en association avec la chimiothérapie, permettent d'obtenir dans certains cas, des survies prolongées, ainsi que la résecabilité des métastases hépatiques jugées inextirpables. Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces chez tous les malades. De plus, ils sont coûteux et potentiellement toxiques, ce qui rend nécessaire la détermination de facteurs prédictifs de réponse dont découle l'étude de KRAS et BRAF. Ainsi le rôle du pathologiste dans la prise en charge des CCR a été modifié, puisqu'il intervient désormais dans la détermination de ces marqueurs généralement moléculaires (*De Hertogh G. et al., 2010*). Pour les inhibiteurs anti-VEGF circulant, aucun facteur prédictif d'efficacité n'a été identifié pour l'instant. La mutation des gènes KRAS et BRAF est en revanche validée comme facteur de non-réponse, voire comme facteur délétère, en cas d'utilisation d'inhibiteurs du REGF, limitant donc son utilisation aux tumeurs porteuses des gènes KRAS et BRAF sauvages. Les toxicités de ces traitements sont spécifiques, modérées et ne se juxtaposent pas aux toxicités des chimiothérapies conventionnelles.

Ces molécules sont aujourd'hui utilisées à toutes les étapes de la stratégie thérapeutique du CCR métastatique (CCRm) et leur introduction dans l'arsenal thérapeutique actuel pose des interrogations sur le retentissement médico-économique lié à leur utilisation croissante. Il paraît donc indispensable de définir les facteurs prédictifs de réponse à ces molécules afin d'identifier les patients susceptibles d'en bénéficier d'où, le but de notre projet.

En effet, notre travail s'inscrit dans ce cadre, et a pour objectif, la validation des tests moléculaires, pronostics et prédictifs, du statut mutationnel des gènes KRAS et BRAF.

Cette approche permettra par la suite, d'identifier les patients pouvant bénéficier de la biothérapie ciblée et de proposer ainsi à ces malades la stratégie thérapeutique la plus adaptée.

Etude bibliographique

I-Epidémiologie – Pathogénie du cancer colorectal

I.1 Définition

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur développée à partir de la muqueuse colique. Il dérive de l'épithélium glandulaire en débutant par la formation d'adénomes, qui ensuite peuvent évoluer vers une dysplasie de degré croissant, de modérée à sévère.

Cette dysplasie associe des anomalies architecturales de l'épithélium des glandes (stratification, plissement, bourgeonnement), des anomalies cellulaires nucléaires (anisonucléose, hyperchromasie, anomalies des mitoses) et cytoplasmiques (perte de la mucosécrétion), aboutissant à la formation d'un cancer.

I.2 Données épidémiologiques

A. Distribution géographique

Le cancer colorectal, réel problème de santé publique représente environ 13 % de l'ensemble des cancers (*Lamoril. J. et al., 2006*). Il s'agit du quatrième cancer dans le monde (*Viguier J. et al., 2003*) avec une incidence annuelle d'environ 1 million de cas (*World Gastroenterology Organisation., 2007*).

En 2002, plus d'un million de nouveaux cas étaient diagnostiqués dans le monde, et plus de 500 000 décès étaient attribués au cancer colorectal (*Center, M.M., et al., 2009*). 65% des cas diagnostiqués sont des cancers à localisation colique (*Viguier J. et al., 2003*).

Dans la base Globocan en 2002, base du Centre International de Recherche sur le Cancer, il a été estimé que le cancer colorectal représente 550.000 nouveaux cas dont 278.000 décès chez l'homme et 473.000 nouveaux cas dont 255.000 décès chez la femme. En 2002, le cancer colorectal représentait 9,4 % de l'ensemble des cancers pour les deux sexes et il était plus fréquent en Amérique du Nord, Australie, Nouvelle-Zélande et certaines parties de l'Europe. Cette répartition a conduit à penser que le cancer colorectal pouvait être considéré comme une pathologie liée au style de vie occidental.

En France, le cancer colorectal se situe au troisième rang des cancers les plus fréquents derrière le cancer de la prostate (62 245 nouveaux cas) et le cancer du sein (49 814) et il correspond

à la deuxième cause de mortalité par cancer. Il est au troisième rang en Angleterre après le cancer du poumon et du sein avec 35 000 nouveaux cas par an (*Sina.D., et al., 2006*).

Comparativement à d'autres régions du monde, la France apparaît à risque élevé de cancer colique (*Parkin DM. et al., 1997*), avec une incidence voisine de celle des autres pays de l'Europe occidentale, mais plus faible que celle de l'Australie et des États-Unis. Les pays d'Europe du Nord et de l'Est apparaissent comme des régions à risque intermédiaire. Le cancer colique est plus rare en Amérique du Sud, en Asie et surtout en Afrique. Les sujets migrants d'un pays à risque faible vers un pays à risque élevé acquièrent le risque du pays d'accueil dès la deuxième génération, suggérant le rôle de facteurs environnementaux, notamment alimentaires (*Viguiet J. et al 2003*).

Au Maroc l'incidence est inconnue vu l'absence d'un registre national, mais selon l'institut National d'oncologie de RABAT (INO), il occupe la première place parmi les cancers digestifs (40,3%).

Selon le registre des cancers à RABAT de 2005 (RECRAB 2005), Le cancer du côlon est relativement peu fréquent. Son incidence est proche des incidences retrouvées par les autres registres de cancer au Maghreb et reste très inférieure aux incidences observées dans les pays occidentaux, au Japon ou en Chine. Cette incidence est deux fois plus fréquente chez l'homme.

Le service d'épidémiologie de l'Institut National d'Oncologie sidi Mohamed Ben Abdellah, Rabat (INO) a enregistré entre le 15 Janvier 1985 et le 31 Décembre 2002, 68724 nouveaux cas de cancer. Le nombre de cas enregistrés est passé de 2481 en 1985 à 4897 en 2002. (*Al Hilal. M., 2002*)

Il en est de même à Fès, puisque d'après une étude réalisée par l'équipe du service d'anatomopathologie sur les cancers digestifs au CHU Hassan II de Fès entre 2004 et 2007, 432 cas de cancers digestifs ont été hospitalisés durant cette période, représentant 18,5% de l'ensemble des cancers. Le cancer colorectal a occupé la première place avec 166 cas. (*Amarti.A., 2008*).

B. Age et sexe

Le Cancer colorectal est rare avant 50 ans (6% des cas) mais, son incidence augmente avec l'âge. Elle double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes. (*Benhamiche AM.1998; Viguiet J. et al.,2003*).

L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 chez la femme.

(*Benhamiche AM.,1998; Viguier J .et al., 2003*).

Le Cancer colorectal est le quatrième cancer le plus fréquent chez l'homme et le troisième chez la femme (*Center, M.M., et al., 2009*).

Une légère prédominance masculine est notée avec un sexe ratio de 1,5 (*Benhamiche AM.1998; Viguier J .et al., 2003*).

L'incidence est identique dans les deux sexes jusqu'à 65 ans puis apparaît une prédominance masculine liée à une fréquence plus élevée des cancers du côlon descendant et sigmoïde. (*Benhamiche AM.1998; Viguier J .et al., 2003*).

Au Maroc, L'âge moyen de survenue de cancer colorectal d'après les estimations de l'institut national d'oncologie (INO) est 51, 5 ans avec 26,6 % des patients âgés de moins de 40 ans pour le cancer du rectum. (*Lak. K., 2006*).

C. Facteurs de risques :

- L'âge : rare avant cinquante ans, les cancers colorectaux deviennent assez fréquents vers 65 ans.

- Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI), notamment la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse : après une vingtaine d'années, le risque d'avoir un cancer est d'environ 1/3 si tout le côlon est atteint. (*Sachar DB., 1994*)

- Le mode de vie joue aussi un rôle important. En effet, si nous ne pouvons changer notre âge ou notre hérédité, nous pouvons cesser de fumer, de ne pas boire d'alcool, de manger moins de charcuteries mais plus de légumes, et de faire plus de sport. (*Stewart. B.W, Kleihues P., 2004 ;FAIVRE J., 2001*).

- L'hérédité : le risque d'avoir un cancer colorectal est plus élevé si un proche a (ou a eu) un cancer colorectal. Le risque est d'autant plus fort qu'il y a des membres atteints dans la famille, et que ce(s) derniers sont proche(s) (père, mère, frère, sœur) et jeunes. On a identifié des familles à très haut risque, où les gens ont une mutation spécifique qui les prédispose à ce cancer. Ces familles ne représentent cependant que 5 % des cancers colorectaux. (*Viguier. J., 2003*).

I.3 Physiopathologie du cancer colorectal

I.3.1 Rappel anatomique et physiologique

Le côlon et le rectum constituent le gros intestin, qui est la dernière partie du tube digestif. (Figure. 1)

Le côlon se situe dans l'abdomen où il forme un cadre ressemblant à un U inversé.

Il fait suite à l'intestin grêle, dans la fosse iliaque droite, là où se situe l'appendice au niveau du cæcum. De là, il remonte le long de l'abdomen à droite jusqu'au niveau du foie, c'est le côlon droit ou côlon ascendant ;

De l'angle hépatique, traversant l'abdomen de droite à gauche, il prend le nom de côlon transverse jusqu'au niveau de la rate ou angle splénique. De là, il descend le long de l'abdomen jusqu'à la fosse iliaque gauche ; c'est le côlon descendant ou côlon gauche ;

Dans la fosse iliaque, le côlon dessine une boucle en forme de S ou côlon sigmoïde, qui aboutit au **Rectum** sur 15 cm, donnant suite au canal anal qui se termine par l'anus.

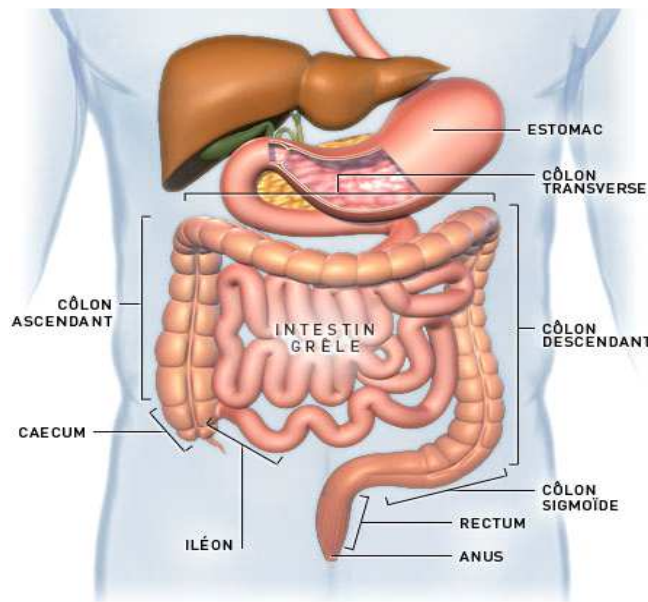


Figure. 1 : Anatomie du colo-rectum

Le rôle principal du colon est la réabsorption de l'eau des selles, alors que Le rôle du rectum est le stockage et l'évacuation des selles. En effet, après leur passage dans l'intestin grêle, les selles sont liquides, puis au fur et à mesure de leur progression dans le colon, l'eau est réabsorbée, les selles s'épaississent et deviennent solides. Le colon est donc responsable de la

concentration, de la formation et du stockage des matières fécales.

L'augmentation de surface nécessaire aux fonctions de réabsorption et de sécrétion (mucus et enzymes), est réalisée par une multitude de profondes glandes tubuleuses droites, évoquant des éprouvettes, ce sont les glandes ou cryptes de Lieberkhun (*Lullmann R.,2008*).



Figure. 2 Glandes de Lieberkhun

Dans la plupart des cas, les cancers colorectaux se développent à partir de ces glandes Lieberkühn qui tapissent l'intérieur de la paroi du côlon et du rectum. Cette forme de cancer est appelée adénocarcinome. Ce terme vient du grec adéno qui signifie glande et carcino qui signifie cancer.

I.3.2 Sièges du cancer par rapport au cadre colique :

Les cancers du côlon et du rectum, du fait de leurs similitudes, sont généralement regroupés sous le terme de cancer colorectal. Les tumeurs siégeant à plus de 15 centimètres (cm) de la marge anale sont des cancers coliques et celles siégeant à moins de 15 cm sont des cancers rectaux. Environ 40% des cancers colorectaux touchent le rectum et 60% le colon. Concernant les cancers du côlon, 70% sont localisés au niveau du sigmoïde.

Le cancer colorectal se situe le plus souvent au niveau du colon proximal, viennent ensuite le rectum et en dernier lieu le colon distal.

Il a été prouvé que l'augmentation de l'incidence au cours du temps est plus marquée pour les cancers du côlon droit (caecum, colon ascendant et transverse) que pour les cancers du côlon gauche (colon descendant, sigmoïde).

La pathologie moléculaire a montré aussi des différences d'emplacement : les tumeurs avec un haut niveau d'instabilité des microsatellites (MSI-H) où les mutations du proto-oncogène RAS sont plus fréquemment localisées au niveau du coecum, du colon ascendant et du colon transverse (Faivre J., 2001).

I.3.3 Cancérogenèse colorectale

- **Lésions précancéreuses**

Le cancer débute de la paroi colorectale constituée de 5 tuniques (LullmannRauch R. ; 2008) (Figure. 3).

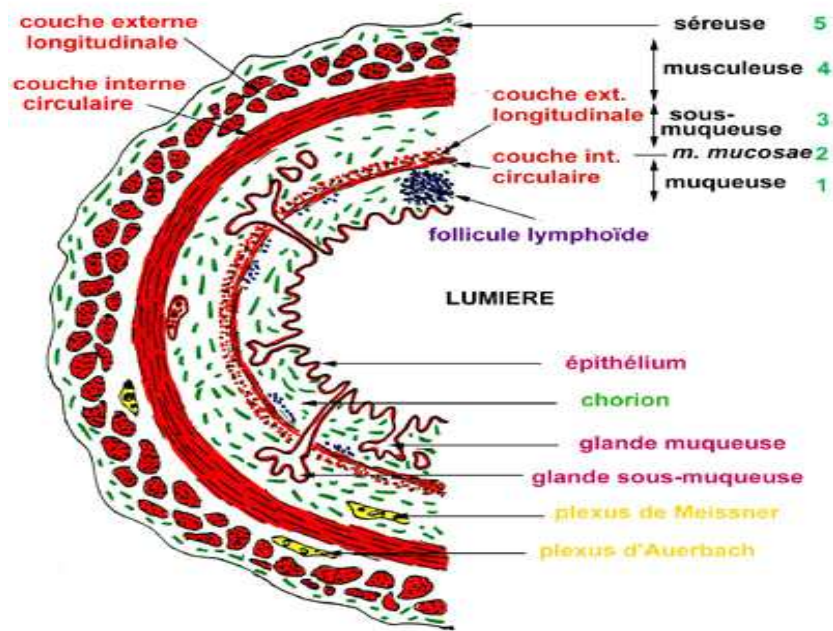


Figure 3. Structure de la paroi du côlon

Sous l'influence de mutations génétiques, il peut se développer dans la lumière intestinale, une tumeur bénigne appelée adénome ou polype (Figure. 4). Celle-ci est la conséquence d'une prolifération régulière de l'épithélium glandulaire de l'intestin (DE

GRAMONT A., et al., 2009). On distingue trois formes de polypes (LEVY P., et al., 2007):

- Des polypes pédiculés : arrondis et en relief, avec une tige et une tête,
- Des polypes sessiles : sous forme de simple élévation, en continuité avec la muqueuse,
- Des polypes plans : moins visibles à l'endoscopie et plus difficiles à ôter (figure.4).

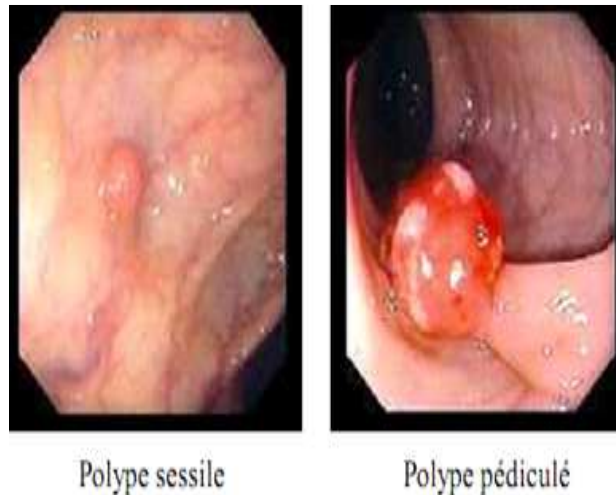


Figure 4 : différentes formes de polypes visualisées par fibroscopie

- **Histogenèse du cancer : Séquence Adénome-cancer**

Dans 95 % des cas, la tumeur primitive est un adénocarcinome qui survient sur un polype préexistant (adénome).

1) L'adénome :

C'est une tumeur épithéliale bénigne dysplasique. Le risque de transformation cancéreuse de l'adénome augmente avec sa taille : 0,5 % si inférieure à 1 cm ; 5 % entre 1 et 2 cm ; 30 % si supérieure à 2 cm. 25 à 30 % des adénomes se transforment en cancer.

2) Le cancer in situ :

Lorsque la prolifération cellulaire dépasse la membrane basale et envahit la muqueuse, le Cancer est dit in situ (par opposition aux autres épithéliums dans l'organisme humain), car il n'y a pas de lymphatiques dans la muqueuse donc pas de risque métastatique.

3) Le cancer invasif :

Lorsque les cellules tumorales dépassent la musculaire muqueuse et envahissent la sous muqueuse (présence de canaux lymphatiques), le cancer est dit invasif. (Bosset J F., Rouanet P., 2005).

On estime à plus de 10 ans, le temps entre la découverte du polype et la cancérisation (FAIVRE J., 2001). Dans ce cas, il semble indispensable de réaliser l'ablation du polype lorsqu'il est découvert, dans la majorité des cas, lors d'une coloscopie.

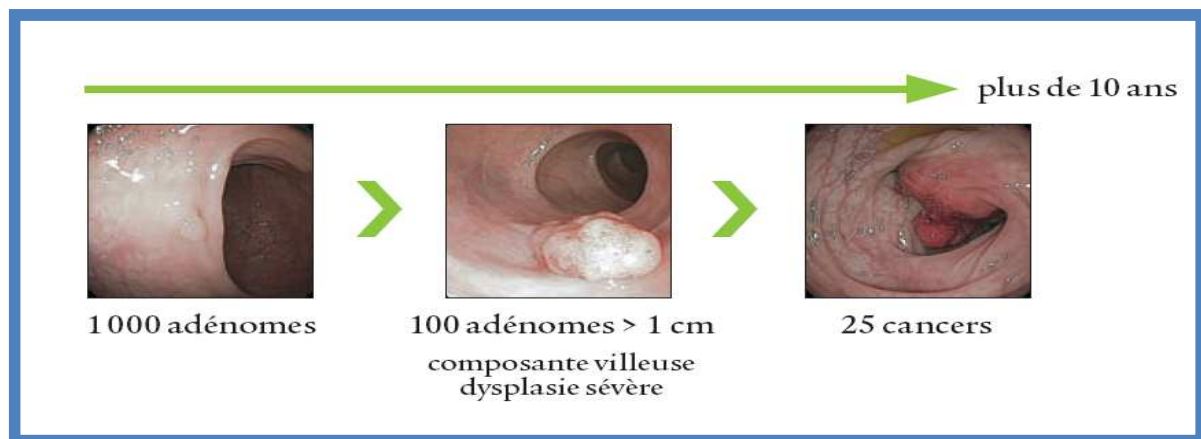


Figure. 5 : chronologie de cancérisation d'un polype

Les cellules cancéreuses qui prolifèrent sans contrôle de l'organisme vont former une tumeur maligne qui grossit localement, au détriment des tissus et des organes sains avoisinants. (Bosset J F., Rouanet P., 2005).

Il existe différents types histologiques de cancer colorectal, selon le type cellulaire à l'origine de la tumeur:

- 80% sont des adénocarcinomes lieberkühnien, développés au sein de l'épithélium glandulaire (glandes de Lieberkhün),
- 10% sont des adénocarcinomes mucineux, développés à partir des cellules à mucus.
- 10% sont des formes rares.

Pour se développer davantage, la tumeur produit des substances qui agissent au niveau des vaisseaux sanguins avoisinants. Ce sont des facteurs de croissance de l'endothélium vasculaire

ou Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF). Ils activent la formation de nouveaux vaisseaux alimentant la tumeur qui pourra ainsi se développer, on parle de néovascularisation ou angiogénèse. (Bosset J F, Rouanet P., 2005).

4 . Métastase(s)

- Lors de la transformation maligne, la tumeur se développe d'abord dans la paroi de l'intestin et ensuite les cellules entreprennent une migration selon deux voies distinctes :
- Voie lymphatique en atteignant les ganglions les plus proches de la lésion,
- Voie hématogène pour atteindre d'autres organes. (DE GRAMONT A, et al., 2009)

Il se forme ainsi des foyers tumoraux à distance de la tumeur primitive, appelés métastases. Les plus fréquentes sont hépatiques (75%), pulmonaires (15%), osseuses (5%) et cérébrales (5%). Ces extensions métastatiques à distances peuvent être synchrones, découvertes en même temps que le cancer colique ; ou métachrones, apparaissant après excision de celui-ci.

I.3.4 Classifications histopronostiques

Si le diagnostic du cancer est confirmé, le praticien va évaluer l'extension ou non de la maladie, et la tumeur sera classée à un certain stade pour la mise en place d'une stratégie thérapeutique.

Plusieurs extensions sont évaluées:

- **Extension locorégionale** : La tumeur est profonde au sein de l'épithélium et l'extension affecte des organes environnant.
- **Extension lymphatique** : Il est possible que les ganglions péri coliques ou péri rectaux soient également affectés. Dans ce cas Les ganglions à distances du colon et du rectum doivent également être analysés.
- **Extension métastatiques** : Si la présence d'une métastase est signalée, son traitement est laissé à l'évaluation du praticien. En effet, ce dernier devra savoir si le traitement est indispensable et quelle sera sa conséquence sur le patient.

Comme pour la majorité des tumeurs malignes, le facteur pronostique le plus important qui

détermine la gravité du carcinome colorectal est celui du stade. Depuis les années soixante, ce sont les stades établis par Dukes qui sont utilisés pour évaluer ce cancer. Ces stades sont relatifs à la profondeur de l'infiltration de la tumeur dans la paroi du côlon ou du rectum (figure 6) et la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques jouent un rôle prédominant. La dernière décennie a connu une modification de l'approche du stade vers le système TNM. Un résumé de ces deux approches, de leur fréquence relative et de l'importance du stade sur le pronostic est présenté dans le tableau 1.

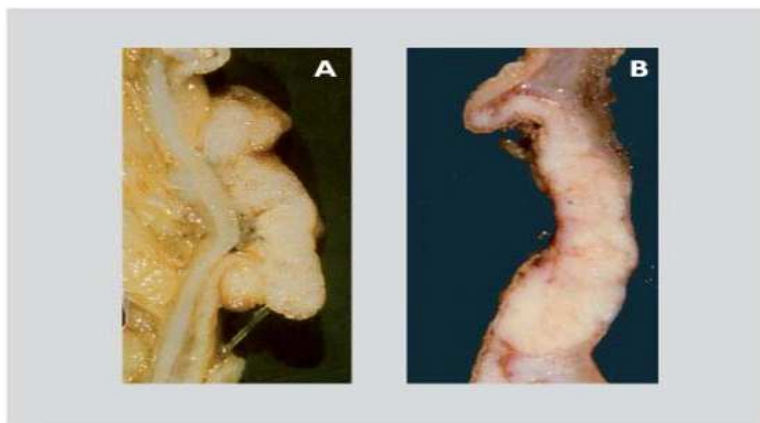


Figure 6 : Carcinome **du côlon**

- Carcinome du côlon T1 ; la tumeur infiltre superficiellement la sousmuqueuse mais pas le musculaire propre.
- Carcinome du côlon au minimum T3 ; la tumeur infiltre diffusément toute la paroi du côlon

Tableau 1 : Stades Dukes et TNM

Stade Dukes	Stade TNM	Stade AJCC	Fréquence (%)	Survie à 5 ans
A	T N0 M0	I	15	93
B	T1 N0 M0	I		
	T2 N0 M0	I		
	T3 N0 M0	IIA	20	85
	T4 N0 M0	IIB	15	72
C	T1,2 N1 M0	IIIA	10	83
	T3,4 N1 M0	IIIB	10	64
	T1-4, N2 M0	IIIC	10	44
D	T1-4, N1,2 M1	IV	20	8

Stade de Dukes
A. La tumeur infiltre la sous-séreuse, pas de métastases (ganglionnaires ou hématogènes)
B. La tumeur infiltre la *muscularis propria*, pas de métastases (ganglionnaires ou hématogènes)
C. Tumeur avec des métastases ganglionnaires, sans métastases hématogènes, tous les stades d'infiltration de la paroi confondus
D. La tumeur avec des métastases hématogènes, avec ou sans métastases ganglionnaires, tous les stades d'infiltration de la paroi confondus

Stade TNM
T1 La tumeur infiltre la sous-muqueuse
T2 La tumeur infiltre la *muscularis propria*
T3 La tumeur infiltre la sous-séreuse
T4 La tumeur infiltre les organes avoisinants ou la séreuse
N1 1-3 ganglions lymphatiques métastatiques
N2 Plus que 3 ganglions lymphatiques métastatiques
M0 Sans métastases hématogènes
M1 Avec métastases hématogènes

Le problème de la valeur du stade, en tant que facteur pronostique, est son manque de précision sur le plan individuel. Si la survie d'un patient ayant un carcinome colorectal de stade III est globalement de 55% à cinq ans, il faut pouvoir déterminer si le patient appartiendra aux 55% qui survivront ou aux 45% qui décéderont. Dans la littérature médicale internationale, des milliers d'articles ont été publiés sur les facteurs pronostiques, mis en évidence par immunohistochimie ou par analyse moléculaire, du cancer colorectal. Cependant, aucun de ces derniers n'est utilisé dans la prise en charge habituelle du cancer colorectal ; les facteurs pronostiques utilisés dans la routine restent le stade, le grade histologique et la présence d'une invasion vasculaire. (Levi F., et al 2007).

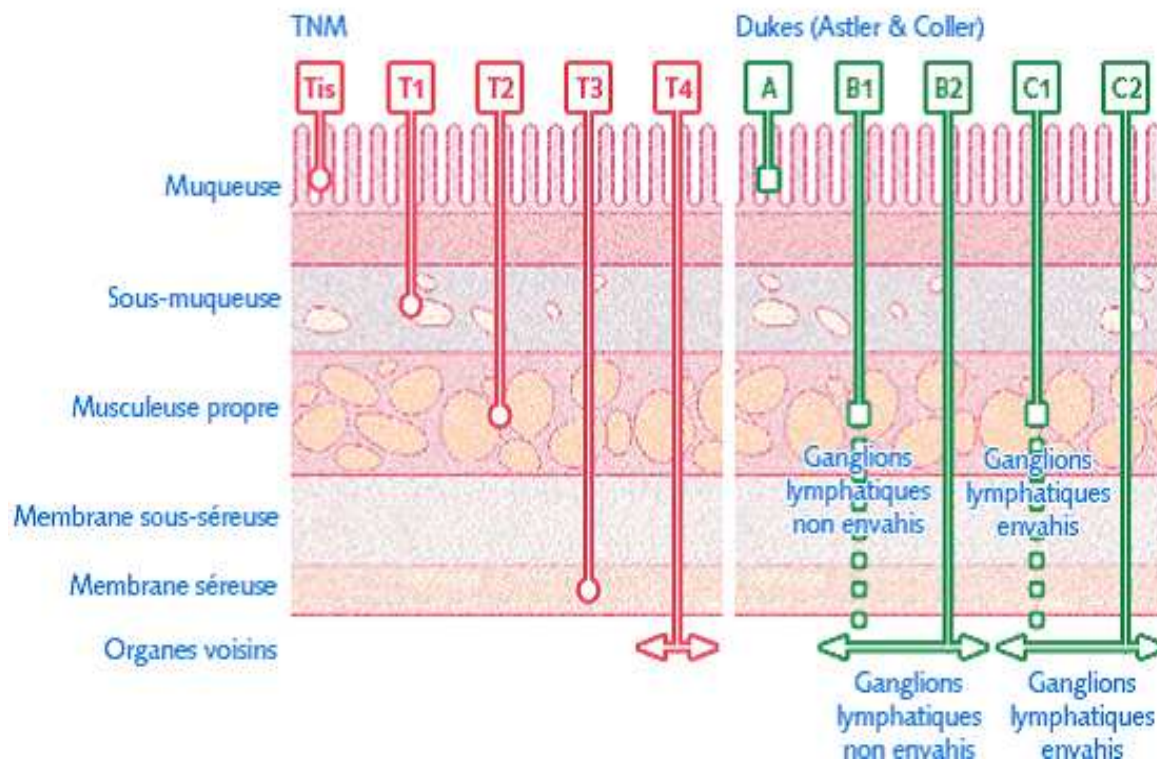


Figure 7 : Correspondance entre la classification de Dukes et la classification TNM

Le risque de récurrence d'un CCR opéré est donc fonction de son stade, et la classification TNM est actuellement la seule classification pronostique validée au plan international permettant d'évaluer ce risque de récurrence et de sélectionner les indications de traitement adjuvant. Ainsi, le bénéfice de la chimiothérapie adjuvante bien établi en cas de CCR stade III, reste controversé en cas de CCR stade II. De ce fait, la chimiothérapie adjuvante est inutile chez 75 % des malades atteints de CCR stade II, guéris seulement par chirurgie mais, elle est potentiellement utile pour les 25 % restants. De même, 40 % à 50 % des malades atteints de CCR stade III auraient été guéris par la chirurgie seule, mais 30 % à 40 % récidivent malgré une chimiothérapie adjuvante.

Ces données soulignent l'importance de valider de nouveaux facteurs pronostiques et même, d'identifier les malades atteints d'un CCR stade II (voire stade I) qui pourraient bénéficier d'une chimiothérapie adjuvante, et ceux atteints d'un CCR stade III chez qui il faudrait intensifier cette chimiothérapie. Ces données témoignent également de l'hétérogénéité biologique des CCR à stade égal. Il apparaît donc logique de chercher de nouveaux facteurs pronostiques parmi les déterminants de cette hétérogénéité biologique, c'est-à-dire les événements moléculaires caractérisant la cancérogenèse colorectale. (Boige V., et al., 2004)

II- Carcinogénèse colorectale et altérations moléculaires

Si pendant longtemps la définition du cancer était limitée à une définition histologique, les progrès récents de la biologie moléculaire, ont permis de montrer qu'il s'agissait d'une maladie de l'ADN conduisant à une prolifération cellulaire incontrôlée. Cette prolifération cellulaire est en rapport avec l'accumulation d'altérations génétiques, parfois constitutionnelles, mais le plus souvent somatiques conférant à la cellule atteinte, un avantage sélectif et de nouvelles propriétés de survie, d'adhérence et de migration (A. LIÈVRE., P. LAURENT-PUIG., 2004 ; Magali Svrcek., 2010)

Les gènes altérés dans les tumeurs colorectaux sont, en effet, des gènes intervenant dans le contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose, de l'angiogénèse et de l'adhérence inter-cellulaire, mais également dans la réparation des lésions de l'ADN (A. LIÈVRE, P. LAURENT-PUIG., 2004). Le taux élevé de mutations mises en évidence dans la majorité des cancers humains ne peut s'expliquer que par la survenue de mutations aléatoires. Pour cette raison, il a été suggéré qu'une instabilité du génome responsable d'un phénotype « mutateur » était un pré-requis à la carcinogénèse. Le cancer colorectal illustre particulièrement bien cette définition moléculaire du cancer. En effet, diverses altérations génétiques surviennent dans le cancer colorectal à différents stades de la carcinogénèse (A. LIÈVRE, P. LAURENT-PUIG., 2004). Ces altérations s'intègrent dans deux types de cancers colorectaux qui ont été identifiés récemment et qui se caractérisent par deux mécanismes moléculaires différents d'instabilité: l'instabilité chromosomique et l'instabilité génétique. Ce double mécanisme moléculaire est étayé par l'existence de deux types de prédispositions héréditaires majeures aux cancers colorectaux qui sont la polypose adénomateuse familiale et le syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer). (Magali Svrcek., et al., 2010).

II.1 Gènes cibles

Les gènes touchés par ces anomalies, ou gènes cibles, sont nombreux. Il s'agit potentiellement de tous les gènes qui contrôlent le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration des cellules et tous les phénomènes de la cancérogenèse. Globalement, ils sont regroupés dans deux catégories représentés par les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur (*M. Ferron et al., 2005*).

Les proto-oncogènes ont une action positive sur la prolifération cellulaire. Leurs versions mutées, appelées oncogènes, sont actives de façon excessive ou inappropriée. Il suffit de la modification d'une seule copie du gène pour activer un oncogène. Les plus impliqués dans le CCR sont *KRAS* et *BRAF*.

Les gènes suppresseurs de tumeur au contraire, ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Les deux copies du gène doivent être modifiées pour qu'il perde sa fonction inhibitrice. Les gènes suppresseurs les plus impliqués dans le CCR sont *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *TP53* (gène de la protéine p53) et *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer).

II.2 Altérations génétiques du cancer colorectal

Les altérations génétiques présentes dans le cancer colorectal correspondent à des altérations qui sont soit quantitatives, soit qualitatives.

Les altérations quantitatives sont représentées par des anomalies du contenu en ADN dans les cellules tumorales (aneuploïdie), présentes sous la forme d'une hyperploïdie dans 50 % à 60 % des tumeurs colorectales (*A. LIÈVRE, P. LAURENT-PUIG., 2004*). Elles peuvent également être représentées par des pertes de fragments chromosomiques, principalement localisées au niveau du bras long du chromosome 5 (5q, contenant *APC*), le bras court du 17 (17p, contenant p53), le bras long du 18 (18q, contenant *DCC*).

Les altérations génétiques qualitatives du cancer colorectal sont représentées, quant à elles, par des mutations localisées au niveau de gènes suppresseurs de tumeur comme *TP53* (muté dans 50 % des cas), *APC* (60-80 %) et *SMAD2/SMAD4* (Mothers Against Decapentaplegic homolog 2 / 4) (20-30 %) ou d'oncogènes tels que *KRAS2* (40 %) et *BRAF* (5-10 %). (*Magali Svrcek., et al. 2010*).

Des anomalies de réparation de l'ADN liées à une altération génétique ou épigénétique des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN, appelés gènes MMR (mismatch repair), sont également décrites (*LIÈVRE A., LAURENT-PUIG. P., 2004*).

II.3 Les deux mécanismes moléculaires de carcinogenèse colorectale

L'ensemble des altérations génétiques présentes dans le cancer colorectal, aussi diverses soient elles, répondent en fait, à deux mécanismes moléculaires différents de transformation maligne des cellules épithéliales.

II.3.1 Le phénotype d'instabilité chromosomique (phénotype LOH+)

Les cancers colorectaux ayant ce phénotype sont les plus fréquents puisqu'ils représentent 85 % des cancers colorectaux. Ce phénotype est caractérisé par la survenue de pertes alléliques (pertes de fragments chromosomiques ou pertes d'hétérozygotie) en 17p et 8p et en 18q, 5q et 22q, d'où leur phénotype dit LOH+ (loss of heterozygosity).

Des mutations des gènes suppresseurs de tumeur *TP53* et *APC*, respectivement localisés en 17p et en 5q, sont fréquemment associées à ces pertes alléliques (*tableau 2*). L'association de ces deux événements, pertes alléliques et mutations, conduisent à l'inactivation bi-allélique de ces gènes suppresseurs de tumeur, favorisant ainsi la prolifération tumorale.

II.3.2 Le phénotype d'instabilité génétique et épigénétique (phénotype MSI+ OU RER+)

Les cancers appartenant à ce groupe représentent 15 % des cancers colorectaux sporadiques et sont caractérisés par la présence d'une instabilité des loci microsatellites liée à un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN, d'où leur phénotype dit MSI+ (microsatellite instability) ou RER+ (replicative error).

Les microsatellites sont des séquences mono- ou plurinucléotidiques répétées du génome humain, particulièrement sujettes à des erreurs d'appariement (mésappariements) de nucléotides. Ces mésappariements surviennent de façon physiologique au cours de la réplication de l'ADN et sont normalement réparées par les protéines du système MMR. En cas de déficience de ce système de réparation, par mutation (comme c'est le cas dans le syndrome HNPCC) il s'agit d'une instabilité génétique. La méthylation de la région promotrice d'un des gènes (comme c'est le cas

pour *hMLH1* dans les cancers colorectaux sporadiques) donne une instabilité épigénétique. Dans les cellules de mammifères, la méthylation de l'ADN a lieu principalement au niveau des cytosines des dinucléotides CpG. Les régions riches en CpG, appelées îlots CpG, sont souvent associées à des promoteurs (60 % des gènes en contiennent) et sont généralement non méthylées dans les cellules normales. Le phénomène de méthylation semble jouer un rôle important dans l'établissement du phénotype MSI sporadique, mais aussi héréditaire. En effet, outre *MLH1*, plusieurs dizaines de gènes ont été décrits comme étant la cible occasionnelle de ce processus d'inactivation génique dans les CCR MSI. Depuis la description initiale du phénotype CIMP, son rôle dans la carcinogenèse a été controversé [22]. Cependant, un certain degré de méthylation des promoteurs peut être observé dans les tissus normaux, voire dans tous les CCR, ce qui sous-tend que le phénotype CIMP ne constituerait

pas un pathway « pathogénique » unique. L'étude systématique de la région promotrice de plusieurs gènes permet de distinguer plusieurs phénotypes de méthylation : CIMP-high, lorsque plusieurs séquences sont méthylées ; CIMP-low, en cas de méthylation d'un faible nombre de séquences, et CIMP-neg, en l'absence de méthylation de séquences testées. Bien que le phénotype CIMP-high semble posséder une existence propre sur le plan biologique, l'existence d'un phénotype CIMP-low demeure controversée. Des travaux récents suggèrent l'existence d'une différence, sur le plan moléculaire, entre des CCR de phénotype CIMP-low d'une part, et des CCR de phénotype CIMP-high ou CIMP-0 d'autre part. Presque tous les CCR MSI sporadiques sont CIMP+, en raison de la méthylation du promoteur de *MLH1*. Cependant,

ce mécanisme jouerait également un rôle important dans le processus de transformation cellulaire non-MSI (ou MSS). Quelle que soit la réalité biologique de ce type tumoral, l'inhibition de l'expression d'un certain nombre de gènes par la méthylation de leurs promoteurs joue un rôle important dans l'induction et la progression tumorales. Outre *MLH1*, il faut citer le gène *MGMT* (O6-méthylguanine-DNA méthyltransferase). Au plan morphologique, l'hyperméthylation des îlots CpG de l'ADN est impliquée dans une voie alterne de la cancérogenèse colique, qui est la voie dite « festonnée ». Les adénomes sessiles festonnés semblent être les précurseurs de CCR de phénotype MSI, présentant des mutations de *BRAF*. Ces CCR, plus volontiers situés dans

le côlon droit, sont liés à un défaut d'expression de la protéine hMLH1, secondaire à une hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1*. D'autres lésions festonnées (polypes hyperplasiques et adénomes festonnés « traditionnels ») seraient associées à un phénotype

MSI-Low. Cette voie festonnée impliquerait l'inactivation d'autres gènes de réparation de l'ADN, en particulier la MGMT, là aussi par hyperméthylation de sa région promotrice.

Il existe une accumulation de mutations secondaires au niveau de ces séquences répétées dont les conséquences peuvent être délétères, si ces dernières se situent au niveau de régions codantes de l'ADN. De nombreux gènes impliqués dans des voies de contrôle du cycle cellulaire, de l'apoptose et de la réparation de l'ADN sont ainsi inactivés par la survenue de mutations dans des régions codantes répétées. En particulier, des mutations ont été décrites pour le gène du récepteur de type II du TGF β , les gènes pro-apoptiques *BAX* ou *CASP5*, les facteurs de transcription *TCF4* ou *E2F4* (A. LIÈVRE, P. LAURENT-PUIG., 2004 ; Duval A. et al. 2002) (tableau 2). Ces tumeurs de phénotype MSI+ ont un contenu normal en ADN (diploïdes) et sont peu associées à des mutations des gènes *TP53* et *APC*, contrairement aux cancers colorectaux avec instabilité chromosomique (Lièvre.A., Laurent-puig.P., 2004 ; Olschwang S. et al. 1997).

La détermination du statut MSI par biologie moléculaire reste la méthode de référence selon les recommandations du National Cancer Institute. Elles recommandent l'analyse d'un panel de 5 marqueurs microsatellites, incluant 2 marqueurs mononucléotidiques (BAT25 et BAT26) et 3 marqueurs dinucléotidiques (D2S123, D5S346 et D17S250) (Boland CR. et al.). La tumeur est considérée comme instable (MSI-H ou MSI+) si au moins deux de ces marqueurs sont altérés.

TABLEAU 2 — Anomalies génétiques des cancers colorectaux en fonction du phénotype LOH+ et MSI+.

Tumeur MSI +	Tumeur LOH+
Diploïde	Hyperploïde
Peu ou pas de pertes alléliques	Pertes alléliques sur 17p, 5q, 18q, 8p 22q
Mutations rares des gènes APC, TP53	Mutations fréquentes des gènes TP53, APC
Mutations fréquentes de l'oncogène BRAF	Mutations fréquentes de l'oncogène KRAS2
Altérations des gènes de la réparation des mésappariements de l'ADN (hMSH2, hMLH1, hMSH6, hMLH3 et hMSH3)	
Mutations des gènes TGFRII, BAX, TCF4, β -caténine,	
Instabilité génétique	Instabilité chromosomique

II.3.3 Formes du cancer colorectal

III.3.3.1 Formes héréditaires

a. Polypose adénomateuse familiale (PAF)

La PAF est responsable de 1 % des cancers colorectaux. De transmission autosomique dominante, la PAF est due à une mutation constitutionnelle du gène APC. Ainsi, chez un patient ayant une PAF, chaque cellule colique a déjà, de façon innée, inactivé une copie de ce gène suppresseur de tumeur. L'inactivation des deux copies, étape clef de la cancérogenèse colique, est donc beaucoup plus rapide. Dans ce cas, le risque de cancer colorectal est proche de 100 %, survenant à un âge beaucoup plus jeune que pour les patients ayant une tumeur sporadique.

Par ailleurs, dans la PAF, la position de la mutation sur le gène APC est corrélée au phénotype de la maladie. Ainsi le nombre de polypes (polypose classique ou atténuée), la présence de tumeurs desmoïdes, d'hyperpigmentation rétinienne, dépendent de la nature de la mutation (*Olschwang S. et al., 1997 ; Ferron . M., et al., 2005*).

b. Cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC)

Le syndrome HNPCC (anciennement appelé syndrome de Lynch) est responsable de 3 à 5% des cancers colorectaux (*Frebourg T., et al., 2003*). De transmission autosomique dominante, il est dû à une mutation constitutionnelle d'un des gènes du MMR, essentiellement MLH1 et MSH2. Les tumeurs du syndrome HNPCC présentent une instabilité des microsatellites (phénotype MSI).

Le spectre tumoral du syndrome HNPCC est large, mais les risques tumoraux majeurs sont le CCR (risque cumulé de 80% à 80 ans) et le cancer de l'endomètre (42 à 60% à 70 ans) (*Ferron . M., et al., 2005 ; Dunlop MG. Et al., 1997*).

B. Cancer colorectal sporadique

Le CCR est sporadique dans 95 % des cas. La tumorigenèse colique suit un processus

multiétapes. La séquence adénome–cancer a été décrite en 1990 par Fearon et Vogelstein (*Fearon ER., et al.,1990*), comme un processus linéaire. En fait, plusieurs voies de cancérogenèse peuvent mener à ces étapes successives (Fig. 8), comme l’instabilité chromosomique (cancer LOH), l’instabilité des microsatellites (MSI) ou le phénotype méthylateur (CIMP) (*Calvert PM., et al., 2002 ; Neiberghs HL., et al.2002*) Chaque voie aboutit au même résultat (un cancer), en altérant un panel de gènes différents, spécifiques de la voie, mais dont les protéines interagissent entre elles.

Ainsi, les cancers LOH sont plus fréquemment retrouvés au niveau du colon gauche. En revanche, les cancers MSI sont plutôt localisés sur le colon droit et présentent un type histologique particulier (moins différencié, mucineux, avec infiltrat lymphocytaire) (*Shia J. et al., 2003*)

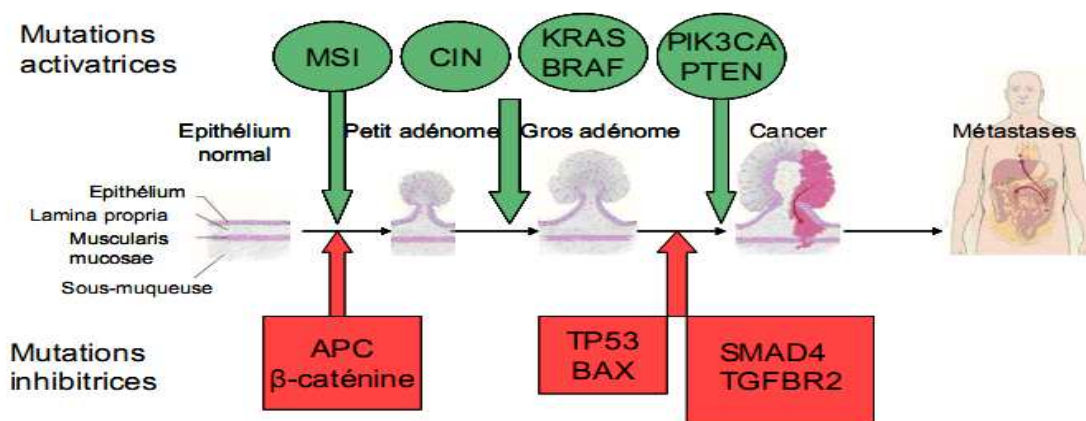


Fig.8 : Mutations conduisant à l’apparition d’un adénocarcinome colorectal. (*Markowitz, S.D., 2009*)

APC : Adenomatous Polyposis Coli,

TP53 : Tumor Protein 53,

BAX : Bcl-2-Associated X protein,

SMAD4 : Mothers Against Decapentaplegic homolog 4,

TGFBR2 : Transforming Growth Factor β Receptor type 2,

MSI : MicroSatelliteInstability,

CIN : instabilité chromosomique,

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog,

BRAF : B-Raf proto-oncogene serine/threonine-protein kinase,

PIK3CA :Phosphatidyl-Inositol 3-Kinase Catalytic α,

PTEN : Phosphatase and TENSinhomolog

- **Chronologie des événements génétiques au cours de la carcinogenèse colorectale**

Le cancer colorectal apparaît comme un modèle de choix pour l'étude de la chronologie des événements moléculaires qui lui ont donné naissance. En effet, le chercheur dispose assez facilement du matériel lui permettant d'étudier les différentes étapes de la transformation maligne d'une cellule épithéliale colique, à travers l'étude des lésions pré-cancéreuses (foyers de cryptes aberrantes puis adénomes) et des cancers de différents stades (localisés et métastatiques).

Les étapes précoces de la transformation maligne des cellules ont été particulièrement bien étudiées dans les cancers LOH+. Les mutations des gènes KRAS et APC sont présentes dès les étapes initiales de la carcinogenèse (fig. 8). En effet, les mutations de l'oncogène KRAS sont présentes dès la formation des foyers de cryptes aberrantes, les mutations du gène suppresseur APC dès l'apparition de la dysplasie dans ces foyers des cryptes aberrantes. Concernant les lésions précoces des cancers MSI+, les données sont plus fragmentaires. Un certain nombre d'adénomes se développent chez des sujets ayant un syndrome HNPCC ont un phénotype MSI+. Parmi les mutations des gènes cibles, la mutation du récepteur de type II du TGFβ semble être la plus précoce. (A. LIÈVRE, P.LAURENT-PUIG., 2004).

Plus tardivement, lors de la transformation des adénomes, apparaissent les pertes alléliques des chromosomes 17p et 18q qui s'accompagnent des mutations des gènes suppresseurs de tumeur TP53, SMAD2 et SMAD4. (LIÈVRE A., LAURENT-PUIG. P., 2004).

Concernant les cancers MSI+, la chronologie des altérations est moins bien connue (LIÈVRE . A., P.LAURENT-PUIG., 2004).

III- Implication des gènes KRAS et BRAF dans le cancer colorectal

On parle d'une carcinogenèse en étapes successives, suite à l'accumulation de plus en plus d'anomalies du génome touchant entre autres, les gènes régulateurs de la croissance cellulaire, tels que le p53 du gène KRAS (Jen J., et al., 1994).

Le gène KRAS subit une mutation activatrice dès les premières étapes de cancérogenèse,

puisqu'elle est observée avec la même fréquence dans le cancer et les adénomes de plus de 1 cm. Les mutations du gène *K-ras* (Minamoto T.,1995) ont également été rapportées dans la muqueuse colique normale mais il a été suggéré que la dysplasie ne pouvait apparaître que si la mutation du gène *K-ras* soit associée à d'autres mutations comme celles du gène *APC* (Minamoto T.,1995).

III-1 Mutation du gène KRAS et lésions précancéreuses du carcinome colorectal

- **Foyer de crypte aberrante**

Des lésions microscopiques de la muqueuse colique normale ont été observées sur un modèle murin de carcinogenèse et appelées foyers de cryptes aberrantes (*aberrant cryptoci*). Ces lésions ont été également identifiées comme des lésions précurseurs du cancer colorectal de la muqueuse colique humaine. Les foyers de cryptes aberrantes peuvent être le siège de dysplasies qui sont considérées comme des lésions préneoplasiques ou être simplement hyperplasiques et ne pas posséder de potentiel malin. Dans ce cas aucune altération génétique n'est décrite. La plupart de ces lésions sont observées dans le côlon distal (côlon descendant, sigmoïde et rectum). Dans les foyers de cryptes aberrantes, le gène *KRAS* est très fréquemment muté alors qu'il n'y a qu'un faible taux de mutation du gène *APC* (environ 5 %). Dans une étude sur un petit nombre de patients, une instabilité des microsatellites dans les foyers de cryptes aberrantes est décrite dans 10 % des cas, proche de la fréquence observée dans les cancers du côlon sporadiques. Globalement, des altérations génomiques sont retrouvées dans un quart des foyers de cryptes aberrantes (Françoise .P., et al.,2002).

Les foyers de cryptes aberrantes sont fréquents chez les patients atteints de PAF et présentent chez ces patients peu de mutation *KRAS* mais 100 % de mutation *APC* (Françoise .P., et al.,2002).

- **Adénome**

L'adénome est considéré comme une lésion préneoplasique, mais seulement 5 % des polypes évoluent vers le carcinome colorectal. L'apoptose est le principal mécanisme permettant aux polypes de régresser ; l'indice d'apoptose est plus élevé dans les adénomes que dans les carcinomes colorectaux.

La fréquence des mutations du gène *KRAS* dans les adénomes colorectaux varie dans la littérature de 29 à 70 %. Ces différences dans le taux des mutations du gène *KRAS* peuvent refléter des variations géographiques et alimentaires à l'exposition aux agents carcinogènes des populations étudiées ou des méthodes d'étude différentes (*Françoise .P., et al.,2002*)

L'implication précoce dans la carcinogenèse colorectale du gène *KRAS* montre que celui-ci joue un rôle clé dans le développement de cette tumeur.

III-2 La voie de signalisation RAS / RAF /MAPK

La protéine Kras et une protéine de la famille RAS, associée à la face interne de la membrane plasmique à laquelle elle est attachée grâce à un résidu farnésyle.

C'est une composante essentielle de la cascade de transduction du signal en aval du récepteur membranaire EGFR. C'est aussi une des protéines intermédiaires entre les récepteurs et les facteurs de transcription de l'ADN. Elle fait ainsi partie de la voie des MAP kinases.

La voie RAS / RAF /MAPK est une voie qui permet de transmettre des signaux de la membrane cellulaire jusqu'au noyau, afin d'induire différentes réponses cellulaires (figure.9).

La voie RAS /RAF/MAPK est une voie de signalisation intracellulaire qui intervient dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation, de la migration cellulaire et de l'angiogenèse (*Verloes.A., cavé .H., 2007*). Toutes ces étapes sont critiques pour permettre un développement normal. Cette voie transduit les signaux extracellulaires, véhiculés sous forme de facteurs de croissance, d'hormones ou de petites molécules, à l'environnement intracellulaire. Elle a été particulièrement étudiée dans le contexte de l'oncogenèse puisque sa dérégulation est une des premières causes de cancer.

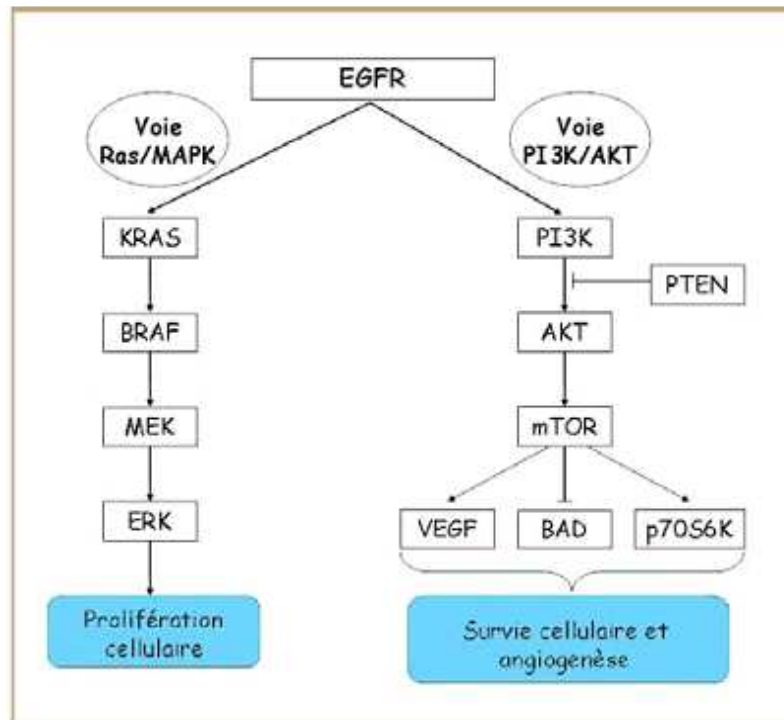


Figure 9: voies de signalisation simplifiée des MAP kinases et PI3K/AKT.

La première étape de signalisation est l'activation de récepteurs tyrosine kinase membranaires dont les principaux sont l'EGFR (epidermal growth factor) par des facteurs de croissance comme EGF et VEGF. Ces récepteurs sont exprimés à la surface cellulaire sous forme de monomère. Le ligand induit l'homo ou l'hétérodimérisation du récepteur, modifiant sa conformation, ce qui aboutissant à l'activation des domaines kinases de leur partie intracellulaire et par la suite à l'autophosphorylation de certains de leurs résidus tyrosine spécifiques (fig.12). Ces résidus phosphorylés servent ensuite de point d'ancrage à des protéines intracellulaires à domaine SH2 qui jouent un rôle central dans la transduction de voies de signalisation. Après l'activation du récepteur, des médiateurs intracellulaires vont être recrutés, dont GRB2, SOS1, et SHP2. Ces protéines, normalement présentes dans le cytoplasme, sont redirigées vers la membrane où elles relayent le signal extracellulaire à l'intérieur de la cellule. La première étape est le recrutement du complexe GRB2/SOS1 et l'activation d'une protéine de la famille RAS qu'est Kras. Les protéines dont on connaît plusieurs variétés, sont des protéines sous-membranaires à activité GTPase. La forme active des protéines RAS est liée au GTP. Elle est inactivée par l'hydrolyse du

GTP en GDP, et réactivée par l'échange du GDP contre un GTP. Les GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors), catalysent le relargage de GDP alors que les GAP (GTPase Activating Proteins) catalysent l'hydrolyse du GTP (Verloes.A., cavé .H., 2007). (Figure. 10) .

SOS1 est une protéine GEF (guanine nucleotide exchange factor). Elle présente une activité d'échange capable de remplacer le GDP de RAS par du GTP, et donc d'activer RAS.

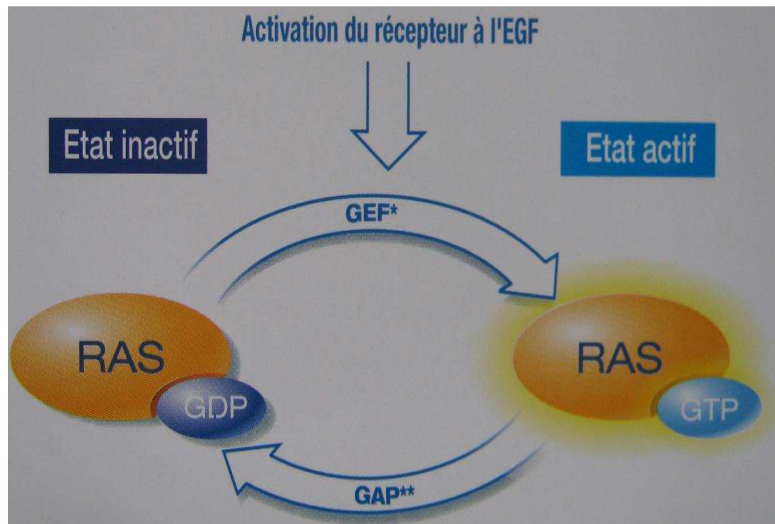


Figure.10 : Inactivation et réactivation de la protéine RAS

Une fois activée, RAS active plusieurs voies de signalisation dont celles des miteogen activated protein kinases (MAPK).

RAS recrute la membrane des protéines de la famille RAF dont BRAF. L'association de RAS avec BRAF, déclenche l'activation de ce dernier. BRAF est une MAP kinase kinase kinase (MAPKKK) elle active les MAP kinase kinases (MAPKK) MEK1 et MEK2. Les protéines MEK, à leur tour, activent les MAP kinases ERK1 et ERK2 (fig.11). Une fois phosphorylé, ERK migre dans le noyau et permet l'activation de certains facteurs de transcription et l'expression de plusieurs gènes (fig.12). La voie de MAPK joue un rôle essentiel dans la prolifération cellulaire, la différenciation, la motilité et l'apoptose.

(Verloes.A., cavé .H., 2007).

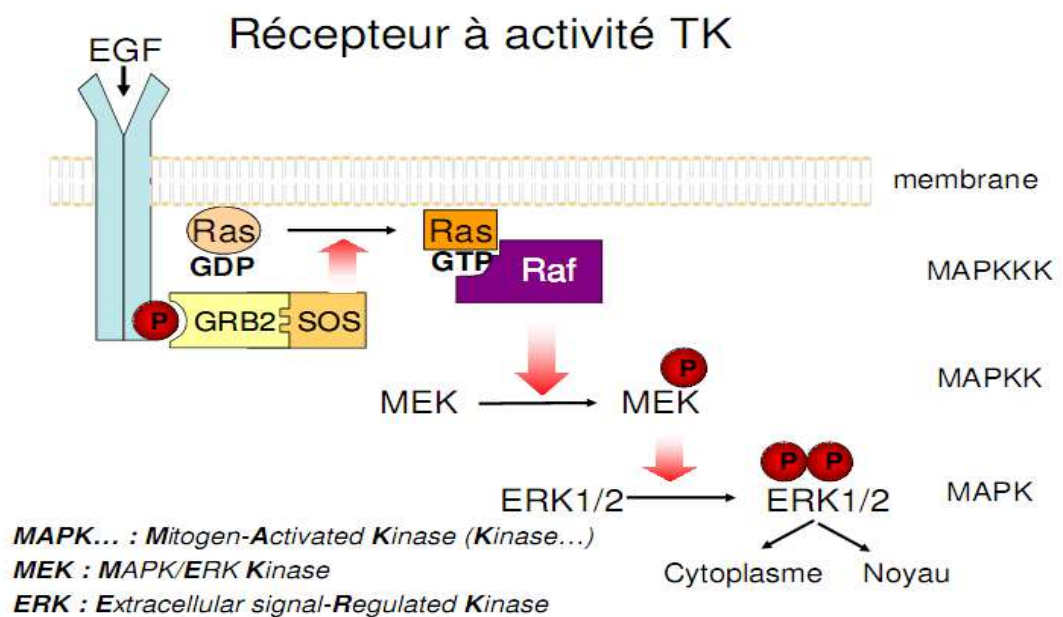


Figure. 11 : Cascade miteogenactivatedprotein kinases (MAPK).

La cascade des MAPK est bien plus complexe que la description succincte ci-dessus ne laisse supposer. De nombreuses boucles de rétrocontrôle en assurent la stabilité. Les interactions entre les protéines principales sont rendues possibles par leurs interactions avec de multiples protéines accessoires, dont les mutations sont toutes potentiellement susceptibles d'interférer avec le fonctionnement normal de la cascade.

Cette voie de signalisation RAS /MAPK est anormalement activée dans de nombreux cancer en particulier le cancer colorectal.

L'autre grande voie de signalisation intracellulaire pouvant être activée par l'EGFR est la voie PI3K/AKT. Cette voie peut être activée, soit directement par activation de l'EGFR, soit par l'intermédiaire de la protéine KRAS. Cette voie est normalement contrebalancée par la fonction pro-apoptotique de PTEN.

Il existe un lien étroit entre la voie de signalisation RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, par l'intermédiaire de RAS qui jouerait possiblement un rôle central dans les voies d'activation de l'EGFR. La présence de mutations du proto-oncogène *KRAS* est retrouvée dans 37% des CCR, associé à une augmentation de risque de récurrence et de décès dans le cancer colorectal entraînant l'activation de la voie MAPK (Mor A., et al., 2006).

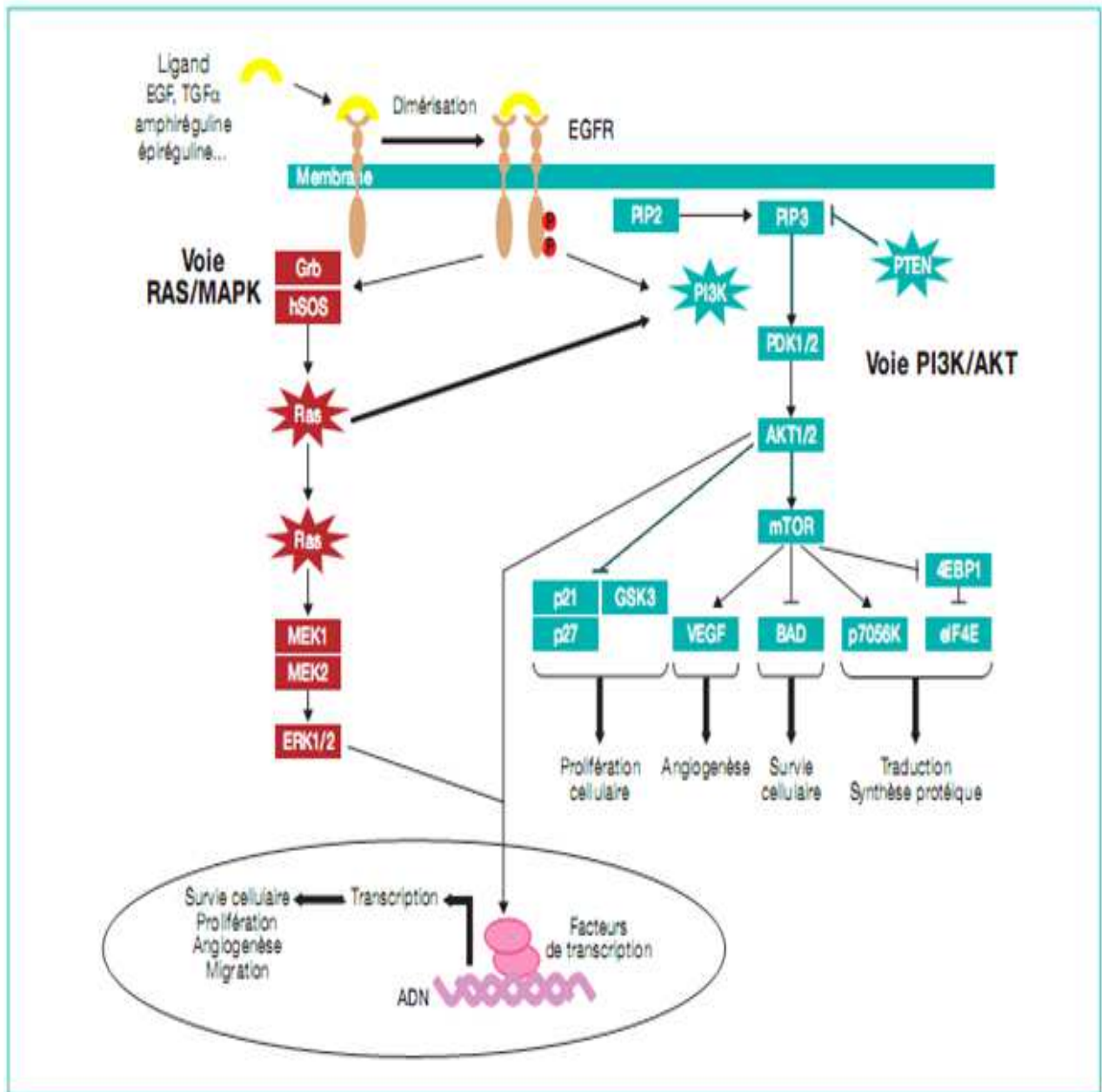


Figure 12. Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaires RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT en aval.

III-3 Le récepteur épidermique du facteur de croissance EGFR

L'EGF est un facteur de croissance épidermique ayant une action principalement trophique sur de nombreux tissus, notamment en activant la prolifération cellulaire.

III-3- 1. Structure de l'EGFR

Les récepteurs EGFR (Epidermal Growth Factor Récepteur) sont des molécules transmembranaires permettant à partir de signaux extracellulaires, la transmission d'informations, dont la transduction intracellulaire, provoque un ensemble de processus métaboliques comme la croissance cellulaire, la différenciation, la survie, la progression du cycle, l'angiogenèse et la réponse aux médicaments. Les EGFR (appelés aussi erbB1 ou HER1) sont des membres de la famille erbB de récepteurs tyrosine kinase comprenant entre autres, erbB2 (HER2/neu), erbB3 (HER3) et erbB4 (HER4). (Yarden Y. et al., 2001)

L'EGFR est une glycoprotéine de 170 kDa présente à la surface des cellules et codée par le proto-oncogène c-erbB1 situé sur le chromosome 7q22.

Comme de nombreux récepteurs transmembranaires, les EGFR sont composés d'un domaine de fixation extracellulaire, d'un domaine lipophile transmembranaire et d'une région intracellulaire à activité tyrosine kinase (figure 13).

Plusieurs ligands peuvent se fixer sur ce récepteur comme l'epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor alpha (TGF-alpha), l'amphiréguline, la betaceluline, l'épiréguline, NRG2-alpha (neuregulin 2) et l'heparinbinding EGF. La fixation d'un de ces ligands sur le récepteur provoque sa dimérisation (soit sous forme d'homodimères (EGFR-EGFR), soit sous formes d'hétérodimères (avec d'autres récepteurs de la même famille). Cette modification moléculaire provoque l'activation de sa tyrosine kinase et son autophosphorylation, et puis, l'activation d'un ensemble de signaux moléculaires intracellulaires. Plusieurs voies de transduction du signal sont activées, notamment la voie mitogen-activated protein kinase (MAPK), et la voie PI3K/Akt (Fig. 10). Ces voies de transduction induisent l'expression de gènes dans le noyau de la cellule et une réponse cellulaire. Après fixation du ligand et transmission du signal de transduction, l'EGFR est internalisé dans la cellule, inactivé et dégradé ou recyclé à la surface de la membrane cellulaire.

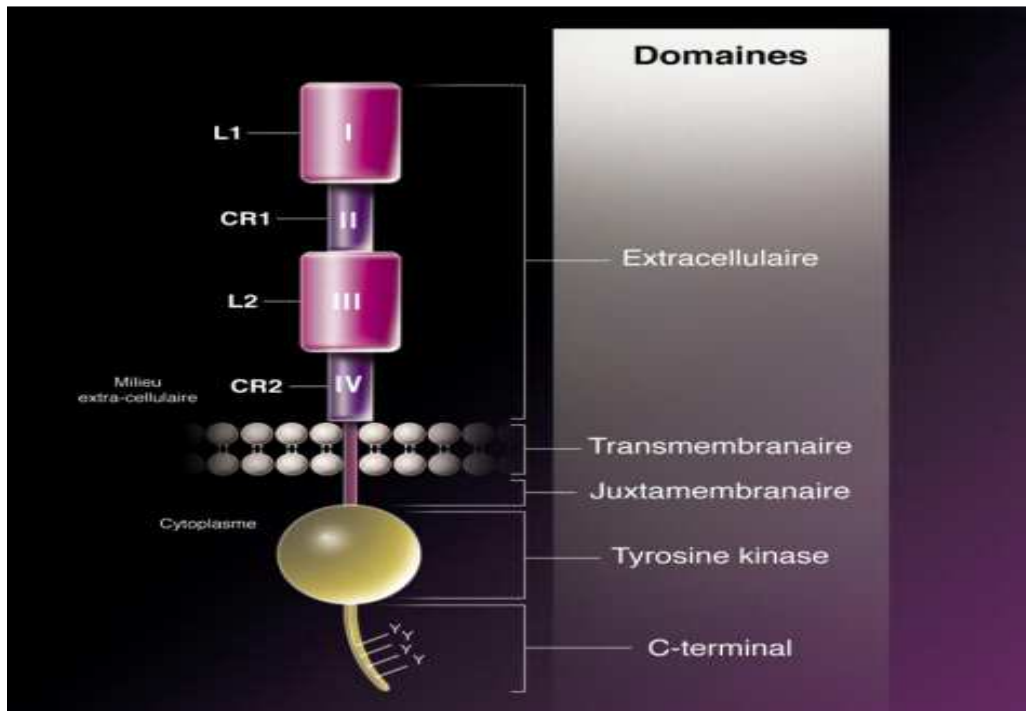


Figure 13 : Structure du récepteur à l'EGF

III.3.2 Expression d'EGFR et tumeur

Sur modèles animaux, l'utilisation de promoteurs du cancer colorectal (tel le désoxycholate ou l'azoxyméthane) entraîne une augmentation de l'autophosphorylation de REGF et de son activité tyrosine kinase (2), conduisant à penser que l'EGFR serait impliqué à un stade précoce de la cancérogenèse colique. Le croisement de souris APCmin (modèle murin de la polypose adénomateuse familiale) avec des souris déficientes en EGFR entraîne une diminution nette du nombre de polypes intestinaux chez les animaux adultes, tandis que les jeunes présentent le même nombre de microadénome (*Spano .J-P., vignot. S., 2007*). Le blocage pharmacologique de l'activité de l'EGFR, également sur modèle animal, diminue aussi la formation des polypes adénomateux. Ces données pourraient conduire à l'utilisation des traitements anti-EGFR dans le cadre de stratégie de chimio-prévention.

L'étude de tumeurs colique humaines montre que les niveaux de base d'expression de l'EGFR (HER1) et EebB3 (HER3), sont supérieurs dans le tissu tumoral par rapport à ceux observés dans l'environnement péritumoral (muqueuse intestinale normale).

L'expression des substrats EGF et TGF α est également augmentée au sein de la tumeur (Spano J-P., vignot. S., 2007).

III.3.3 EGFR et mutations

Selon les études, le gène codant pour l'EGFR peut être dans certaines tumeurs. Cette amplification peut être soit la conséquence d'une augmentation du nombre de copies du gène, soit par polysomie du chromosome 7 (Heinemann V., et al., 2008). Certains auteurs ont montré une relation entre l'amplification du gène EGFR et la réponse thérapeutique. Les études sont néanmoins discordantes avec cependant une tendance à une meilleure efficacité des anticorps anti-EGFR en cas d'amplification ou de polysomie. Des études ont recherché des mutations dans le gène EGFR et en ont rarement trouvées (Barber TD., et al., 2004). Celles-ci semblent jouer un rôle négligeable et sans conséquence clinique ou thérapeutique dans le cadre de l'utilisation d'un anti-EGFR ; (Barber TD., et al., 2004 ; Tsuchihashi Z., et al., 2005)

III.3.4 Les anticorps anti-EGFR : une thérapeutique ciblée

Malgré les avancées thérapeutiques majeures dans le traitement du cancer colorectal, il n'existe le plus souvent pas de guérison à ce jour, Les patients décédant le plus souvent suite à des complications liées aux métastases. Un certain nombre d'agents cytotoxiques sont habituellement utilisés dans le traitement des cancers du côlon agissant sur l'ADN ou l'ARN, directement ou indirectement, de façon relativement non sélective et inhibant la prolifération des cellules tumorales malignes, mais aussi, celle des tissus normaux à renouvellement rapide. (Tournigand.C., Bengrine-Lefevre.L., 2009)

Le 5-fluoro-uracil inhibiteur de la thymidilate synthase associé à l'acide folinique, était le seul traitement du cancer du côlon jusqu'en 1996. La découverte de molécules inhibitrices de la réplication (oxaliplatine, capecitabine, l'irinotecan) ont par la suite rendu possible plusieurs combinaisons thérapeutiques par association de ces différentes molécules (Mayer RJ., et al., 2009). Ces combinaisons ont eu pour effet d'améliorer significativement la survie des patients. En effet, la survie moyenne des patients avec métastases était de dix à 20 mois avec le 5-FU seul et s'est prolongée au-delà de 20 mois avec les différentes associations.

En effet, une meilleure compréhension des phénomènes responsables de la carcinogénèse a

permis d'identifier des molécules jouant un rôle important dans la progression de la maladie. Ces molécules constituent des cibles pour de nouvelles thérapeutiques qui agissent de façon spécifique et visant à inhiber leur action. (Hurwitz, H., Kabbinavar, F., 2005)

Il a fallu attendre le milieu des années 1990 pour que de nouveaux médicaments correspondant à une nouvelle gamme de thérapie ciblée aboutissent à une véritable révolution pharmaceutique. La cible de ces nouvelles thérapies est soit la tumeur (EGFR, mTor, HER2, etc.), soit son environnement, (stroma ou l'angiogénèse tumorale).

Ces nouvelles approches thérapeutiques se développent de façon exponentielle en oncologie. Les pathologies tumorales digestives semblent avoir profité largement de ces avancées. En effet, les adénocarcinomes, tumeurs d'origine épithéliale, sont spécialement dépendants de la stimulation de la croissance par l'EGF. Il est donc logique de tenter de bloquer cette voie et notamment en inhibant la liaison de l'EGF circulant sur ses récepteurs membranaires (EGFR). De même, ces tumeurs étant très vascularisées, leur croissance est très dépendante de la néo-angiogénèse tumoro-induite, notamment par hyperexpression du vascular endothelial growth factor (VEGF) (Dreyer, C., Raymond, E., Faivre, S., 2009)

Le principe de la thérapie ciblée consiste à utiliser des inhibiteurs pharmacologiques pour moduler la signalisation présente au niveau des cellules tumorales. De nombreux composés développés initialement ont été mis en échec pour des raisons de mauvaise affinité à la cible ou des propriétés pharmacologiques inadéquates, rendant l'exposition au médicament insuffisante. En revanche, depuis cinq à dix ans, plusieurs molécules puissantes sont parvenues à émerger et se positionner dans l'arsenal thérapeutique jusqu'à la commercialisation en apportant un bénéfice thérapeutique aux patients. (Dreyer, C., Raymond, E., Faivre, S., 2009)

Dans le CCR, deux approches ont été particulièrement développées : le blocage de la voie du VEGF et le blocage de la voie de l'EGFR.

La première possibilité est donc d'agir sur l'angiogénèse tumorale via la voie du VEGF. Ainsi, le bevacizumab, anticorps monoclonal anti-VEGF possédant une activité anti-angiogénique, est largement utilisé dans le traitement du CCR (Hurwitz, H., et al., 2005)

La seconde possibilité est d'agir sur la voie de l'EGFR (Fig.12). Plus de 65 % des cancers

colorectaux surexpriment l'EGFR (*Radinsk R., et al., 1995*). Cette surexpression semble constituer un facteur de mauvais pronostic sur la survie globale des patients (*Mayer, A., et al., 1993 ; Ljuslinder, I., et al., 2010*). La voie de l'EGFR constitue donc une cible de choix dans la lutte contre le CCR. (*Mendelsohn, J., et al., 2000*)

Il existe deux approches pour bloquer la voie de l'EGFR. la première approche consiste en l'utilisation à l'aide des anticorps monoclonaux anti-EGFR tels que le cetuximab ou le panitumumab, la deuxième approche fait appel aux des inhibiteurs de la tyrosine kinase de l'EGFR, petites molécules agissant au niveau intracellulaire en bloquant de façon compétitive la liaison de l'ATP à l'EGFR, empêchant ainsi l'activité kinase du récepteur (*Amador, M.L. and M. Hidalgo ., 2004 ; J. Lamoril., et al., 2009*) (Figure.16)

En ce qui concerne les anticorps monoclonaux anti-EGFR, le premier ayant été utilisé est le cetuximab (Erbix®). Il s'agit d'un anticorps monoclonal chimérique (Fc humain, Fab murin) de type IgG1 dirigé contre le récepteur à l'EGF, qui possède une affinité pour l'EGFR cinq à dix fois plus importante que ses ligands endogènes. Après sa liaison à l'EGFR, il empêche la fixation de ses ligands, aboutissant à l'inhibition de la transduction du signal des voies PI3K/Akt et RAS-RAF/MAPK et par conséquent, l'ensemble des mécanismes d'apoptose, de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et de dissémination des métastases. Cet anticorps a probablement aussi une action cytotoxique anticorps dépendant (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC)) du fait de sa nature IgG1. Par ailleurs, il entraîne une internalisation de l'EGFR qui pourrait aboutir à une diminution d'expression de ce récepteur et recrute des cellules immunes effectrices cytotoxiques contre les cellules tumorales surexprimant l'EGFR. La disponibilité du récepteur est alors diminuée (*Lamoril. J., et al., 2009*).

Cetuximab (Erbix®) s'utilise en association avec une chimiothérapie. L'étude Bond (*Cunningham, 2004*) a montré une efficacité plus importante de l'association de cetuximab avec irinotécan par rapport au cetuximab seul (22,5% contre 10,8%). La survie sans progression de la maladie prolongée. (*Lamoril. J., et al., 2009*)

Le panitumumab (Vectibix®), récemment introduit est un autre anticorps monoclonal recombinant anti-EGFR de type IgG2 entièrement humanisé. Il possède une grande affinité pour l'EGFR et son mode d'action est le même que celui du cetuximab mais dénué d'activité ADCC

(seules, les IgG1 ont une activité ADCC). Il est indiqué en monothérapie pour le traitement des patients avec un cancer colorectal métastatique, après échec des protocoles de chimiothérapie à base de fluoropyrimidine (5-FU), oxaliplatine et irinotécan (*Lamoril. J, et al., 2009*).

Les molécules inhibitrices de tyrosine kinase (erlotinib, gefitinib) ne sont pas encore utilisées dans le traitement du CCR.

D'autres anticorps anti-EGFR sont en cours d'élaboration tels que le matuzumab, le zalutumumab et le nimotuzumab.

Tableau 3 : molécules ciblant l'EGFR

Anticorps anti-EGFR [64]	Nature	ADCC
Cetuximab (Erbítux [®])	IgG1 - chimérique (30 % murin)	Oui
Matuzumab	IgG1 - humanisé (10 % murin)	Oui
Nimotuzumab	IgG1 - humanisé (10 % murin)	Oui
Zalutumumab	IgG1 - 100 % humain	Oui
Panitumumab (Vectibix [®])	IgG2 - 100 % humain	Non
Molécules inhibitrices de l'EGFR		
Erlotinib (Terceva [®])	Inhibiteur de tyrosine kinase ^a	
Gefitinib (Iressa [®])	Inhibiteur de tyrosine kinase ^a	
Lapatinib (Tyverb [®])	Inhibiteur de tyrosine kinase ^{a,b}	
ADCC : <i>antibody dependent cell cytotoxicity</i> (cytotoxicité dépendante des anticorps).		
^a Non utilisé dans le cancer du côlon.		
^b Inhibe aussi HER2 (ou ERBB2, <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>).		

Ces traitements onéreux donnent lieu à une toxicité spécifique qu'il ne faut pas négliger, avec des effets secondaires tels que les folliculites, les affections respiratoires mais qui sont globalement mieux tolérés que les chimiothérapies.

III.3.4 Les résultats des anti-EGFR

De nombreuses études ont évalué l'intérêt de ces molécules dans le traitement des cancers colorectaux (Rivera.F., et al., 2008). Ces molécules ont amélioré l'efficacité de la chimiothérapie conventionnelle aboutissant à une réponse partielle ou une stabilisation de la maladie chez certains patients. Ils prolongent modestement la survie globale des patients et le taux de réponse anti-tumorale tout en améliorant la qualité de vie des patients (Vincenzi B., et al. 2008). Ces résultats sont néanmoins modérés. En effet, 15 % des patients traités répondent au traitement par le cetuximab, la survie moyenne étant alors de 9,5 mois contre 4,8 mois chez les patients ayant un traitement palliatif sans cetuximab (Karapetis CS., et al.,2008). Cette prolongation, même modeste, est cependant un pas important en cancérologie. Néanmoins, de nombreuses études ont montré que certains patients ne répondaient pas au traitement anti-EGFR (Lamoril. J, et al., 2009).

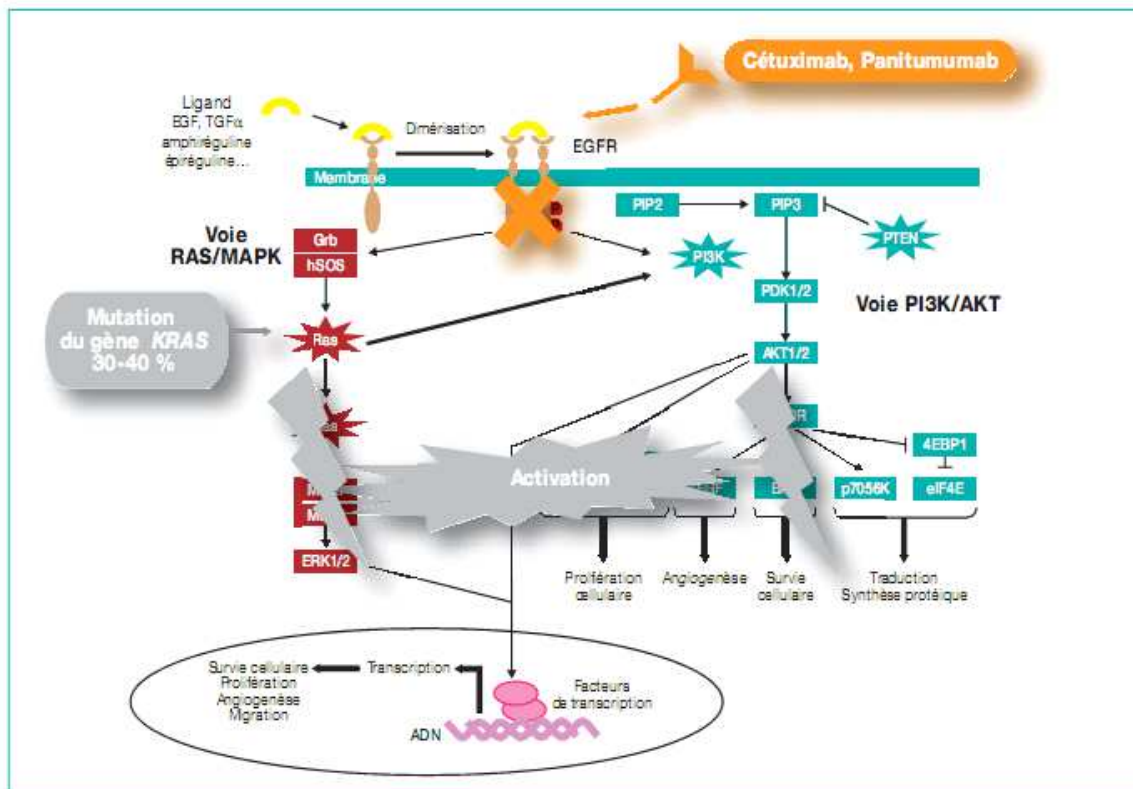


Figure14 : Mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR (figuré en orange) :

- EGFR : récepteur de l'épidermal growth factor ; PI3K : phosphatidyl inositol 3-kinase ;
- VEGF : vascular endothelial growth factor ; MAPK : mitogen activated protein kinase

Cette figure montre la fixation de l'anticorps (cétuximab ou panitumumab) à la partie extramembranaire de l'EGFR, empêchant ainsi sa dimérisation et son activation, ainsi que l'activation des voies de signalisation RAS/MAPK en aval. Elle montre également le mécanisme d'action des mutations du gène KRAS (figuré en bleu), responsables en aval de l'EGFR, d'une activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT totalement indépendante de la fixation du ligand au récepteur. Ces mutations empêchent les anticorps anti-EGFR d'exercer leur action et constituent un facteur de résistance à ces derniers.

III.4 Résistances aux anti-EGFR et facteurs prédictifs de réponse

De différentes études ont montré que l'utilisation des anticorps anti-EGFR apportait un bénéfice thérapeutique à certains patients, cependant une large proportion de patients ne répondant pas à ce traitement.

Le marquage immunohistochimique de 1 % des cellules tumorales par des anticorps spécifiques anti-REGF (quelle que soit son intensité) constitue un prérequis à l'utilisation du cétuximab dans le cadre de son autorisation de mise sur le marché (AMM), il a été montré depuis que le niveau d'expression du REGF en immunohistochimie n'était pas corrélé à la réponse à cette thérapie ciblée. Notamment, l'obtention d'un taux de réponse objective de 25 % dans une série de cancers colorectaux n'exprimant pas le REGF suggère que le niveau d'expression intra-tumorale du REGF n'est pas un bon facteur prédictif de la réponse au cétuximab dans le cancer colorectal. Cela pourrait être expliqué par des facteurs liés à la sensibilité des techniques utilisées, aux critères analysés (pourcentage de cellules marquées ou intensité du marquage ou les deux), au seuil de positivité choisi et à la qualité de l'analyse immunohistochimique, qui sont probablement à l'origine des discordances d'expression de l'EGFR au niveau de la tumeur. En outre, certaines études ont mis en évidence l'absence de corrélation entre le niveau d'expression du REGF observé au sein de la tumeur primitive colorectale et celui observé au sein des métastases. Une équipe italienne (*Federica Di Nicolantoni, et al., 2008*) a montré que le nombre de copies du gène du REGF, mesuré par hybridation fluorescente in situ (FISH) sur coupe en paraffine, était corrélé à la réponse au cétuximab. Dans cette étude, l'amplification du gène du REGF était associée à une

meilleure réponse tumorale ; elle constitue donc un facteur prédictif de réponse au cétuximab dans les cancers colorectaux potentiellement intéressants. Ces résultats vont dans le même sens que de récentes études rapportant une association significative entre la réponse aux inhibiteurs de tyrosine kinase du REGF et le nombre de copies du gène EGFR dans les cancers pulmonaires.

La meilleure connaissance de la cascade des effecteurs impliqués dans les voies de signalisation de l'EGF a permis d'émettre l'hypothèse selon laquelle la modulation d'activateurs ou d'inhibiteurs de la cascade de phosphorylation sous-jacente à l'interaction du ligand avec son récepteur était un des mécanismes possibles de la résistance au cétuximab. Une telle modulation pouvant être secondaire à une mutation d'un des effecteurs des voies de signalisation de l'EGF dont KRAS et BRAF.

L'identification des altérations génétiques somatiques a donc un intérêt en termes de classification nosologique des tumeurs, mais également en termes de prédiction de la réponse ou de la résistance aux nouvelles thérapies ciblées. Ce dernier volet apparaît primordial compte tenu du nombre croissant de combinaisons efficaces dans le traitement des cancers ; lequel nécessite le développement d'outils d'aide à la décision pour le clinicien, afin d'identifier les patients pouvant réellement bénéficier de ces thérapies ciblées et ainsi, de proposer à chacun des malades la stratégie thérapeutique la plus efficace et la moins toxique, tout en limitant, si possible, son coût (*Lievre.A ., J.P. spano., 2006*).

IV. Le gène KRAS : Facteur prédictif dans le traitement du cancer colorectal métastatique

IV.1 La famille Ras

La famille Ras est constituée d'oncogènes dont la première description historique remonte à 1916 avec la découverte du virus Rous sarcoma virus (RSV). C'est un rétrovirus découvert par Peyton Rous en injectant un extrait de tumeur de poulet chez des poulets sains, ce qui induisit un sarcome chez ces derniers. Il fallut attendre les années 1970 à 1980 pour démontrer que RSV contenait un matériel génétique capable d'induire la transformation cancéreuse sans induire de réplication virale. Le gène viral induisant le sarcome fut alors dénommé src (pour sarcoma) (*Lamoril .J, et al., 2009*).

Capable d'induire un cancer, le gène v-src (v pour viral) fut dénommé oncogène.

En 1976, il fut démontré qu'une séquence proche de src était présente dans le génome normal de poulet (appelé c-src [c pour cellular] par opposition à v-src pour la forme virale). Il fut établi que les oncogènes viraux étaient en fait dérivés d'oncogènes cellulaires par intégration, puis transformation de ces derniers dans le génome viral en oncogène. De nombreux travaux de cette période démontrèrent l'existence de gènes proches de ces oncogènes viraux dans différents espèces y compris chez l'être humain. Les gènes sont impliqués essentiellement dans les signaux de transduction cellulaire régulant la croissance normale des cellules. Lorsqu'ils sont mutés, ces gènes proches de ceux retrouvés chez les virus, et appelés proto-oncogènes, participent à la cancérogenèse de la cellule. Durant cette période, il fut démontré que des rétrovirus murins hybrides rat—souris, les rétrovirus de sarcome respectivement de Harvey et de Kirsten contribuaient à la cancérogenèse par l'intermédiaire d'un ensemble de gènes appelés ras (de l'anglais rat sarcoma virus) (*Karnoub AE., et al., 2008*).

Les homologues cellulaires de ces oncogènes viraux furent initialement mise en évidence chez le rat en 1981 et dans un deuxième temps chez la souris et l'être humain (*Karnoub AE., et al., 2008*).

Il fut alors démontré que ces oncogènes présentaient des propriétés similaires à l'oncogène src du virus SRV. Le virus dérivé du sarcome de Kirsten fut dénommé K-ras chez les mammifères (et celui de Harvey, H-ras) (*Karnoub AE., et al., 2008*).

La famille Ras constitue une famille de proto-oncogènes codant pour des G-protéines dont on distingue trois principaux membres Harvey-ras (HRAS), Kirsten-Ras (KRAS) et Neuroblastoma- Ras (NRAS)

K-Ras est uniquement retrouvée sous la membrane plasmique, cette localisation est indispensable à l'activité de Ras. Les modifications post-traductionnelles de Ras sont indispensables à sa localisation sous la face interne de la membrane plasmique. Les protéines Ras qui ne se trouvent pas localisées sous la membrane sont inactives, probablement parce qu'elles sont incapables de recruter leurs protéines cibles. Le fait que la protéine Ras nécessite d'être correctement localisée pour être active conduit de nombreuses études à viser les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de Ras comme cibles thérapeutiques (*Ali et*

al., 2010).

Le gène KRAS est localisé sur le chromosome 12 (12p12.1) et code pour une protéine de 21 kDa environ. Le gène est constitué de six exons et mesure 38 kb. Il code pour deux isoformes différents par leur partie C-terminale par épissage alternatif de l'exon 5.

IV.2. Le gène KRAS

Le gène KRAS est localisé sur le chromosome 12 (12p12.1) et code pour une protéine de 21 kD environ. Le gène est constitué de six exons et mesurant 38 kb. Il code pour deux isoformes différents par leur partie C-terminale par épissage alternatif de l'exon 5 (Lamoril. J, et al., 2009).

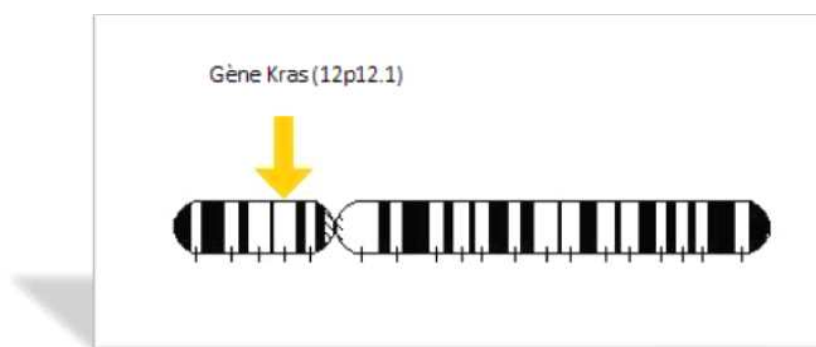


Figure 15 : Localisation chromosomique du gène KRAS sur le chromosome 12

L'exon 1 est non codant et les exons 2, 3 et 4 sont identiques dans les deux isoformes :

- l'isoforme **a** est composée de six exons, l'exon 6 contenant la partie 3' non codante de cet isoforme ;
- l'isoforme **b** est constitué de cinq exons codant (l'exon 5 n'étant pas codé par saut d'exon). L'exon 6 code pour la partie C-terminale de l'isoforme **b**.

Par ailleurs, ces deux isoformes subissent de profondes modifications post-traductionnelles dont les conséquences sont importantes pour la localisation de la protéine, ainsi que pour ses fonctions dans les différentes voies métaboliques. La protéine KRAS outre sa localisation à la membrane, peut ainsi être transportée sur différentes organelles intracellulaires telles que la membrane externe de la mitochondrie, par exemple (Lamoril. J, et al., 2009).

IV.3 Les mutations KRAS dans les cancers colorectaux

Le gène KRAS est l'un des proto-oncogènes les plus fréquemment activés dans de nombreux cancers. 35 à 40% des cancers colorectaux présentent une mutation activatrice de KRAS (*Fujimoto. K., 2001*). Il s'agit de mutations somatiques acquises et donc non héréditaires.

La grande majorité des mutations de KRAS affectent les codons 12 et 13 (70 % pour le codon 12 et 30 % pour le codon 13). Plus rarement les codons 61 et 63 peuvent également être mutés. Plus rarement encore, d'autres mutations sont retrouvées ailleurs sur le gène KRAS (par exemple, aux codons 59 et 145) (*Rouleau. E., 2008*). Ces mutations correspondent à la substitution d'une base par une autre, conduisant à la substitution d'un acide aminé de la protéine codée par un autre.

Les mutations sur le gène KRAS jouent un rôle fondamental dans l'activation de la protéine KRAS mutée et la progression du cancer colorectal. Ces deux codons codent pour une glycine située à proximité du site catalytique de la protéine provoquant en cas de mutation, une diminution de l'activité GTPase de la molécule qui reste alors dans la conformation active liée au GTP. Par cascade en chaîne, cette activation chronique de la protéine ras active les autres voies métaboliques (PI3K et MAP kinase) aboutissant à la transformation maligne. Cette activité étant constitutive, elle ne répondra pas au blocage d'EGFR (situé en amont de KRAS dans la cascade métabolique) par des anticorps spécifiques et la cellule sera résistante aux anticorps anti-EGFR (*Lamoril. J, et al., 2009*).

Selon la mutation causale, la diminution d'activité GTPasique et est proportionnellement variable à l'agressivité de la tumeur aussi.

A titre d'exemple, la mutation au codon 12 de la glycine en valine (p.G12 V) est associée à une plus grande agressivité de la tumeur (*Benvenuti. S., et al., 2007*)

Tableau 4 : Localisation des mutations KRAS

Fréquence des mutations <i>KRAS</i> chez les patients atteints de CCR ⁽⁴⁾			
Données extraites de l'étude RASCAL II et du catalogue des mutations somatiques oncogènes (COSMIC, Institut Sanger)			
Mutation <i>KRAS</i>	Acide aminé substitué	Nucléotide substitué	Incidence
Codon 12	Aspartate (G12D)	G35A	32,5 %
	Valine (G12V)	G35T	22,5 %
	Cystéine (G12C)	G34T	8,8 %
	Sérine (G12s)	G34A	7,6 %
	Alanine (G12A)	G35C	6,4 %
	Arginine (G12r)	G34C	0,9 %
Codon 13	Aspartate (G13D)	G38A	19,5 %
Autres codons			1,8 %

IV.4 Statut mutationnel *KRAS* et réponse au traitement anti-EGFR

Il a été montré dans plusieurs travaux que la présence d'une mutation *KRAS* était prédictive d'une absence de réponse au traitement par cetuximab ou panitumumab (*Jonker DJ, 2007 ; Van Cutsem E., Nowacki M., et al., 2007*). Ces études se basaient sur l'hypothèse que la présence de mutations *KRAS*, indépendamment du degré d'expression de l'EGFR, serait associée à une activation de la voie MAPK, rendant le cetuximab inefficace, car ce dernier agit en amont de la protéine RAS.

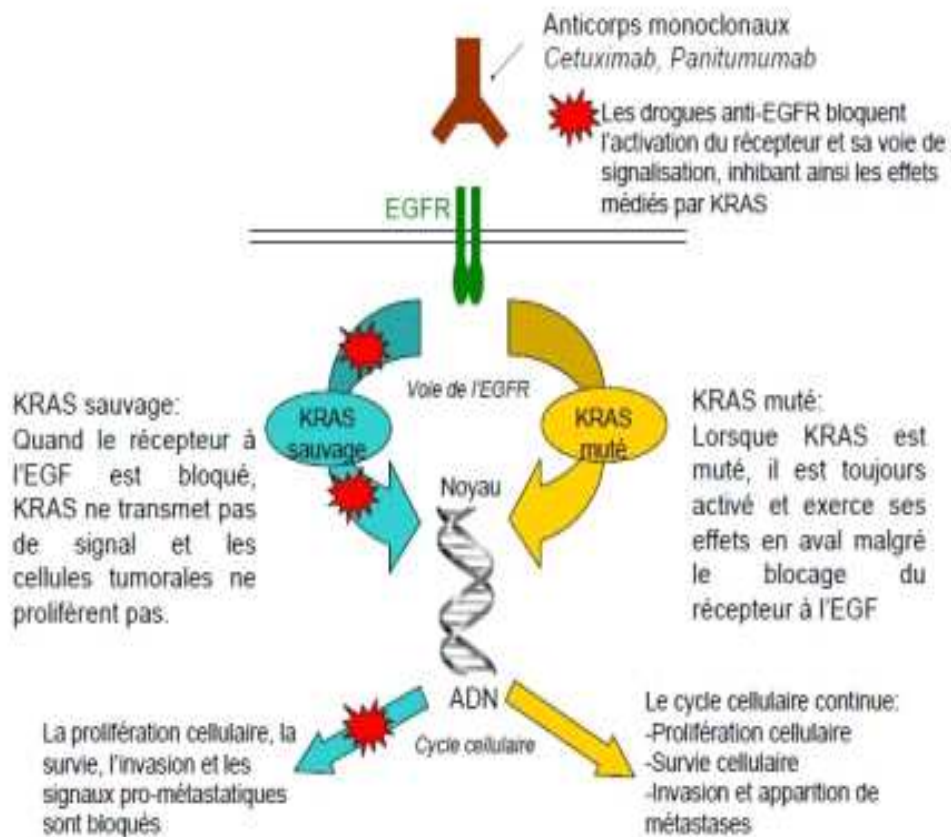


Figure 16 : Réponse thérapeutique selon le statu mutationnel de KRAS

Une étude (Lièvre, 2008) a recherché chez 89 patients traités pour un cancer colorectal métastatique, la mutation KRAS. Ces patients étaient traités par cétuximab. 26 des 89 patients ont répondu au cétuximab et n'étaient pas porteur de la mutation. La mutation KRAS a été retrouvée au niveau de la tumeur de 24 patients chez qui le traitement n'était pas efficace. La mutation KRAS entraîne donc la résistance au cétuximab.

Lièvre A. et son équipe (Lièvre, 2008), ont établi que les patients sans mutation KRAS vivent d'une manière générale plus longtemps que les patients avec une tumeur portant la mutation KRAS. La survie sans progression ainsi que la survie globale sont plus élevées (31,4 semaines contre 10,1 semaines et 14,3 mois contre 10,1 mois respectivement) (figure 17).

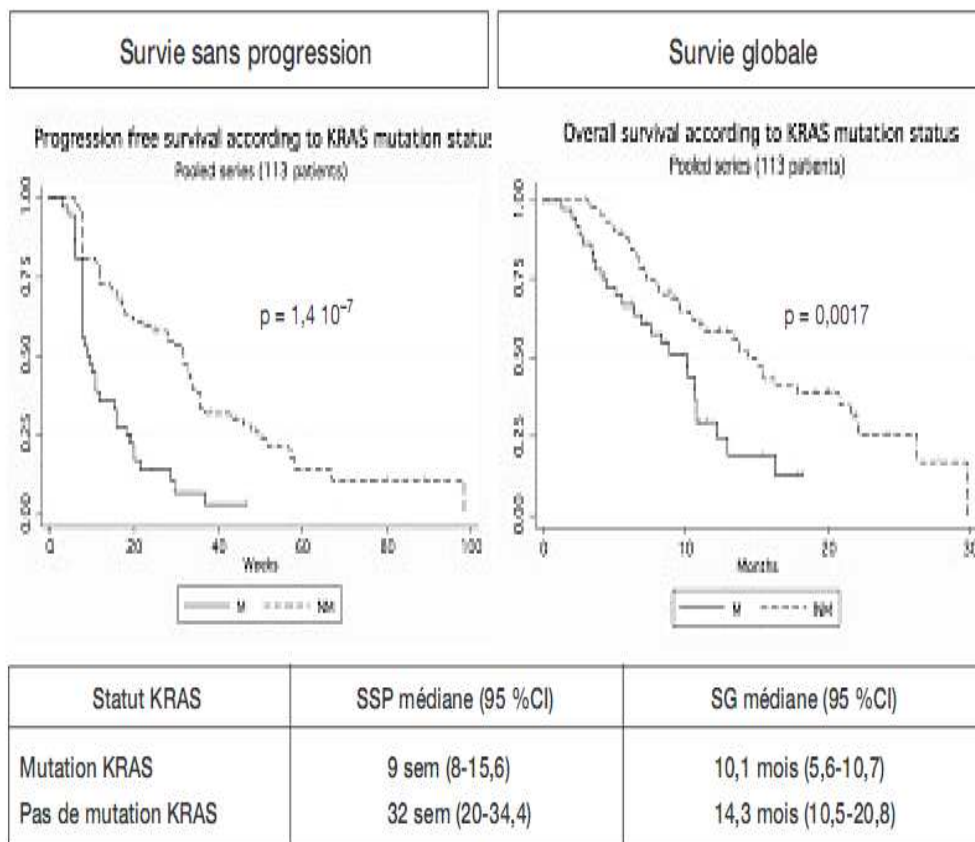


Figure17. Survie en fonction du statut de KRAS (n =113 pts)

Ainsi, Karapetis *et al.* ont montré que chez les patients ayant un CCR métastatique et ayant résisté aux traitements habituels (5-FU, oxaliplatine, irinotécan), l'administration de cetuximab en monothérapie, comparée aux soins de support seuls était associée à une meilleure survie globale chez les patients ayant un statut tumoral *KRAS* sauvage (9,5 contre 4,8 mois). Egalement, une amélioration de la survie sans progression (3,7 contre 1,9 mois,) a été observée. En revanche, chez les patients ayant un statut tumoral *KRAS* muté, il n'y avait pas de différence significative de survie globale ou sans progression en comparaison avec les soins de support seuls (Van Cutsem E., Peeters M., *et al.*, 2007).

Le statut *KRAS* est également prédictif de la résistance au traitement par panitumumab. Ainsi, le traitement par panitumumab augmente significativement la survie sans progression des patients ayant un statut *KRAS* sauvage, en comparaison avec des soins de confort (12,3 contre 7,3), mais, il n'existe pas d'amélioration significative chez les patients ayant un statut *KRAS* muté

(*Sobrero AF., 2008*).

Ces données ont été confirmées par une étude évaluant l'efficacité du panitumumab en deuxième ligne de traitement, après échec d'une chimiothérapie à base de fluoropyrimidines, où le statut *KRAS* des patients a été évalué de façon prospective (*Bokemeyer C, et al., 2008*)

Benvenuti et al, ont également conclu à une réponse négative du cétuximab ou panitumumab en présence de mutations *KRAS* (*Benvenuti, 2007*).

D'après ces données, la présence de mutation de *KRAS* étant prédictive de l'échec du traitement par Les anticorps anti-EGFR, il est devenu obligatoire de s'assurer de l'absence de cette mutation avant d'instaurer un traitement par cetuximab ou panitumumab (*Allegra et al., 2009*). Cependant, parmi les tumeurs colorectales sans mutation du gène *KRAS*, une forte proportion des patients (30 à 40%) ne répondent pas au cetuximab et panitumumab, reflétant la présence d'un autre facteur de résistance au traitement, ce qui suggère la présence d'autres facteurs impliqués dans la modulation de la réponse à cette thérapie ciblée notamment au niveau des autres partenaires des deux principales voies de signalisation activées par l'EGFR, c'est-à-dire les voies RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT. Il apparaît donc important d'étudier ces deux voies de signalisation, afin d'améliorer notre compréhension de leur comportement au sein du CCR, et d'essayer d'en dégager des facteurs pronostiques de réponse au cetuximab en complément des mutations de *KRAS* (*Lievre A. et al., 2008*).

V. Le gène BRAF: Un autre facteur prédictif dans le traitement du cancer colorectal métastatique

La recherche de mutation de *KRAS* est indispensable, mais insuffisante car elle n'explique pas complètement l'absence de réponse aux traitements. En effet 30 à 40% des patients sans mutation *KRAS* ne répondent pas aux anti-EGFR (*Cacheux. W., et al.,2010*).

D'autres marqueurs ont été étudiés en aval de *KRAS*.

Récemment, il a été mis en évidence qu'une mutation de gène *BRAF* produit le même effet de résistance aux traitements anti-EGFR chez 5% des patients (*Arate.S., et al.,2008 ; Cacheux. W., et al.,2010*).

VI.1. Le gène BRAF

Le gène BRAF est localisé sur le bras long q du chromosome 7 (7q34) et recouvre approximativement 150 pb, il code pour une protéine de 806 aa. (*Peyssonnaud, eychène, 2001*).

La protéine Raf (rapidly accelerated fibrosarcoma) est une sérine-thréonine kinase. Ces protéines jouent un rôle clé dans divers procédés physiologiques à savoir le métabolisme cellulaire, la progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire. (*Gaedcke et al., 2010*).

Il existe trois gènes RAF chez les mammifères : A-RAF, B-RAF et C-RAF codant chacun pour des produits différents. Il existe un point chaud de mutation au niveau du quinzième exon du gène BRAF, représentant plus de 90% des mutations observée, responsable du changement de l'acide glutamique en valine en position 600 (V600E), du fait de la transversion de A en T (T1799A). La région mutée correspond au domaine kinase de la protéine, qui est une sérine /threonine (*Laurent-Puig.P., et al.,2009*)

La mutation de BRAF représente un facteur de très mauvais pronostic en terme de progression tumorale.

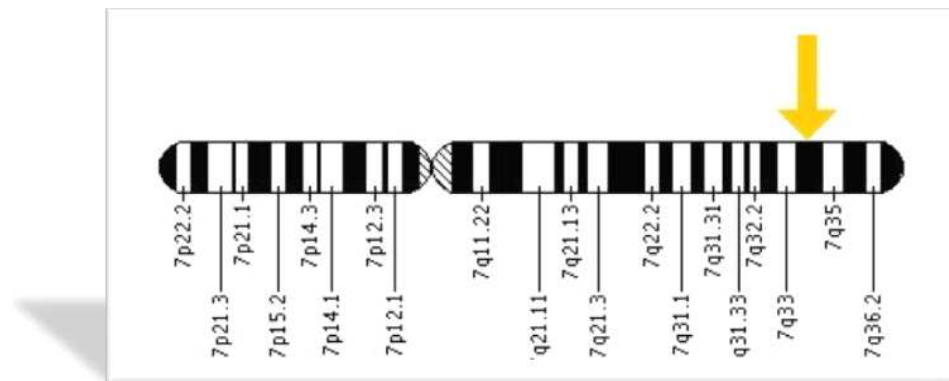


Fig 18 : Localisation chromosomique du gène BRAF sur le chromosome 7 (Gripp et al., 2007).

V.2 Statut mutationnel de BRAF et réponse aux traitements

La protéine BRAF est l'effecteur principal de KRAS. En 2008, Di Nicolantonio.F et ces collègues ont réalisé une étude basée sur l'hypothèse que si KRAS est sauvage, la mutation de

BRAF est un facteur prédictif de réponse au traitement d'anticorps monoclonal.

Sur 113 patients, 34 ont une tumeur portant la mutation KRAS et 79 ont le type sauvage.

Sur les 79 patients à KRAS sauvage, 11 présentent une mutation de BRAF au niveau de l'allèle V600E. Ces 11 patients ne répondaient pas au traitement par anticorps anti-EGFR. Par contre, après administration d'un inhibiteur de BRAF, la sensibilité aux anti-EGFR est retrouvée. La mutation de BRAF est donc un facteur prédictif de réponse au traitement par anti-EGFR. Les mutations de KRAS et de BRAF sont exclusives.

La valeur prédictive de BRAF comme facteur de réponse au traitement, est une notion controversée.

D'autres études, comme celles de Laurent-Puig (*Laurent-Puig, 2009*), n'attribuent pas de valeur prédictive à ce marqueur mais, plutôt une très forte valeur pronostic quant à la survie sans progression et à la survie globale.

Il a également été démontré que les patients avec une tumeur BRAF mutée ont un risque de progression de la maladie plus important que les patients avec une tumeur BRAF sauvage. La mutation de BRAF est là aussi un facteur pronostic de la maladie.

Enfin, la mutation de cette protéine est retrouvée chez les patients avec un CCRm où le système de réparation de l'ADN, MMR (DNA mismatch repair) est déficient. La déficience est prouvée par l'instabilité microsatellitaire. Le MMR est altéré dans 10 à 15% des CCR par mutation du gène hMLH1 (*Samowitz, 2006 et Miyakura, 2001*). La mutation BRAF est plus fréquente quand les tumeurs montrent une instabilité des microsatellites et pour des patients au stade III du CCR.

Matériel et méthodes

I-Matériel biologique

Il s'agit d'une étude rétrospective, portée sur une série de 15 patients présentant un cancer colorectal et dont l'histologie d'adénocarcinome colorectal a été confirmée. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncogénétique du Centre Hospitalier Universitaire Hassan II de Fès, afin d'évaluer l'implication des gènes *KRAS* et *BRAF* comme facteurs prédictifs et pronostics dans le diagnostic et le traitement du cancer colorectal.

Chez les 15 patients, du tissu issu de la tumeur primitive et des métastases est prélevé pour l'analyse de la mutation *KRAS* et *BRAF*.

Des échantillons, issus de résections chirurgicales ou de biopsies, fixés au formol et paraffinés, ont été collectés du Service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de FES.

Etude moléculaire

L'ensemble des échantillons a été revu au Laboratoire d'Anatomie Pathologique pour s'assurer de la qualité du prélèvement et du contenu tumoral. Dans chaque échantillon, la tumeur était identifiée par coloration Hématoxyline-Eosine-Safran (HES).

La lame colorée est ensuite transmise au médecin anatomopathologiste de la plateforme pour identifier une zone contenant plus de 50% de cellules tumorales.

La zone d'intérêt est cerclée avec un marqueur et ensuite séparée du reste de l'échantillon par macro-dissection, afin de s'assurer d'une proportion de cellules tumorales supérieure à 50 % et de réduire ainsi la contamination par les cellules normales (Figure 1). S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable (*Bibeau., 2009*). Dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

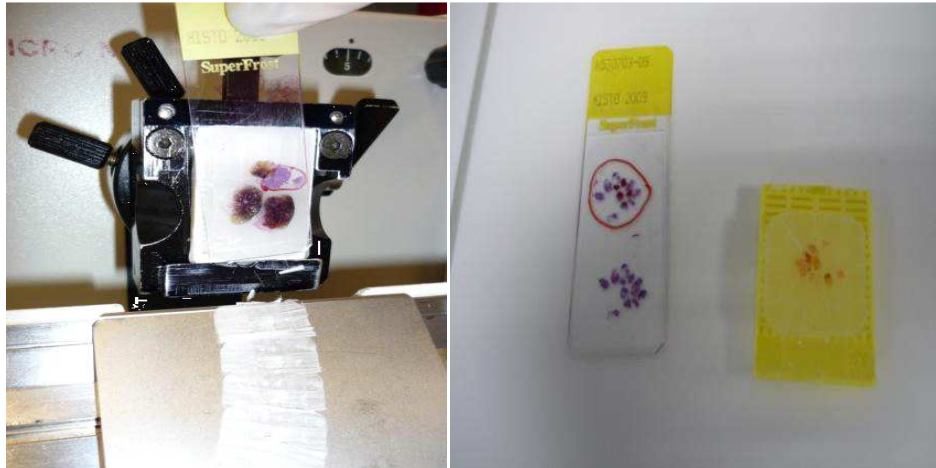


Figure. 1 : Correspondance entre la zone cerclée par l'anatomopathologiste et le bloc

Après extraction d'ADN, la recherche d'une mutation de *KRAS* est réalisée sur les codons 12 et 13, qui représentent 90 % des mutations décrites.

Les mutations de *BRAF* sont recherchées sur l'exon 15, au codon 600 (V600E), qui représente plus de 95 % des mutations connues.

L'analyse des mutations est réalisée par l'amplification PCR puis séquençage direct des produits PCR. Chaque analyse est répétée au moins deux fois, avec des PCR indépendantes.

II -Méthodes

Une extraction d'ADN est d'abord réalisée, suivie de sa quantification par dosage spectrophotométrique. Les échantillons d'ADN sont par la suite soumis à une PCR pour amplifier la séquence d'intérêt. Le contrôle et l'appréciation de l'intégrité de l'ADN amplifié se fait par une électrophorèse sur gel d'agarose. Le séquençage des produits PCR est finalement réalisé pour la mise en évidence des mutations affectant les gènes *KRAS* et *BRAF*.

II.1- Extraction d'ADN à partir de tissu colique tumoral

L'extraction de l'ADN tissulaire, est la première étape pour l'analyse et la recherche moléculaire des tumeurs. Elle consiste en l'isolement de l'ADN à partir des cellules tumorales tissulaires en quantité et en qualité suffisante pour permettre son analyse.

L'ADN est extrait à l'aide du kit d'extraction « *RecoverAll™ Total Nucleic Acid*

Isolation Kit FFPE tissues », à partir du tissu paraffiné (FFPE: formaldéhyd/

para-formaldehydfixed/ paraffin-embedded tissues).

L'extraction se déroule selon une succession d'étapes.

- **Déparaffinage**

A partir du tissu paraffiné une quantité de presque 35mg de paraffine (≤ 35 mg) est prélevée de chaque échantillon par forage ou macro-dissection de la zone tumorale. L'échantillon est placé dans un tube de 1,5 ml.

Un traitement au xylène est ensuite nécessaire pour éliminer le complètement de la paraffine. Ainsi, l'addition de 1ml de xylène 100%, suivie d'une brève homogénéisation par vortex, et d'une brève centrifugation sont réalisées. L'échantillon est ensuite chauffé pendant 30min à 50°C pour faire fondre la paraffine et puis centrifugé à vitesse maximale afin deculoter les tissus et enlever l'excès du xylène. Un lavage du culot(répété deux fois) par l'addition de 1 ml d'éthanol 100% à l'échantillon, est nécessaire. Une homogénéisation au vortex (Le tissu doit devenir opaque) et une centrifugation pendant 2 min à température ambiante et à vitesse maximale sont réalisées.

Les lavages à l'éthanol absolu enlèvent le xylène de l'échantillon et accélèrent le séchage du tissu. L'éthanol est ensuite enlevé en gardant le culot intact. Pour enlever l'éthanol résiduel, un Séchage du culot est réalisé à :

- 40°C-45°C pendant ≤ 20 min
- 37°C-40°C pendant 20-40 min

Enfin, le culot est séché à température ambiante, pendant 15 à 45 min.

2- Digestion à la protéase

La digestion de la membrane cellulaire se fait par élution de l'échantillon dans un volume précis de tampon de digestion. Le volume utilisé dépend de la taille de l'échantillon (≤ 40 μm :100 μl de tampon ; 40-80 μm :200 μl de tampon).4 μl de protéase sont également ajoutés. Une délicate agitation du tube fait mélanger et immerger le tissu dans la solution, tout en essayant d'éviter de coller le tissu aux parois tu tube (centrifuger brièvement si nécessaire pour avoir le tissu vers le bas du tube).Le mélange est incubé pendant 16 h à 50°C.

3- Isolement des acides nucléiques

L'isolement de l'ADN des débris protéiques et cellulaires, se fait par un mélange **Isolation Additif / éthanol** préparé au préalable (voir annexe 1). Après addition de ce mélange et homogénéisation, les échantillons apparaîtront blancs ou troubles.

Un volume de 700 µl du mélange échantillon/éthanol est passé à travers un filtre à cartouche, placé dans un tube de collecte. Cette opération est réalisée en évitant le pipetage de gros morceaux de tissus non digérés. Ensuite, le tube est Centrifugé à 10.000 x g pendant 30 secondes, et le reste du mélange est passé à travers le filtre. Les débris du filtre sont ainsi jetés, et la cartouche est réinsérée dans le même tube de collecte. Ces étapes peuvent être répétées jusqu'à ce que tout le mélange de l'échantillon soit passé à travers le filtre.

Une solution de lavage (wash 1) préparée au préalable (voir annexe 2), est ensuite ajoutée à un volume de 700 µl du mélange, à travers le filtre à cartouche. Une Centrifugation pendant 30 secondes à 10.000 x g est nécessaire pour passer le mélange dans le filtre. Les débris du filtre sont ainsi jetés, et la cartouche est réinsérée dans le même tube de collecte.

Une autre solution de lavage (wash 2/3) (voir annexe 2) est également ajoutée à un volume de 500 µl du mélange à travers le filtre à cartouche. Une Centrifugation pendant 30 secondes à 10.000 x g est nécessaire pour passer le mélange dans le filtre. Les débris du filtre sont ensuite jetés, et la cartouche est réinsérée dans le même tube de collecte. Le liquide résiduel du filtre est éliminé par une dernière centrifugation du tube pendant 30 secondes.

4- Digestion à la nucléase et purification des acides nucléiques

Afin de purifier l'ADN isolé, il est nécessaire de dégrader les ARN contenus dans l'échantillon. Un mélange de RNase préparé au préalable (voir annexe 3), est ajouté au centre de la cartouche filtrante. Le tube est ensuite fermé et incubé 30 minutes. Après avoir ajouté 700µl de solution de lavage wash 1, le tube est incubé pendant 30 à 60 secondes à température ambiante puis centrifugé pendant 30 secondes à 10.000 x g. Les débris du filtre sont ainsi jetés, et la cartouche est réinsérée dans le même tube de collecte. Un lavage répété deux fois est réalisé avec 500 µl de la solution Wash 2 / 3. Une centrifugation de 30 secondes à 10.000 x g est alors nécessaire pour éliminer le liquide résiduel. Les débris du filtre sont jetés, et la cartouche est réinsérée dans le même tube de

collecte. Pour éliminer le liquide résiduel provenant du filtre, une centrifugation pendant 1 min à 10000 x g est alors réalisée.

L'ADN purifié doit être élué en dernière étape.

Dans un premier temps, le filtre à cartouche est transféré à un nouveau tube de prélèvement. 60 µl d'une solution d'éluion(ou une eau sans nucléase), préchauffée à 95 ° C sont ajoutés.

L'échantillon est laissé reposer pendant une minute. Une Centrifugation pendant 1 min à vitesse maximale est réalisée en dernier lieu pour passer le mélange à travers le filtre.

Une meilleure conservation de l'ADN est recommandée à -20°C, pour une durée prolongée.

II.2. Dosage des acides nucléiques extraits

La quantité d'acides nucléiques extraite peut être appréciée selon une technique qui fait appel à l'absorbance des acides nucléiques dans l'ultraviolet.

Les acides nucléiques extraits sont dosés au spectrophotomètre par mesure de la densité optique à 260 nm dans des cuves en quartz. La mesure de la densité optique à 280 nm permet d'estimer la quantité de protéines résiduelles. Le rapport $DO_{280/260nm}$ permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Un rapport proche de 2 reflète une pureté satisfaisante. La concentration en ADN (en ng/µL) est égale à la DO_{260nm} multipliée par 50 et par la dilution.

Afin de passer à la phase d'amplification d'un gène recherché par PCR, il est nécessaire que les solutions d'ADN extraits aient la même concentration (100 ng/ml). Il faut donc estimer la concentration d'ADN pour chaque solution afin de réaliser la bonne dilution.

Spectrophotomètre utilisé : SmartSpec Plus spectrophotometer BioRad est un outil parfait pour la quantification d'acides nucléiques (ADN, et ARN) et de protéines. Il Fournit l'absorbance (sur large gamme de longueurs d'onde), la concentration et la pureté de l'échantillon à quantifier.



Figure. 2 : Spectrophotomètre : SmartSpec Plus spectrophotometerBioRad

II.3 Amplification en Chaîne par Polymérisation (PCR)

1. Principe

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier les segments d'ADN d'intérêt délimités par des amorces. A chaque cycle, l'ADN est dupliqué et l'amplification se fait par une suite de réplication de la matrice ADN double brin. Les amorces choisies sont spécifiques de la zone d'intérêt.

Son principe est basé sur la capacité de l'ADN polymérase à synthétiser le brin complémentaire d'un ADN. Pour initier le processus, un segment d'acide nucléique doit s'y associer afin de servir d'amorce. Cette amorce (ou primer), de séquence complémentaire à celle du brin à amplifier, est un oligonucléotide synthétique d'une longueur de 17 à 30 bases. Son association à l'ADN cible est suivie de son élongation par la polymérase, aboutissant ainsi à la synthèse d'un ADN double brin. La PCR consiste en une succession cyclique de trois étapes qui sont la dénaturation, l'hybridation et l'élongation.

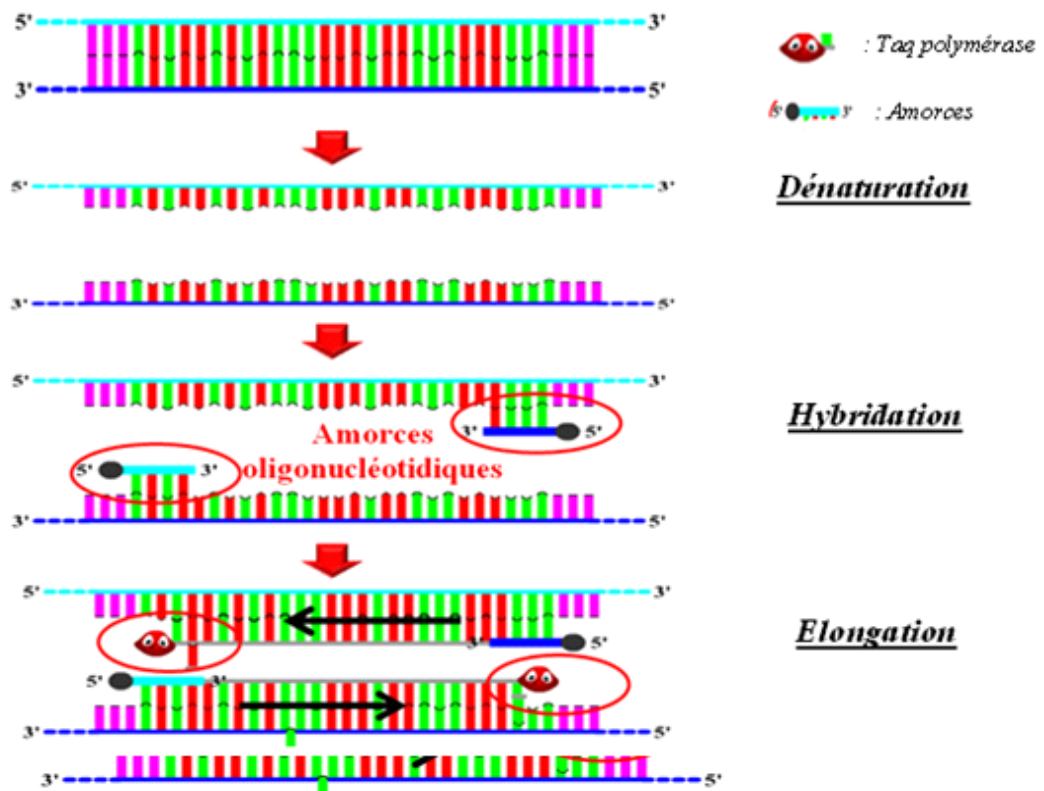


Figure 3 : Différentes étapes d'une PCR

La réaction de polymérisation en chaîne est réalisée dans un mélange réactionnel qui comprend l'extrait d'ADN, la Taq polymérase, les amorces et les quatre désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP) en excès dans une solution tampon. Les tubes contenant le mélange réactionnel sont soumis à des cycles de température répétés plusieurs dizaines de fois dans le bloc chauffant d'un thermocycleur (appareil qui comporte une enceinte où l'on dépose les tubes échantillons et dans laquelle la température peut varier, très rapidement et précisément, de 0 à 100°C). L'appareil permet la programmation de la durée et de la succession des cycles de paliers de température. Chaque cycle comprend trois périodes de quelques dizaines de secondes.

Cependant, Avant de commencer les cycles de PCR proprement dits, une étape de chauffage (généralement quelques minutes à 95°C) est réalisée. Cette étape permet de déshybrider les ADN double brin, casser les structures secondaires, activer les polymérases de type « Hot start » et dénaturer d'autres enzymes qui pourraient être dans la solution.

La PCR classique se déroule dans un petit tube placé dans thermocycleur qui permet de porter le tube aux températures voulues pendant les durées programmées et répéter l'opération pendant plusieurs cycles.

2. Programme PCR du gène KRAS exon 2 :

Pour l'étude de l'exon 2 du gène KRAS codon 12, la composition de chaque mélange réactionnel est la suivante :

Tableau 1 : Composition du mélange réactionnel pour l'étude du codon 12 exon 2 du gène KRAS

Réactifs	1 tube
Tampon (5X)	5µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Amorces KRAS 2bis + (12,5 µM) / KRAS 2+ (12,5 µM)	1µl
Amorces KRAS 2bis- (12,5µM) / KRAS 2- (12,5 µM)	1µl
Taq Gold (5U/µl)	0,2µl
H ₂ O stérile	4,3 µl

15 µl /tube +10µl ADN [100ng]

Tableau 2 : couples d'amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène KRAS exon 2 (KRAS 2bis (115pb) et KRAS 2 (241pb))

NOM	SEQUENCE 5' - 3'
KRAS 2 BIS +	TCCGGACGACTTTTACTGAC (20nt)

KRAS 2BIS -	TGGATCATATTCGTCCACAAAA(22nt)
KRAS2 +	GCCCAAACATAATTTTCCACGACCACTCA
KRAS 2 -	TCCTGGAAGAAACTATTTGGGC

+ : sens

- : antisens

Les conditions d'amplification de l'exon 2 KRAS sont les suivantes :

40 cycles	95°C : 30 secondes
KRAS Ex 2	58°C : 45 secondes
	72°C : 45 secondes
	72°C : 20 min
	4°C : ∞

3. Programme PCR du gène BRAF exon 15 :

Pour l'étude de l'exon 15 de BRAF codon 600, la composition de chaque mélange réactionnel est la suivante.

Tableau 3 : Composition du mélange réactionnel pour l'étude du codon 600 exon 15 (147 pb) du gène BRAF

Réactifs	1 tube
Tampon (5X)	5µl
MgCl₂ (25 mM)	2,5 µl
dNTP (10 mM)	1 µl
Amorces BRAF F (10 µM)	1µl
Amorces BRAF R (10 µM)	1µl
Taq Gold (5U/µl)	0,2µl

H2O stérile	4,3 µl
-------------	--------

15 µl /tube +10µl ADN [100ng]

Tableau 4 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCR du gène BRAF

NOM	SEQUENCE 5' - 3'
BRAF_15F	ACGAACGAGACTATCCTTTTAC
BRAF_15R	CATTGAGTCGTCGTAGAGTCCC

Les conditions d'amplification de l'exon 15 BRAF sont les suivantes :

35 cycles BRAF 15	95°C : 10 min
	94°C : 30 second
	60°C : 1 min
	72°C : 30 second
	72°C : 10 min
	4°C : ∞

II.4 Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits d'une PCR sont constitués d'un ou de plusieurs fragments d'ADN (la ou les séquences d'intérêt). La détection et l'analyse de ces produits peuvent être très rapidement réalisées par électrophorèse sur gel d'agarose (ou d'acrylamide). Cette technique est basée sur le déplacement de particules chargées en solution, sous l'influence d'un champ électrique généré par un courant continu. Les molécules d'ADN chargées négativement à pH neutre migrent vers l'anode (+) et leur vitesse est inversement proportionnelle à leur taille. Un marqueur de taille est déposé au même temps que les échantillons afin, de vérifier la taille et la spécificité du produit amplifié.

La visualisation de l'ADN est possible grâce à l'utilisation d'un produit intercalant, le Bromure d'Ethidium (BET) émettant une fluorescence sous U.V.

Le gel d'agarose 2% est préparé avec du tampon d'électrophorèse (TAE 1X) (voir

annexe 4). Les produits de PCR sont mélangés avec du tampon de charge puis déposés sur le gel au même temps qu'un marqueur de taille permettant d'estimer la taille du fragment amplifié. Des produits de très petite taille sont souvent visibles très près du front de migration sous forme de bandes plus ou moins diffuses. Ils correspondent à des dimères d'amorces et parfois aux amorces elles-mêmes. Selon les conditions réactionnelles, il arrive que des fragments non spécifiques d'ADN soient amplifiés en quantité plus ou moins abondante, formant des bandes nettes ou des « traînées » (smear).

A la fin de la migration, le gel est photographié avec un appareil d'analyse d'images sous lumière UV afin de conserver et d'analyser les résultats.

II.5 Séquençage des produits PCR :

Les échantillons pour lesquels l'amplification par PCR est satisfaisante, par leur spécificité et leur rendement sont ensuite purifiés afin d'éliminer les sels, les amorces, les enzymes et les dNTP non incorporés, pour ne pas s'interférer avec la séquence d'intérêt. Cette condition nécessite 3 réactions de purification essentielles :

a. Purification par ExoSAP®

Ce KIT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I (ExoI) qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés. 2µl de l'enzyme ExoSAP sont ajoutés à 10µl du produit PCR et le mélange est placé au niveau du thermocycleur selon le cycle suivant :

Tableau 5 : cycles de température pour la purification par Exo SAP

Température	Durée
37°C	3 mn

80 °C	15 min
10°C	+ ∞

- **Réaction de séquence par BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing**

La réaction de Sanger, repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase (**BigDye®**), de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP). Ces ddNTP sont présents dans le milieu réactionnel et chacun est marqué par un fluorophore spécifique dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes associé à la base correspondante et donc définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal. On les appelle des terminateurs d'élongation ou "*BigDyeTerminators*" ou "*Dye-labeledterminator*".

La technologie BigDye Terminator_version2 (Applied Biosystems : ABI), est celle qui a été utilisée.

Tableau 6 : Composition du mélange de réaction de séquence :

Tube	F(Forwad)/+	R(Reverse)/_
Amorce	1 µl (kRAS 2bis+12.5µM)	1 µl (kras 2 bis – 12.5µM)
	/1 µl (BRAFF 10 µM)	/1 µl (BRAFR 10 µM)

Bigdye	1.5 µl	1.5 µl
Produit de purification EXOSAP	2 µl	2 µl

C. Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-XTerminator :

Le kit BigDye® Xterminator™ permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction, les sels et autres molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection des bases par électrophorèse capillaire.

Le kit contient : - un flacon “SAM Solution” (stockage à T° ambiante)

- un flacon: « XTerminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

La purification se déroule selon les étapes suivantes :

- 1- 10µl de produits de réaction de séquence sont déposés dans la plaque Applied.
2. Un mix contenant **45 µl** de **solution SAM** par puits, et **10 µl** de **XTerminator Solution** par puits est préparé dans des cônes spécifiques.
3. Le mélange est vortéxé. 55µl du mix préparé est ajouté dans chaque puits à l'aide de la pipette distritips ou de la pipette monocanale.
4. La plaque est scellée correctement avec un film adhésif
5. La plaque est placée sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate.
6. L'agitateur est lancé sur la position 1800 rpm pendant 30secondes.
7. L'agitation est réalisée ensuite à 1800 rpm pendant 30 minutes.
8. La plaque est centrifugée 2 minutes à 1000 g (Centrifugeuse Heraus Multifuge 3S-R)
9. Le run est lancé sur le séquenceur 3730 avec le Run Protocole Module adapté.

Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées avec le séquenceur.

d- Détermination de la séquence :

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique, selon la méthode de Sanger

(séquenceur capillaire *ABI Prism™ 310 Genetic Analyser* et séquenceur 8 capillaires *ABI PRISM 3130xl*)

Lecture de la séquence

Les fragments d'ADN sont marqués grâce à des marqueurs fluorescents. Une fois la réaction de séquence terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie, repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Les systèmes les plus modernes permettent de lire les quatre nucléotides à partir d'une seule colonne de chromatographie. Le résultat est présenté par l'appareil sous forme de courbes (Figure 5) présentant la fluorescence détectée, et l'interprétation qui en est faite en terme de nucléotides.

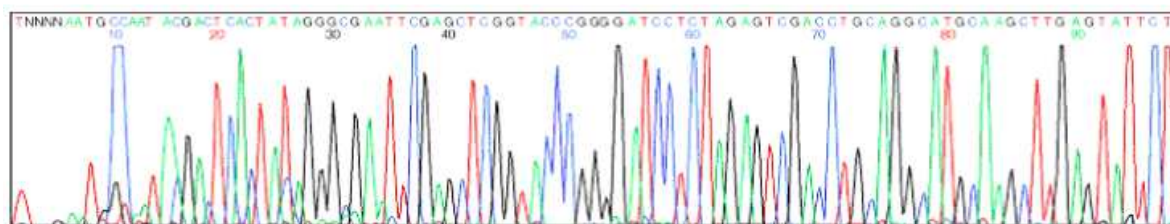


Figure 4 : Exemple d'enregistrement obtenu à partir d'un séquenceur automatique:

Il n'y a qu'une seule réaction de séquençage en présence des 4 didésoxyribonucléotides. ADN matrice + dNTP + ddCTP fluorescent bleu + ddATP fluorescent vert + ddGTP fluorescent noir + ddTTP fluorescent rouge.

Résultats et discussion

Pour évaluer les caractéristiques épidémiologiques des tumeurs colorectales, une étude statistique rétrospective portant sur 42 cas de tumeurs colorectales a été réalisée. Ces cas ont été recrutés et recensés au sein du service d'Anatomie Pathologique du CHU Hassan II de Fès, par l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique (UGMO) en 2010, et par l'unité d'oncologie ainsi que celle de gastroentérologie.

Résultats et discussion

I.1. Répartition des tumeurs colorectales malignes selon l'âge.

Dans notre série, la moyenne d'âge de patients porteurs des tumeurs colorectales malignes est de **64** ans avec des extrêmes d'âge de 22 ans et de 84 ans.

Comparativement à une autre étude rétrospective, réalisée sur 549 malades atteints de cancer colorectal et hospitalisés à la clinique chirurgicale « C » du CHU IBN SINA de Rabat, durant une période de 20 ans allant de 1981 à 2000, l'âge moyen des patients était de 50 ans avec des extrêmes allant de 16 à 85 ans.

En 2003, Viguié. J et ses collègues ont constaté que le cancer colorectal est rare avant 50 ans (6% des cas), mais son incidence augmente avec l'âge en doublant chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes. Chez l'enfant, le cancer colorectal représente 1% des tumeurs malignes à cet âge de vie.

En France, l'âge moyen de survenue de l'adénocarcinome colorectal se situe dans la septième décennie. Le nombre de nouveaux cas de cancer colorectal estimé était de 32 257 dont 11 332 (31,2%) survenaient chez des malades âgés de 65 à 74 ans et 15 427 (42,5%) chez des malades âgés de plus de 74 ans.

D'après les données des registres des tumeurs digestives en France, la proportion de cancers colorectaux survenant chez les sujets âgés de plus de 74 ans est passée de 38,4% pour la période 1976-1979 à 45,2% pour la période 1992-1995.

Compte tenu de l'évolution démographique attendue au cours des prochaines années, et donc de l'évolution du vieillissement de la population, cette proportion va encore augmenter. La question de la prise en charge des cancers des sujets âgés va alors devenir un vrai problème de santé publique. On prévoit que la population âgée de plus de 65 ans passera de 15,9% en 2000 à 28% en 2050. (*Aparicio.T., 2005*)

Au Maroc, l'âge moyen de survenue de cancer colorectal d'après les estimations de l'institut national d'oncologie (INO) est de 51,5 ans (*Lak. K., 2006*). Cependant, l'étude rétrospective réalisée au CHU de FES (2010) ne révèle pas le même résultat concernant l'âge

moyen. Cette différence peut être expliquée par la taille de l'échantillon qui n'est pas représentative.

I.2. répartition du cancer colorectal selon le sexe

L'étude au niveau du CHU de Fès révèle qu'il y a une légère prédominance masculine avec 57% des hommes et 43% de femmes (figure 1).

L'étude réalisée par la clinique chirurgicale « C » du CHU IBN SINA de Rabat sur les 549 patients, montre une nette prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,66 (60,2% d'hommes et 39,8% de femmes), ce qui est comparable au résultat trouvé par **Viguié. J et c ses collègues en 2003**, notant une prédominance masculine, avec un sexe ratio de 1,5.

Cependant, les trois études confirment que les hommes sont plus susceptibles de développer le cancer colorectal que les femmes.

Partout dans le monde, la prédominance masculine est plus marquée pour le cancer du rectum que pour le cancer du côlon. Le sexe-ratio se situe entre 1,5 et 1,6 pour le cancer rectal, et entre 0,8 et 1,4 pour le cancer du côlon.

Une étude plus avancée, réalisée dans le Nord-Est de la France indique que pour le cancer colorectal, le nombre de cas incidents estimé pour les femmes est en moyenne de 31% tous les dix ans. Pour les hommes, il est en moyenne de 65% et il est en augmentation. Ces résultats concordent avec d'autres travaux, menés en Europe et dans le monde. (*Thomann. G., 2007*).

Cette différence d'incidence entre les deux sexes, peut être due à plusieurs facteurs résultant par exemple des variations hormonales entre l'homme et la femme, des habitudes alimentaires, de l'activité physique... (*Jacobs., et al., 2007*).

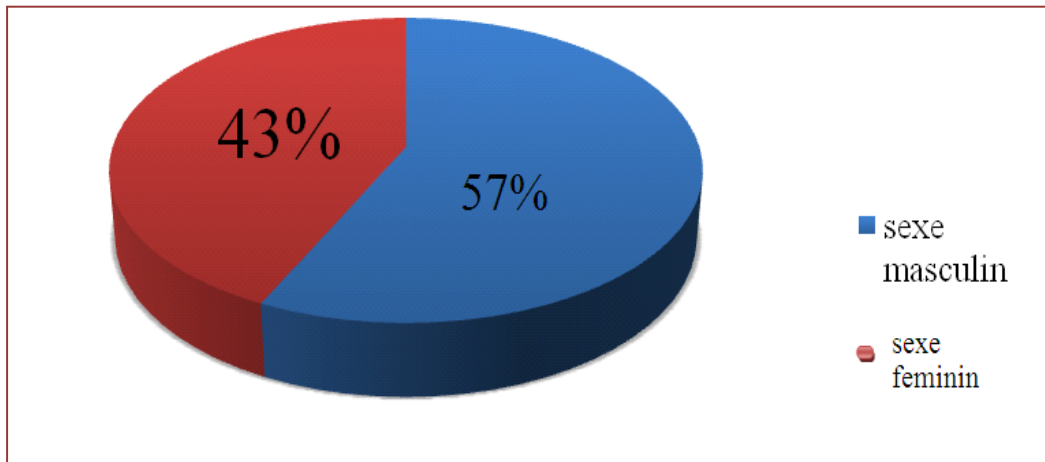


Figure 1: répartition du CCR selon le sexe

I.3. Répartition du CCR selon le milieu de résidence

Cette étude révèle qu'il y a une légère différence d'incidence entre le milieu urbain (57%) et le milieu rural (43%).

L'étude épidémiologique réalisée au sein du service d'Hépatogastroentérologie du CHU Hassan II Fès en 2008 par Najoua BENSEDDIK, et qui a porté sur 160 patients, a révélé une différence significative entre le milieu urbain (64,7%) et le milieu rural (35,3).

Cette différence suggère le rôle de facteurs environnementaux, notamment alimentaires (Viguié J. et al 2003 ; Faivre J., 2001).

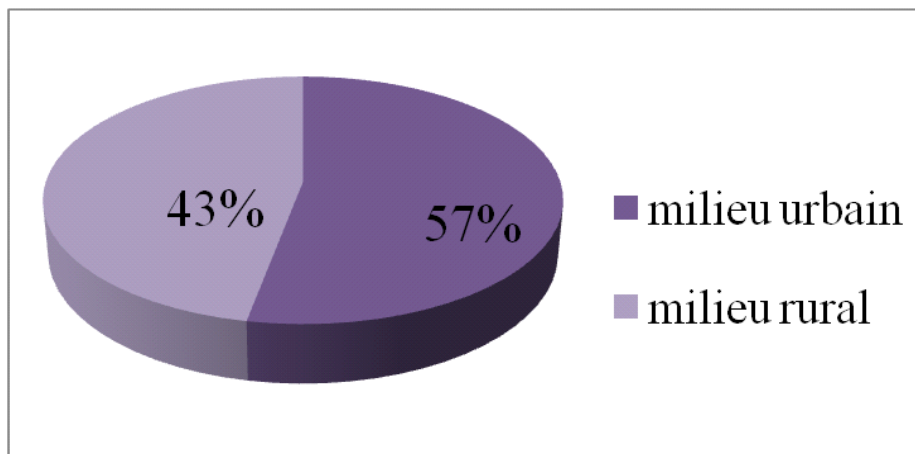


Figure 2: répartition du CCR selon le milieu de résidence

On peut projeter la différence d'incidence du CCR entre le milieu rural et le milieu urbain, à celle existant entre les pays développés et les pays sous-développés.

Le cancer colorectal est présent surtout dans les pays industrialisés. Ceci est peut être dû à une disposition de meilleurs techniques de détection, par rapport aux pays en voie de développement, mais surtout à une alimentation plus riche en viande, graisses d'origine animale et protéines.

Une des différences les plus marquées entre les régimes alimentaires des pays occidentaux et des pays africains, comme le Maroc, concerne la richesse en fibres alimentaires. Les fibres, dont l'apport est élevé en Afrique, auraient un effet protecteur.

I.4 Répartition histologique

Avant de passer à l'étude moléculaire, une étude histologique est nécessaire pour déterminer le type des tumeurs, leur aspect ainsi que leur stadification afin de déterminer l'étendue de la tumeur, en tenant compte également de la propagation de la tumeur dans les organes voisins, ou plus éloignés (métastases).

Sur les 42 échantillons étudiés, 94% des tumeurs colorectales sont des adénocarcinomes lieberkuhniens bien différenciés, et les 6% restants représentent des adénocarcinomes moyennement différenciés.

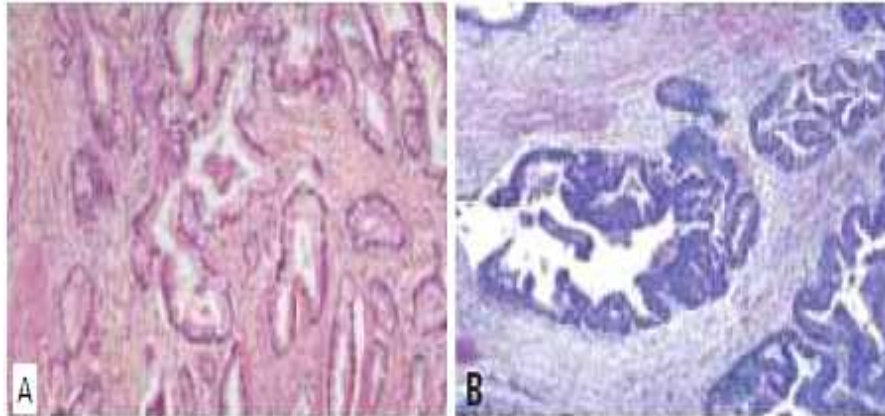


Figure 3. Adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation

A) Tumeurs bien différenciées, structure glandulaire, avec une sécrétion conservée ou diminuée, et un stroma fibrovasculaire en quantité équilibrée avec la prolifération épithéliale.

B) Tumeurs moyennement différenciées Tumeurs moyennement différenciées : elles comportent des tubes glandulaires irréguliers, riches en mitose, et des massifs cellulaires pleins

Le stade de la tumeur colorectale est déterminé par le pathologiste par microscopie, pour le bon choix de traitement ainsi que pour l'étude moléculaire, qui nécessite que le tissu tumoral choisi soit parfaitement caractérisé, en s'assurant par une vérification morphologique de sa richesse en cellules tumorale (plus de 50 %) et de l'absence de nécrose.

II-étude moléculaire

Sur 42 patients, une série de 15, a fait l'objet d'une analyse moléculaire, visant à amplifier les gènes KRAS et BRAF par PCR, et ensuite de les séquencer pour détecter les mutations présentes.

I-Amplification par PCR

I-1 Résultats de PCR du gène KRAS exon 2.

La PCR est une technique très sensible, capable d'amplifier in vitro une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour pouvoir le détecter et l'étudier. Malgré sa simplicité, la PCR reste une technique parfois délicate à réaliser et à interpréter si certaines conditions expérimentales ne permettent pas le bon déroulement de la technique. On peut noter par exemple :

- la possibilité de dégradation des acides nucléiques, ainsi que la présence d'inhibiteurs de PCR dans certain prélèvements,

- des risques de contamination lors des analyses au laboratoire.

La PCR est une technique intéressante et performante, sous réserve d'une assurance totale de la qualité des conditions expérimentales (locaux, matériel consommables, personnels, et procédure de travail).

Au cours des PCR réalisées durant notre étude, nous avons été confrontés à deux principales contraintes :

-l'inhibition de l'amplification qui résulte de la dégradation des amorces, ou de la mauvaise qualité de l'ADN extrait sur tissu.

-Présence de certaines bandes parasites sur le gel post-PCR (figure 5). Ces bandes sont le reflet d'un manque de spécificité et probablement d'une sensibilité qui mène à des faux positifs dues à la contamination du mix PCR lors de sa préparation.

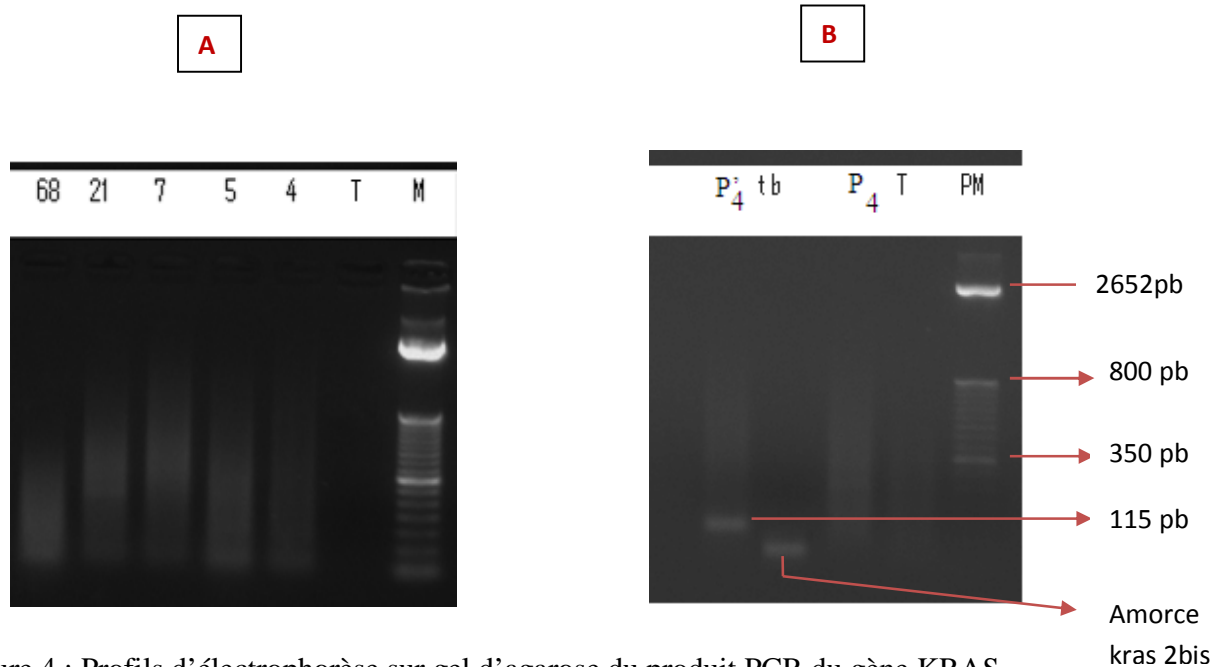


Figure.4 : Profils d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène KRAS

A : amorce utilisée KRAS 2 : M : marqueur de poids moléculaire ; T : témoin négatif

(4 ;5 ;7 ;21;68) : patients

B : amorce utilisée KRAS 2bis / KRAS2 :

M. marqueur de poids moléculaire ;

T. témoin négatif avec amorce kras 2 ;

P4 : patient 4 avec amorce KRAS 2 ;

tb. témoin négatif avec amorce kras 2 bis.

P'4 : patient 4 avec amorce KRAS 2bis.

Au cours de la PCR, la première amorce qu'on a choisi et utilisé pour l'amplification de l'exon 2 du gène KRAS est l'amorce KRAS2 qui délimite une région de (241 pb) de cet l'exon 2.

Comme le montre le profil A, le gel des produits PCR témoigne de l'absence de bandes au niveau de tous les puits, y compris le puits du témoin négatif T. Dans ce cas, la qualité de l'ADN extrait, ainsi que celle des autres réactifs (Taq polymérase, dNTP...) sont loin d'être soupçonnées.

L'absence de bandes peut être due à une dégradation de l'amorce. Cette hypothèse est confirmée suite à la réalisation d'une comparaison entre les résultats obtenus par l'utilisation de l'amorce KRAS 2 bis qui délimite une région d'environ 115 pb de l'exon 2 du gène KRAS et l'amorce KRAS2 chez le même patient.

Le gel des produits PCR du profil B montre la présence de deux bandes. Une bande spécifique d'environ 115 pb chez le patient **P'4**, et une autre bande correspondant à l'amorce 2 bis chez le témoin **tb**,

L'absence de bandes chez les autres patients confirme la dégradation de l'amorce KRAS 2 entraînant l'inhibition de la PCR.

La contamination qui peut avoir lieu principalement lors de la préparation de la solution mix, présente un risque majeur et permanent pour le bon déroulement de la PCR.

La figure 4 illustre bien cette contamination qui se traduit par la présence d'une bande parasite d'environ 115 pb chez le témoin, et d'une deuxième bande qui correspond à l'amorce. La présence de la bande parasite reflète le manque de spécificité et la grande sensibilité de cette technique.

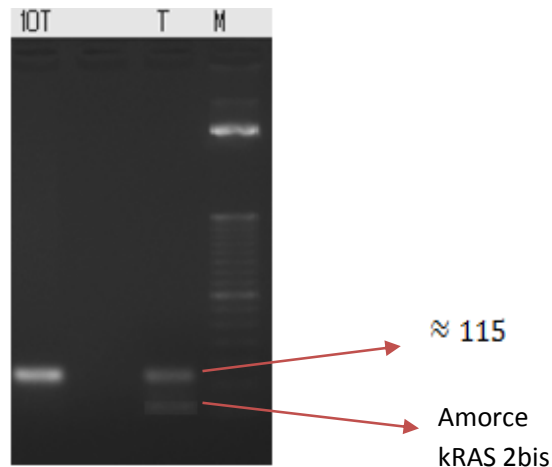


Figure 5 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène KRAS (amorce KRAS2 bis)

M: marqueur de poids moléculaire ; **T** : témoin négatif ; **10T** : patient.

La grande sensibilité de la technique explique la plupart des faux- positifs observés. En effet, une molécule d'ADN sera amplifiée au moins un millions de fois au même titre que les agents contaminants qui seront à l' origine de résultats faux- positifs obtenus. Pour remédier à cette contrainte, une séparation des différents temps d'extraction d'acides nucléiques et d'amplification, a été réalisée, et cela en utilisant des pièces différentes et non communicantes. Le dépôt d'ADN est effectué sous hôte.

La qualité des bandes visualisée sur gel est dépendante aussi de la qualité d'ADN extrait. Dans le cas où l'extraction est réalisée sur une pièce tumorale (cas de tissu fixé et paraffiné), la longueur du brin d'acide nucléique amplifié ne pourra pas dépasser 200 paires de bases, du fait de la fragmentation des acides nucléiques liée à la fixation. Les différents fixateurs utilisés (sauf le liquide de Bouin standard), donnent de bons résultats en technique de PCR et il convient cependant, de savoir que la qualité des acides nucléiques extraits dépend en grande partie de la durée de la fixation. En pratique, une fixation de plus de trois jours donne difficilement des acides nucléiques exploitables. Quand l'ADN est extrait à partir du sang, l'amplification donne des bandes bien visibles et séparées sur le gel d'électrophorèse. (Figure. 6).

L'étude du statut mutationnel de nos gènes d'intérêt (KRAS et BRAF) ne peut se réaliser que sur des tissus tumoraux.

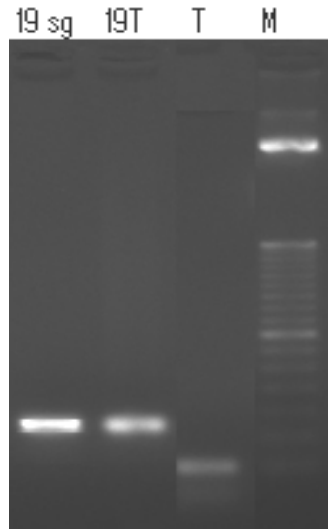


Figure 6: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose du produit PCR du gène KRAS (amorce KRAS2 bis)

M : marqueur de poids moléculaire ;

T : témoin négatif

19T : patient (ADN extrait du tissu tumoral) ;

19sg : patient (ADN extrait du sang)

Enfin, La PCR a donné une amplification spécifique pour tous les patients, en utilisant les deux amorces **KRAS 2 bis +/-** et **KRAS 2 +/-**. Les produits d'amplification ont été visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La spécificité des séquences d'ADN amplifiées a été confirmée par comparaison à un marqueur de taille. (Figure 7).

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification du gène KRAS des différents patients sont présentés dans la figure ci-dessous :

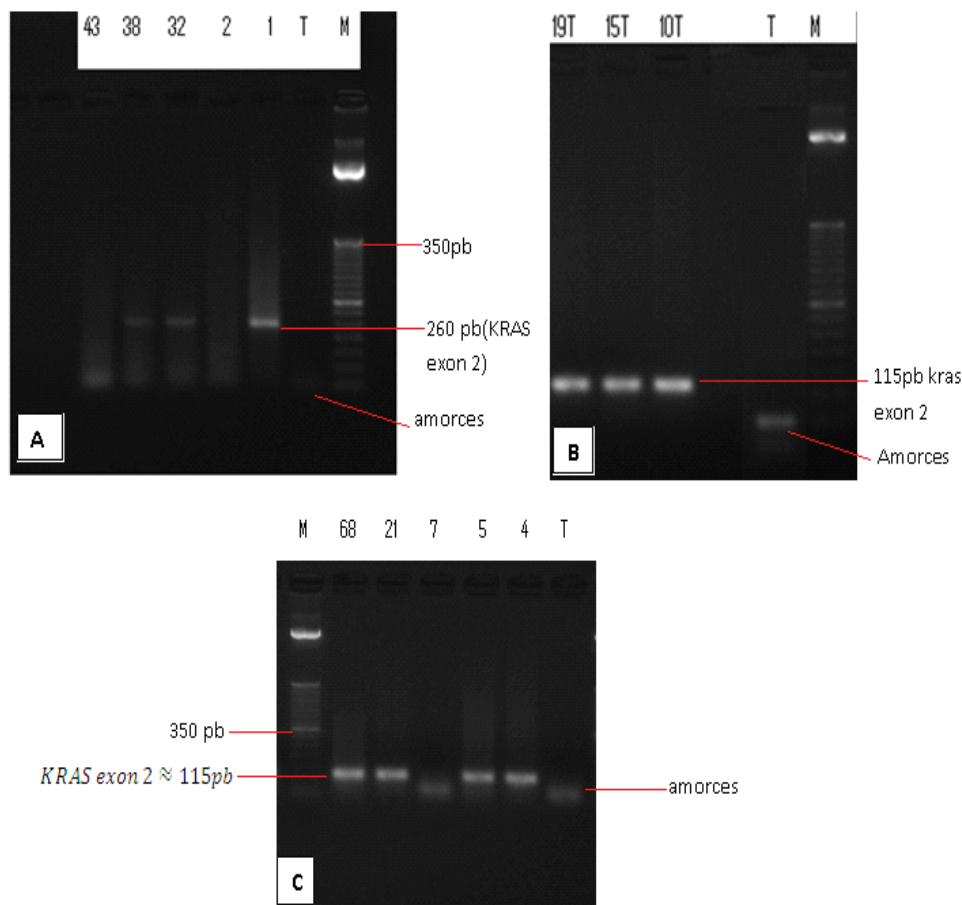


Figure 7: Profils d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène KRAS exon 2

- A : avec amorce KRAS 2+/- ; B et C : avec amorce KRAS 2 Bis
- M=marqueur de taille ; T= témoin négatif (exempte d'ADN) ;
- (1,4,5,7,10,15,19,21,32,38,43,68)= patients atteints du cancer colorectal

Le résultat d'amplification par PCR du gène KRAS exon 2, montre pour tous les patients, une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 2 du gène KRAS d'une taille approximative de 241 pb en utilisant l'amorce KRAS2, et de $\approx \approx$ 115pb en utilisant l'amorce KRAS2 Bis.

I.2 Résultats de PCR du gène BRAF exon 15 :

Les produits d'amplification par PCR du gène BRAF exon 15 ont été visualisés sous UV après électrophorèse sur gel d'agarose à 2%. La spécificité des séquences d'ADN amplifiées a été confirmée par comparaison à un marqueur de taille. (Figure 7).

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification du gène BRAF des différents patients sont présentés dans la figure ci-dessous :

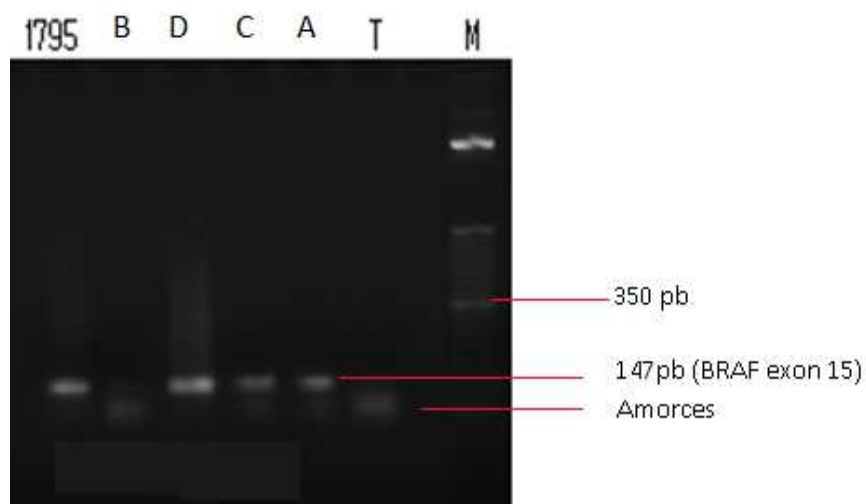


Figure 8 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15.

- M= marqueur de taille ; T= témoin négatif (exempte d'ADN) ;
(,A,B,C,D,1795)= patients atteints du cancer colorectal.

La PCR du gène BRAF exon 15 a donné une amplification spécifique pour tous les patients en utilisant les deux amorces **BRAF - R** et **BRAF- F**.

II. Analyse bioinformatique des séquences :

II.1. séquençage de l'exon 2 du gène KRAS.

Afin de cadrer la recherche de mutations, des recommandations ont été publiées (*Allegra, C.J., et al.,2009*). Ces dernières, concernent l'étude des codons 12 et 13 du gène codant pour KRAS chez les patients ayant un cancer colorectal métastasé, dans le but de prédire la réponse aux anti-EGFR cetuximab et panitumumab. Ces recommandations ne concernent pas les mutations rares situées aux codons 61 et 63 (ou d'autres) connues aussi pour activer la protéine KRAS.

Les ADN amplifiés correspondant au gène KRAS, dont le contrôle par électrophorèse était positif, ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou l'absence de la mutation ponctuelle, touchant l'exon 2 aux codons 12 et 13 à raison de 90%, et les 10% qui restent sont réparties sur les autres codons. Cette dernière joue un rôle dans le développement du cancer colorectal et la non réponse à la thérapie ciblée.

Les mutations les plus fréquentes à ces deux positions sont :

Codon 12 : GGT → AGT; CGT; TGT; GAT; GCT; GTT

Codon 13 : GGC → GAC; AGC; CGC; TGC ; GCC ; GTC

Le séquençage direct a été réalisé sur 4 patients. L'alignement entre la séquence étudiée et celle disponible dans la banque de donnée montre qu'il n'y a aucune mutation sur les deux codons suspects (12 et 13) (figure 9). Le chromatogramme (figure 10) montre que les deux allèles sont sauvages pour la mutation.

La mutation de gène KRAS sur ces deux codons est dite dominante. Il suffit que l'un des deux allèles soit muté, pour que ce proto-oncogène devienne un oncogène exprimant la protéine K-ras active de façon constitutive.

Les 4 patients étudiés ont donc le gène KRAS sauvage.

Score = 516 bits (279), Expect = 8e-144
 Identities = 279/279 (100%), Gaps = 0/279 (0%)
 Strand=Plus/Minus

```

Query 63      TTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA
122
Sbjct 18158491 TTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATA
18158432

Query 123     TAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAT
182
Sbjct 18158431 TAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAT
18158372

```

Figure 9. Alignement entre le segment du gène KRAS (brin anti-sens) du patient amplifié par l'amorce KRAS 2- et le segment de référence de base de données.

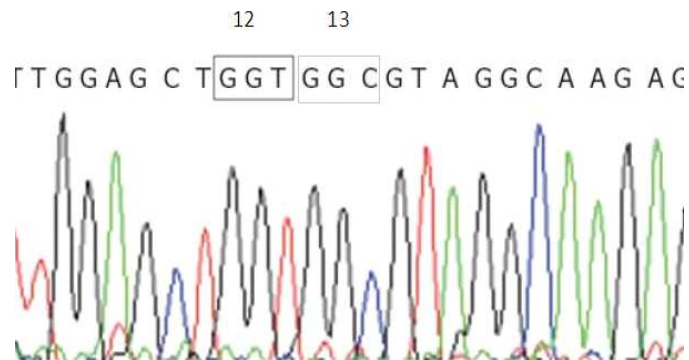


Figure10. Chromatogramme de séquençage de l'exon 2 du gène KRAS

La figure ci-dessous présente un exemple d'hétérozygotie pour la mutation du gène KRAS sur le codon 13 (G G C → G C C)

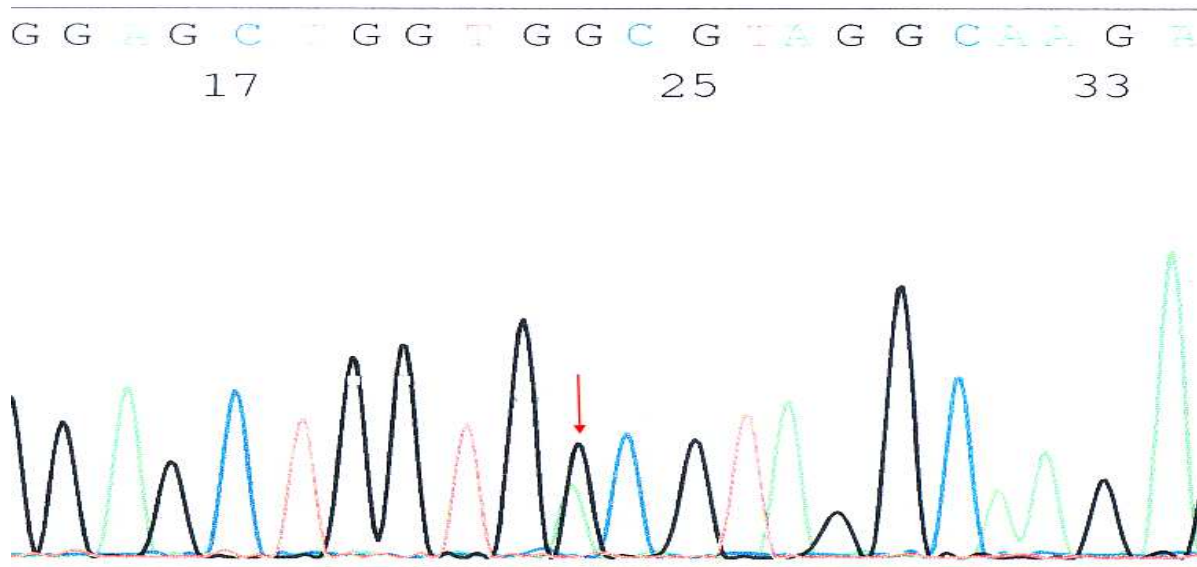


Figure.11 : chromatogramme de séquençage de l'exon 2 du gène KRAS (substitution de G en C sur le codon 13)

Une étude réalisée par Di Nicolantonì et ses collègues, en 2008, dans une cohorte de 113 patients atteints de cancer colorectal et recevant le cetuximab et panitumimab, a révélé après analyse du statut mutationnel du gène KRAS (exon 2) chez ces patients, un pourcentage de 35% (32 parmi 89) non répondeurs. Ces résultats confirment que la présence de mutation du gène KRAS est corrélée avec l'absence de réponse au traitement par les anticorps monoclonaux (Ac Mo) anti-EGFR. D'autres analyses ont indiqué que les patients atteints d'une tumeur à KRAS muté avaient une SSP (survie sans progression de la maladie) plus courte.

Des études précliniques (*Benvenuti S., et al., 2007*) et cliniques (*Khambata-Ford S ;., et al., 2007 ; De Roock W., et al 2008 ; Lièvre A., et al., 2008*) ont montré que la présence d'allèles mutés du gène KRAS est un facteur prédictif indépendant d'une résistance aux Ac Mo anti-EGFR. Vu ces résultats, l'agence de réglementation des médicaments de l'Union Européenne, l'EMA (Agence européenne du médicament), a autorisé l'utilisation du panitumumab et cetuximab uniquement chez les patients atteints de CCRm dont les tumeurs portent un gène KRAS de type sauvage.

Ces différentes études confirment que le statut mutationnel de l'exon 2 du gène KRAS, permet de **prédire** à un certain **pourcentage (35%)**, la réponse positive de nos patients étudiés (4 patients) vis-à-vis de la biothérapie par cetuximab et panitimumab. Des résultats plus concluants peuvent être obtenus en utilisant un échantillon plus large de patients.

Cependant, l'absence de mutations KRAS n'est pas suffisante pour affirmer une réponse thérapeutique aux anti-EGFR. Ainsi, la présence de ces mutations ne s'observe que chez 30 à 40% des patients non répondeurs. En complément de la recherche de ces mutations, l'identification d'autres déterminants génétiques de la résistance primaire aux thérapies ciblant l'EGFR dans les cancers colorectaux (CCR) est donc importante. Des arguments génétiques et biochimiques suggèrent que la protéine B-raf est le principal effecteur d'aval de KRAS (*Zhang BH., et al., 2004 ; Yan J., 1998*, d'où l'intérêt de son étude.

II.2. Séquençage de l'exon 15 du gène BRAF

Le séquençage direct de l'ADN amplifié correspondant au gène BRAF a été réalisé pour un seul patient confirmé sauvage pour la mutation du gène KRAS. Ce séquençage est réalisé afin de mettre en évidence la présence ou non de la mutation ponctuelle T1799A (codon 600) touchant l'exon 15 de ce gène, et jouant un rôle dans le développement du cancer colorectal. La mise en évidence de cette mutation permettra de prédire la réponse thérapeutique aux anti-EGFR.

La figure (12) montre une homologie de 100% de notre séquence amplifiée avec la séquence de référence disponible dans la banque de donnée.

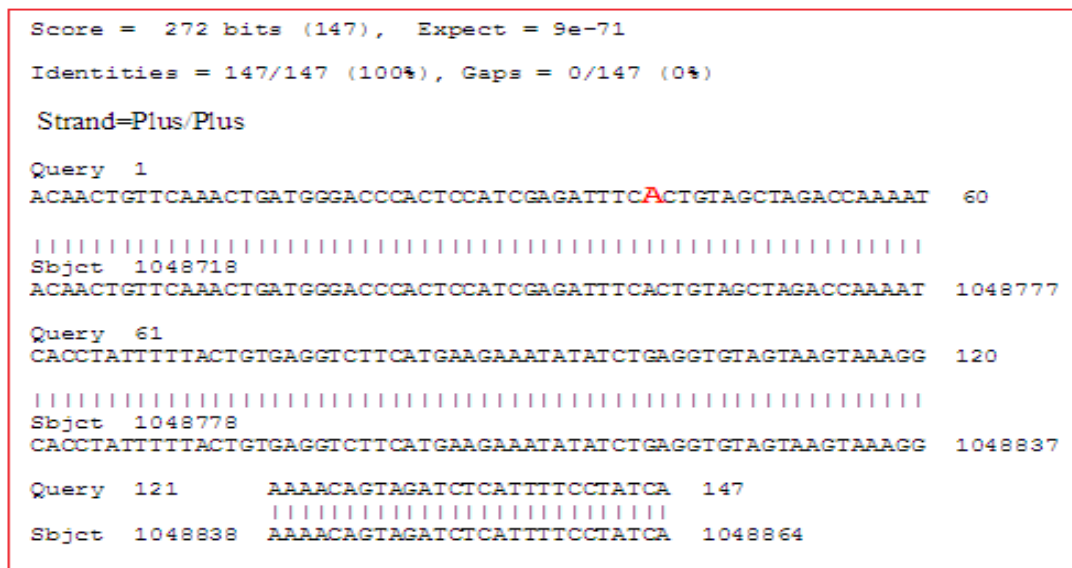


Figure 12. Alignement entre le segment du gène BRAF (brin sens) du patient, amplifié par l'amorce BRAF-F et le segment de référence de base de données.

Le nucléotide en rouge montre la localisation de la mutation ponctuelle (T1799A) sur l'exon 15 codon 600.

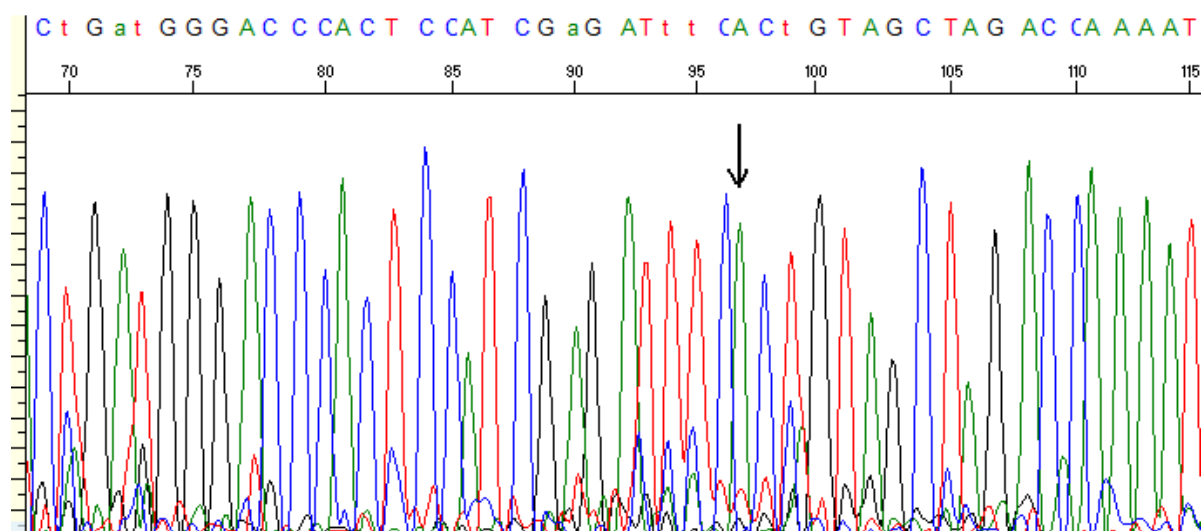


Figure 13 : Chromatogramme de séquençage de l'exon 15 du gène BRAF

L'analyse du statut mutationnel des gènes KRAS et BRAF pour le même patient a révélé un phénotype sauvage pour les deux gènes.

BRAF est muté dans 6% des cancers colorectaux, uniquement lorsque le gène *KRAS* n'est pas muté. Ces deux gènes agissent donc de façon complémentaire. En conséquence, il n'est pas étonnant que les mutations *BRAF* interfèrent avec l'efficacité des traitements anti-EGFR. Seules les tumeurs *BRAF* de type sauvages répondent au traitement (Di Nicolantonio F., et al., 2008).

D'autres auteurs, Nicolantonio. F et ces collaborateurs, ont rapporté que les mutations des gènes *KRAS* et *BRAF* s'excluent mutuellement dans le cancer colorectal, dont le seul type de mutation observé dans la cohorte étudiée (113 patients), était la substitution V600E acide glutamique en valine, détectée chez 11 patients (13%), suite à la mutation classique

GAG → GTG en position 1799 de la séquence nucléotidique de *BRAF*.

L'utilisation d'un échantillon plus large pourrait nous donner des résultats plus concluants, concernant la fréquence des codons les plus touchés par la mutation, pour pouvoir les comparer à celle trouvée par d'autres études, ainsi de faire une corrélation entre l'existence des mutations du gène *KRAS* et du gène *BRAF* chez les mêmes patients, décrites dans la littérature comme mutuellement exclusives.

Conclusion

Conclusion

Il est désormais bien établi que le cancer est une maladie de l'ADN. La réponse aux traitements est dépendante à la fois des cellules tumorales et de l'hôte, la génétique de ce dernier représente l'élément modulateur probablement essentiel. Dans le cas du cancer colorectal, après une amélioration considérable du pronostic constatée ces vingt dernières années, celui-ci connaît actuellement une stagnation. Les questions que se pose le clinicien ont changé : il ne s'agit plus de savoir s'il faut traiter, mais quels sont les patients pouvant bénéficier réellement d'une chimiothérapie adjuvante et quelle est la thérapie la plus efficace pour chaque patient, sans être toxique. C'est pourquoi la définition de nouveaux facteurs pronostiques et prédictifs de la réponse et/ou de la toxicité à la chimiothérapie est nécessaire à la prise en charge de ces patients atteints de cancers digestifs, afin de les traiter idéalement de manière personnalisée.

L'analyse somatique des altérations génétiques tumorales (« carte d'identité » des tumeurs), la pharmacogénétique des anti-cancéreux et l'identification des prédispositions héréditaires aux cancers, rendues possibles par le développement de la biologie moléculaire, constituent des outils précieux pour la découverte de tels facteurs. Ainsi, la génomique des tumeurs et des patients doit être désormais intégrée à la recherche clinique afin de disposer des bases de données indispensables à l'étude de ces facteurs pronostiques et prédictifs.

Dans le domaine de la pharmacogénétique, le test génétique de KRAS et BRAF est la première indication d'un test encadrant la prescription d'un médicament pour une tumeur solide. A l'heure où l'on parle de médecine personnalisée (adaptation du traitement spécifiquement à chaque personne), l'exemple de la recherche de mutations KRAS pour la prescription d'un médicament anticancéreux est une avancée majeure. Sélectionner les patients (absence de mutation KRAS) pour prescrire un anticancéreux (anti-EGFR) et éviter ainsi un traitement coûteux, non dénué d'effets toxiques potentiels et sans bénéfice pour le patient, constitue donc un réel progrès. Il s'agit d'une première étape dans cette voie.

Faut-il aussi étudier systématiquement les gènes BRAF et PIK3CA, voire PTEN dans la même optique ? Des études en cours trancheront.

La prise en charge du cancer colorectal métastatique a évolué grâce à l'apparition des

thérapies ciblées notamment celles de l'anti-EGFR en 2008. La survie globale et la survie sans progression ont été améliorées. Le cétuximab et le panitumumab sont deux anticorps monoclonaux anti-EGFR ayant une AMM pour le cancer colorectal métastatique sans mutation KRAS de la tumeur. Alternativement, le bévacizumab, qui est un anticorps anti-VEGF peut être prescrit que la tumeur soit mutée en KRAS ou non.

La recherche de la mutation KRAS est devenue un test important dans la prise en charge du patient. C'est le seul facteur prédictif de réponse au traitement par les anticorps monoclonaux anti-EGFR validé. Cependant, l'utilisation de ces molécules ne garanti pas la réussite du traitement car de nombreuses études ont montré que d'autres facteurs seraient susceptibles d'intervenir comme BRAF, PI3K, PTEN ou encore l'expression du récepteur à l'EGF.

Par ailleurs, des tests non invasifs, effectués à partir d'une simple prise de sang, seront probablement disponibles dans les années à venir: les mutations de KRAS et de BRAF pourront être détectées dans le sang du patient (métastatique) au cours de l'évolution de la maladie (*Di Fiore F., et al., 2009*).

Perspectives

Les traitements par anti-EGFR sont réservés aux patients n'ayant pas de mutation KRAS, puisqu'il a été montré qu'en présence d'une mutation KRAS, la plupart des patients ne répondaient pas à ce traitement (*Lievre, A., et al., 2006 ; Karapetis, C.S., et al., 2008*). La recherche de cette mutation est généralement réalisée sur un seul prélèvement tumoral, le plus souvent sur la tumeur primitive, après son exérèse chirurgicale. Cependant, parmi les patients n'ayant pas de mutation KRAS retrouvée, moins de 50 % répondent au traitement par l'anti-EGFR, alors que certains patients ayant une tumeur porteuse d'une mutation KRAS peuvent y répondre.

La présence d'une discordance de statut mutationnel entre les différentes localisations tumorales pourrait constituer une explication à la résistance au traitement par l'anti-EGFR. De même, l'existence d'une hétérogénéité du statut mutationnel KRAS intra-tumorale, potentiellement due à l'apparition tardive d'une mutation KRAS, est de nature à rendre inefficace le traitement par anti-EGFR.

De différentes études ont montré que chez les patients n'ayant pas de mutation KRAS, on obtenait une réponse tumorale (partielle ou complète) seulement dans 10 à 65 % des cas (*Moroni, M., et al., 2005*). D'un autre côté, les mêmes études ont montré que parmi les patients ayant une mutation KRAS, une réponse au traitement par l'anti-EGFR pouvait être observée jusque dans 20 % des cas (*Normanno, N., et al., 2009*). Très clairement, le seul statut KRAS, évalué principalement au niveau de la tumeur primitive, ne permet donc pas de prédire avec certitude la réponse au traitement par l'anti-EGFR.

Il a été montré qu'au sein des adénocarcinomes colorectaux, il existait une hétérogénéité des mutations KRAS et TP53 (*Al-Mulla, F., et al., 1998 ; Giaretti, W. et al., 1996*). En effet, l'étude du statut mutationnel KRAS sur plusieurs prélèvements de la même tumeur a révélé l'existence de foyers tumoraux mutés pour KRAS et des zones KRAS sauvages.

L'hypothèse énoncée par ces études était que la résistance au traitement par l'anti-EGFR pourrait être expliquée en partie par une hétérogénéité du statut mutationnel entre les tumeurs primitives et les métastases.

En conclusion, si la recherche de la mutation KRAS est un pré requis indispensable à un

traitement par l'anti-EGFR, on peut se demander s'il ne serait pas préférable de réaliser cette recherche sur l'ensemble des sites tumoraux accessibles à un prélèvement, et préférentiellement sur les métastases à distance, car elles constituent souvent la cible tumorale à traiter.

En effet, la recherche de la mutation *KRAS* sur un seul prélèvement tumoral, comme il est actuellement le cas en pratique courante, ne permet pas de s'affranchir d'une éventuelle hétérogénéité entre les localisations tumorales. La méconnaissance de celle-ci risque de contre-indiquer un traitement par l'anti-EGFR chez un patient considéré comme *KRAS* muté et qui aurait des métastases *KRAS* sauvages, alors qu'il pourrait en tirer bénéfice. A l'inverse, cela pourrait entraîner la prescription d'un traitement inefficace chez un patient considéré *KRAS* sauvage avec des métastases *KRAS* mutées.

Des études sur un plus grand nombre de patients sont nécessaires afin d'évaluer précisément la fréquence de l'hétérogénéité de statut *KRAS* et son impact sur l'efficacité thérapeutique des traitements par l'anti-EGFR.

Sur le plan technique, le séquençage direct des produits amplifiés par la méthode de Sanger est considéré comme la référence (gold standard) (*Benvenuti S., et al., 2007*). Cette technique présente néanmoins l'inconvénient de détecter les mutations lorsque le tissu tumoral représente au moins 20 à 50 % du tissu étudié. Pour optimiser la sensibilité de la détection des mutations, des techniques alternatives ont été développées. Sans être exhaustif, nous pouvons citer la PCR en temps réel (PCR-TaqMan) et la PCR spécifique d'allèle (ARMS-PCR) qui sont deux techniques qui partagent l'avantage d'être rapides et plus spécifiques (*Lamoril .J., et al., 2009*).

Les fixations formolées utilisées usuellement en anatomie pathologique permettent une bonne conservation de l'ADN mais une qualité moins suffisante pour rechercher les mutations par la technique de biologie moléculaire. En revanche, le liquide de Bouin par ses effets dégradant l'ADN ne permet pas de telles études, il est donc à proscrire formellement. Les nouveaux fixateurs non aldéhydiques en cours d'évaluation devront répondre à ces exigences.

Annexes

Annexe 1 : Préparation du mélange Isolation Additif / éthanol

Tableau : Volumes du mélange Isolation Additif / éthanol selon le volume du tampon de digestion

	Volume du tampon de digestion	
	100 µl	200 µl
Isolation additif	120 µl	240 µl
Ethanol 100%	275 µl	550 µl
Total	395 µl	790 µl

Annexe 2 : Préparation des solutions de lavage

a- Ajouter 42 ml d'éthanol ACS grade à 100% à la bouteille étiquetée : « Concentré de lavage1 ». Mélangez bien.

b- Ajouter 48 ml d'éthanol ACS grade à 100% à la bouteille étiquetée : « Concentré de lavage 2/3 ». Mélangez bien.

c- Fermer les bouteilles de la solution de lavage hermétiquement pour empêcher l'évaporation.

d- Marquer les étiquettes pour indiquer que l'éthanol a été ajouté.

N.B. Les solutions finales réfèrent au Lavage 1 et Lavage 2 / 3.

Annexe 3.

Tableau : Volumes de chaque constituant du mélange RNase

Volume (par réaction)	Composant
10 µl	RNase A
50 µl	Eau stérile ultra-pure

Annexe 3 : Protocole du dosage par spectrophotométrie

- **Protocole expérimental :**

- Allumer l'appareil
- Placer la cuve contenant le blanc (1ml de TE 10/1) dans le puit
- Appuyer sur le bouton ADN/ARN.
- On sélectionne le programme ds DNA entrer 260 nm entrer prêt à lire Appuyer sur « read Blank »
- Placer l'échantillon d'ADN dans le puit (au centre) et on remet le blanc à sa première place
- Même étape pour le blanc sauf que pour l'échantillon il faut appuyer sur « readsample »

N.B : pour ne pas perdre l'ADN on prend 10 µl d'ADN et on le met dans 990 µl de H₂O.

- Appuyer sur « print » Appuyer sur bouton « 1 » et obtenir la quantité d'ADN.
- Appuyer sur cancel.

Annexe 4 : préparation du gel d'électrophorèse

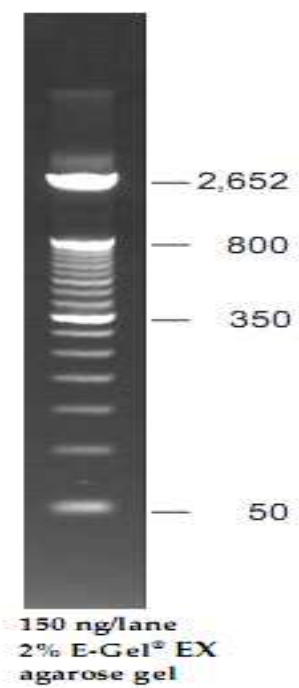
- **BET(Bromure d'ethidium) à 10mg/ ml :**

- BET : 0.5g
 - Eau distillé : qsp 50ml
 - Laisser dissoudre
 - Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière
 - **Gel d'agarose à 2% :**
 - Agarose : 1g
 - Tampon TAE 1X : 50ml
 - Chauffer à ébullition
 - Ajouter le BET
 - Couler le gel dans la cuve d'électrophorèse
 -
 - **Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 50X :**
 - Tris-base : 242g
 - EDTA 0.5M PH 8 : 100ml
 - Acide acétique : 57ml
 - Eau distillée : qsp 1000ml
 - Alliquoter et autoclaver
 - Conserver à 4°C
 - **Tampon de charge :**
 - bleu de bromophénol : 2,5 mg
- {

 - **(C12 H10 Br4 O5)**
 - **M= 669,97g/mol**

- glycérol 300 μ l
- EDS 700 μ l
- conserver la solution à 4°C

- Marqueur de taille



Profil de migration par électrophorèse du marqueur de poids moléculaire (50 pb)

Annexes 5 :

- **Séquence exon 2 du gène KRAS :**

Codon d'initiation

cgggtttgtattaaaaggactggtggagtattgatagtgattaaccttatgtgtgacatgttctaatatagtcacatttcattatattttattataagGC
CTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAG
CTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGgtaaacttgttttaatatgcatattactggtgcaggaccatt
ctttgatacagataaacccg

■ : Amorces KRAS 2+/- (286 pb)

■ codon 12

■ : Amorces KRAS 2 bis +/-

■ codon 13

- Séquence exon 15 du gène BRAF

V1799E



ACAACTGTTCAAAGTATGATGGGACCCACTCCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGACCAAATCACCTATTTTTACTGTG
AGGTCTTCATGAAGAAATATATCTGAGGTGTAGTAAGTAAAGGAAAACAGTAGATCTCATTTCCTATCA

Références bibliographiques

A

Allegra, C.J., et al.,2009. *American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy.* J Clin Oncol., p. 2091-6.

Al Hilal. M., (1985-2000). Study: cancer statistics in Morocco.
<http://cancer.ma/English/Publications/docs/Etude.aspx>

Al Hilal M., 2002. Etude: épidémiologie du cancer (malades de l'INO entre 1985-2002).
<http://www.cancer.ma/Publications/docs/Bilan85-2002.aspx>

Ali BR., Nouvel I., Leung KF., Hume AN., Seabra MC., 2010. A novel statin-mediated "prenylation block-and-release" assay provides insight into the membrane targeting mechanisms of small GTPases. Biochem Biophys Res Commun.

Al-Mulla, F., et al., Heterogeneity of mutant versus wild-type Ki-ras in primary and metastatic colorectal carcinomas, and association of codon-12 valine with early mortality. J Pathol, 1998. 185(2): p. 130-8.

Andreyev HJ., Norman AR., Cunningham D., et al., 1998. Kirsten ras mutations in patients

withcolorectal cancer: The multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst*, 90:675-684

Amado RG., Wolf M., Peeters M., et al., 2008. Wildtype KRAS is required for panitumumab efficacy in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26, p 1626-1634,

Amador., M.L., M. Hidalgo., 2004. *Epidermal growth factor receptor as a therapeutic target for the treatment of colorectal cancer.* *Clin ColorectalCancer.*, 4(1). p. 51-62.

Amarti.A., 2008. Les cancers digestifs au CHU HASSAN II Fès Service d'anatomopathologie.

Aparicio.T ., Mitr Y. E., Cunma ., Giprad L. 2005. Prise en charge des cancers colorectaux des sujets ages. *Gastroenterol clin biol*, 29 p 1014-23.

B

Benhamiche AM., 1998. Cancer du côlon: épidémiologie descriptive et groupes à risque élevé. *Gastroentérol Clin Biol*; 22 (suppl 3bis) : S3-S11.

Benvenuti S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., et coll.2007. Oncogenic activation of the RAS/RAF signaling pathway impairs the response of metastatic colorectal cancers to anti-Epidermal Growth Factor Receptor antibodytherapies. *Cancer Res.* ; 67 : 2643–2648.

Bokemeyer C., Bondarenko I., Hartmann JT., et al., 2008. KRAS status and efficacy of first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) with FOLFOX with or without cetuximab: The OPUS experience. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* ., 26:4000

Bosset J F, Rouanet P., 2005. Cancer colorectal. *Polycopie nationale de cancérologie* ., 1-14

Bibeau F., Lopez-Crapez E., Di Fiore F., Thezenas S., Ychou M., Blanchard F., Lamy A., et al., 2009. Impact of Fc-RIIIa-Fc-RIIIa Polymorphisms and KRAS Mutations on the Clinical Outcome of Patients With Metastatic Colorectal Cancer Treated With Cetuximab Plus Irinotecan. *JCO*, 27 : 1122-1129.

C

Cacheux. W., Le Tourneau. C., Baranger. B., Mignot .L., P.Mariani.,2010. Thérapie ciblée dans le traitement du cancer colorectal métastatique : place actuelle.journal de chirurgie viscérale 148,12-19.

Calvert PM., Frucht H., 2002. The genetics of colorectal cancer. Ann Intern Med;137:603-12.

Center, M.M., et al., 2009.*Worldwide variations in colorectal cancer*.CA Cancer J Clin, **59**(6): p. 366-78.

D

De Gramont A., Housset M., Norlinger B., Rougier P., 2009. Le cancer colorectal en questions. Paris Fondation ARCAD (Aide et Recherche en CANcerologie Digestive). p143

De Roock W., Piessevaux H., De Schutter J., et al., 2008.KRAS wild-type state predicts survival and is associated to early radiological response in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. Ann Oncol 19, p 508-515,

Di Nicolantonio F., Martini M., Molinari F., Sartore-Bianchi A., Arena S., Saletti P., *et al.*, 2008. Une forme sauvage de *BRAF* est nécessaire à la réponse au panitumumab ou au cétuximab dans le cancer colorectal métastatique. *J ClinOncol.* ; 26 : 5705-5712.

Di Fiore F., Charbonnier F., Lefebure B., Laurent M., Le Pessot F., Michel P, et al., 2008. Clinical interest of KRAS mutation detection in blood for anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer. Br J Cancer , vol 99(3) p 551-2.

Dunlop. MG., Farrington. SM., Carothers .AD., Wyllie .AH., Sharp .L,Burn J, et al.,1997.Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. Hum Mol Genet.,6:105–10.

Duval A., Hamelin R., 2002.Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers toward a new concept of target genes for instability.Cancer Res; 62: 2447-54.

Dreyer.C., Raymond.E., Faivre. S., 2009.les thérapie ciblées et leurs indication dans les tumeurs solides.,30, 416-424.

F

FAIVRE. J., 2001. Epidemiologie et prevention du cancer colorectal, SpringerParis. -p110

Fabre. E., Spano JP., Altan. D. 2000.Le cancer du côlon: mise au point Bulletin du cancer. Vol 87 p 5-20

Ferron . M., et al., 2005. Annales de chirurgie, 130 602–607.

Fearon ER.,Vogelstein B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesisCell., vol 61:759–67.

Fodde.R., Kuipers J., Rosenberg C., Smits R., Kielman M., Gaspar C., *et al.*, 2001. Mutations in the APC tumour suppressor gene cause chromosomal instability. Nat Cell Biol, 3: 433-8.

Françoise Piard., Laurent Martin., Caroline Chapusot., Tibor Ponnelle., Jean. Faivre., 2002. Les voies de la carcinogenèse colorectale : intérêt et application pour le pathologiste. Annales de Pathologie, Vol 22, N° 4 - 2002 pp. 277-288.

Frebourg .T.,Mauillon.J ., Thomas G ., Olschwang .S., 2003.Le cancer colorectal héréditaire non polyposique: définition, génétique, diagnostic et surveillance médicale. Gastroenterol Clin Biol;27:708–14.

Fujimoto K., Sheng H., Shao J., Beauchamp RD., 2001.Transforminggrowth factor-beta1 promotes invasiveness after cellular transformation with activated RAS in intestinal epithelial cells. ExpCell Res; 266:239-49.

G

Goldstein NS, Armin M., 2001. Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer*, 92:1331—46.

Giaretti, W., et al., 1996. Intratumor heterogeneity of K-ras2 mutations in colorectal adenocarcinomas: association with degree of DNA aneuploidy. *Am J Pathol*, 149(1): p. 237-45.

H

Hurwitz, H. and F. Kabbinavar., 2005. *Bevacizumab combined with standard fluoropyrimidine-based chemotherapy regimens to treat colorectal cancer.* *Oncology*, 69 Suppl 3: p. 17 -24.

J

Jonker DJ., O'Callaghan CJ., Karapetis CS., et al., 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*; 357:2040-2048.

Jemal A., Siegel R., Ward E., Murray T., Xu J., Smigal C., un MJ., 2006. Cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 56: 106-130

Jean-Philippe Spano., stephane vignot., 2007. EGR receptor in colorectal cancer. *Bull cancer*, vol 94, 30-227.

Jacobs., Elisabeth T., Thompson., Patria Diet., 2007. Gender and colorectal neoplasia. *Journcingastroenterol*, 41(8) p 731-46

Jimeno A., Messersmith WA., Hirsch FR., Franklin WA., Eckhardt SG. 2009. KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol* , vol 27 p 1130—6.

K

Khambata-Ford S., Garrett CR., Meropol NJ., et al., 2007. Expression of epiregulin and amphiregulin and Kras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 25, p 3230-3237,

Karapetis CS., Khambata-Ford S., Jonker DJ., O'Callaghan CJ., Tu D., Tebbutt NC., et al., 2007. K-RAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med* x; 359:1757-65.

Karnoub AE., Weinberg RA., 2008. RAS oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol*;9:517—31.

Ł

Lak. K., 2006. Thèse: le cancer du rectum, étude rétrospective de 83 cas au service des urgences chirurgicales viscérales. CHU Ibn Rochd, Casablanca., 83

Lamoril J., et al., 2009. KRAS and colorectal cancer: an important step to the personalized medicine. *Immuno-analyse et biologie spécialisée.*, vol **24**, p 196—209.

Lievre A., J.P. spano., 2006. Mutation de KRAS et cetuximab: un pas de plus vers l'identification de marqueurs prédictifs de la réponse aux thérapies ciblées. *La lettre de cancerologie.*, vol XV n°3.

Lièvre A., Bachet JB., Boige V., et al., 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 26 p 374-379.

Lièvre., P. Laurent-Puig., Dec 2004. *Molecular biology in clinical cancer research: the example of digestive cancers;* Colloque de la RESP, à Paris.

Levi F., La Vecchia C., 2007. *Epidémiologie et tendances du cancer en Suisse. Bull Cancer; 94, p 775-80.*

Levy P et al., 2008. *Abregés d'Hépatogastro-entérologie - Items 148 Paris : Elsevier Masson, p*

429.

Lullmann Rauch R., 2008. Histologie Stuuugart : De Boeck., -p704.

Laurent-Puig P., 1998. Cancérogenèse colique. Notions fondamentales. EncyclMédChir Elsevier, Paris, Gastro-entérologie., 9-000-C-13, 6 p.

Laurent-Puig P., Cayre A., Manceau G., et al., 2009. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wildtypeKRAS metastatic colon cancer. J ClinOncol;27(35):5924-30.

Lievre A., Bachet JB., Boige V., et al., 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J ClinOncol., 26:374-379.

Ljuslinder, I., et al., 2010. *Increased EGFR expression at the invasive margin is a negative prognostic factor in colorectal cancer.* Int J Cancer.

M

Magali Svrcek., Pascale Cerveraa., Richard Hamelinb., Olivier Lascolsc,d, Alex Duvalb., Jean-François Fléjoua., 2010. Cancer colorectal : les nouveaux rôles du pathologiste à l'ère de la biologie moléculaire et des thérapies « ciblées ». Revue Francophone Des Laboratoires - Janvier 2011 - N°428 // 29

Markowitz, S.D. and M.M. Bertagnolli., 2009. *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer.* N Engl J Med., Vol 361(25), p. 2449-60.

Mayer RJ., 2009. Targeted therapy for advanced colorectal cancer—more is not always better. *N Engl J Med*, 360:623—5.

Mayer., A., et al., 1993. *The prognostic significance of proliferating cell nuclear antigen, epidermal growth factor receptor, and mdx gene expression in colorectal cancer.* *Cancer.*, **71**(8): p. 2454-60.

Mendelsohn, J., and J. Baselga., 2000. *The EGF receptor family as targets for cancer therapy.* *Oncogene*, **19**(56): p. 6550-65.

Minamoto T., Yamashita N., Ochiai A., Mai M., Sugimura T., Ronai Z *et al.*, 1995. Mutant K-ras in apparently normal mucosa of colorectal cancer patients. Its potential as a biomarker of colorectal tumorigenesis. *Cancer*, **75** : 1520-6.

Mor A., Philips MR., 2006. Compartmentalized Ras/MAPK signaling. *Annu Rev Immunol*, **24**:771-800.

N

Neibergs HL., Hein DW., Spratt JS., 2002. Genetic profiling of colon cancer. *JSurgOncol.*, Vol 80:204—13.

Normanno, N., et al., 2009. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol.*, 6(9): p. 519-27

O

Olschwang S., 2001. Les polyposes intestinales: aspects génétiques. *Gastroenterol Clin Biol* 25:B26—B30.

P

Peyssonnaud.C., Eychene.A., 2001. the Raf/MEK/REK/ pathway :new concept of activation.

Biology of the cell.,volume 93,1-2.pp:53-62.

R

Radinsky R., et al., 1995. Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. Clin CancerRes,.**1**(1): p. 19-31.

Raponi M.,Winkler H., Dracopoli NC. 2008.KRAS mutations predict response to EGFR inhibitors. Curr Opin Pharmacol, vol 8 p 413—8.

Rivera F., Vega-Villegas ME., Lopez-Brea MF., Marquez R., 2008.Currentsituation of panitumumab, matuzumab, nimotuzumab and zalutumumab. Acta Oncol;**47**:9—19.

Rouleau E.,Spyratos F., Dieumegard B., Guinebretière JM., Lidereau R., Bièche I., 2008. KRAS mutation status in colorectal cancer to predict response to EGFR targeted therapies: the need for a more precise definition. Br J Cancer; **99**:2100.

S

Sobrero AF., Maurel J., Fehrenbacher L., et al., 2008. EPIC: Phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. J Clin Oncol., **26**:2311-2319.

Sina D., Ayan Banerjea., 2006.Colorectal cancer :early diagnosis and predisposing causes. Surgery; **24** : 131-136.

Shia J.,Ellis NA, Paty PB, Nash GM, Qin J, Offit K, et al., 2003. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. Am J SurgPathol .,**27**:1407—17.

Sylviane OLSCHWANG., 2009. Cancerodigest.,Vol. 1 N° 1 - 2009 - 7-16

T

Thomann G., 2007. Thèse en robotique chirurgicale. Institute national des sciences appliqués de

Lyon.

V

Vincenzi B., Schiavon G., Silletta M., Santini D., Tonini G., 2008. The biological properties of cetuximab. *Crit Rev Oncol Hematol*;68:93—106.

Valérie BOIGE., David MALKA., Julien TAI "EB., Jean-Pierre PIGNON., Michel DUCREUX., 2004. *Gastroenterol Clin Biol*, 28:21-32.

Viguiier J., Bourlier P., Karsenti D., de Calan L et Danquechin Dorval E., 2003. Cancer du côlon. *Encycl Méd Chir. Editions Scientifiques et Médicales Elsevier SAS Paris Gastro-entérologie.*, 9-068-A-10, 18 p.

Van Cutsem E., Nowacki M., Lang I., et al., 2007. Randomized phase III study of irinotecan and 5-FU/FA with or without cetuximab in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (mCRC): ;The CRYSTAL trial. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts).*, 25:4000.

Van Cutsem E., Peeters M., Siena S., et al., 2007. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.*, 25:1658-1664.

W

Waterhouse J., Muir C., Shannugaratnam. K., 2007. Cancer incidence in five continents. IARC scientific publications. Vol, IX Lyon.

Y

Yan J., Roy S., Apolloni A., et al. 1998. Ras isoforms vary in their ability to activate Raf-1 and phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 273:24052-24056,

Z

Zhang BH ., Guan KL., 2000. Activation of B-Raf kinase requires phosphorylation of the conserved residues Thr598 and Ser601. *Embo J* 19, p 5429-5439,

