

MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Pour obtenir :

**Le diplôme de Master Sciences et Techniques
Spécialité : Biotechnologie microbienne**

Les gènes impliqués dans le cancer colorectal

**Présenté par :
Mme LAZAAR ASMAE**

Soutenu le 27 juin 2011

Devant les membres du jury:

- **Pr BENNIS Sanae (CHU HASSAN II): Encadrante**
- **Pr HAGGOURD Abdellatif (FSTF): Encadrant**
- **Pr OLDIM Karim (CHU HASSAN II): Examineur**
- **Pr IRAQUI Mohammed (FSTF): Examineur**

Année universitaire : 2010/2011

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 et son soutien, pour le bon déroulement de ce travail.

vec lesquelles j'ai tout partagé :

A MES TRES CHERS PARENTS :

En témoignage de mon amour, mon affection et ma grande reconnaissance pour tous les sacrifices qu'ils ont consentis pour mon éducation sur le plan culturel et affectif. Je leur présente mon travail si modeste, mais qui sera certes un premier pas pour leur rendre hommage et les remercier pour leurs grands efforts accomplis à mon égard. Sans votre présence dans ma vie, sans votre soutien inestimable, sans votre dévouement incomparable, je n'aurais réalisé mes ambitions, je n'aurais existé.

A MON TRES CHER MARI :

Qui ma fortement soutenu tout au long de mon travail de prés et de loin ; qui a contribué avec ses encouragements et sa confiance, à embellir chaque étape de décision prise ces six mois durant, sans relâche. Je lui dédie ce travail en guise de merci qui émane d'un cœur dévoué.

A MON CHER FRERE ET MES CHERES SŒURS :

MOHAMMED, KHADIJA et la petite NOUHA ; Vous qui êtes à mes cotés, pour partager mes joies et m'épauler en cas de détresse. Que la vie de chacun de vous soit souriante, douce et généreuse. Je vous souhaite une félicité éternelle.

A MES CHERS AMIS :

Pour les merveilleux moments qu'on a passé ensemble, notre travail et nos amusements. Vous comptez beaucoup pour moi.

Remerciements

Tout d'abord, louange à « Allah » qui m'a guidé sur le droit chemin tout au long du travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.

Au terme de ce travail, je remercie **Monsieur IRAQUI M.H.**, responsable du Master Biotechnologie Microbienne, pour son orientation, sa supervision, qui me fait un immense honneur en acceptant de participer à l'évaluation de mon travail.

J'adresse mes plus sincères remerciements à **MADAME LE PROFESSEUR BENNIS SANAE** pour la gentillesse et la spontanéité avec lesquelles vous avez bien voulu diriger ce travail. J'ai eu le grand plaisir de travailler sous votre direction, et ai trouvé auprès de vous le conseiller et le guide.

J'adresse mes plus vifs remerciements à mon encadrant, **MONSIEUR LE PROFESSEUR ABDELLATIF HAGGOU** d'avoir accepté d'encadrer ce travail votre compétence et vos qualités humaines exemplaires ont toujours suscité mon admiration.

Je tiens à remercier également **MONSIEUR LE PROFESSEUR OULDIM KARIM**, pour leur gentillesse et sympathie. Votre dynamisme, votre rigueur et vos qualités humaines et professionnels ont suscité en moi une grande admiration et un profond respect.

Mes remerciements s'adressent encore à **Monsieur IRAQUI M.H.** Que vous acceptiez de siéger parmi cet honorable jury est pour moi un grand honneur. J'ai toujours admiré vos qualités humaines et professionnelles ainsi que votre modestie qui restent exemplaires.

Et je remercie tous les doctorantes **AMAL, KAWTAR, MERIEM et ZINEB**, les médecins et les techniciens de l'UGMO pour leur sympathie, leur

aide, et pour les moments passés ensemble. A tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin à réaliser ce travail, je dis merci !

Je voudrais remercier aussi mes amis **RHIZLANE, ZINEB, IHSSANE, ASMAE, OUMAIMA** pour leur aide, leur compréhension, leur soutien et les agréables moments que nous avons passés ensemble.

Sommaire

Liste des figures	6
Liste des tableaux	8
Liste des abréviations	9
Présentations de l'unité génétique médicale et d'oncogénétique	11
Introduction	12
Etude bibliographique	14
I- Epidémiologie du cancer du colon.....	15
II- Facteurs de risques	16
1) Facteurs d'environnement.....	18
2) Facteurs héréditaires.....	19
III- Rappel anatomique.....	20
IV- Types de tumeurs colorectales.....	21
V- Classification des cancers coliques	23
VI- Génétique du cancer colorectal.....	25
1) Les gènes cibles dans le cancer colorectal.....	25
2) Les différentes anomalies génétiques touchant ces gènes.....	25
3) Formes héréditaires du cancer colorectal	28
4) Le cancer colorectal sporadique	31

VII- Prévention et traitement du cancer colorectal	40
1) Prévention	40
2) Traitement	41
3) L'intérêt des techniques de la biologie moléculaire dans le diagnostic du CCR	46
Matériel et méthodes	
	48
I- Matériel utilisé	49
II- Méthodes	49
1) Biopsie	49
2) Examen histologique sur tissu fixé	50
3) Immunohistochimie	56
Etude moléculaire	
	58
4) Extraction d'ADN à partir de tissus tumoraux	58
5) Test qualité de l'ADN	59
6) Amplification de l'ADN extrait par PCR	60
7) Séquençage des produits PCR des gènes BRAF et KRAS	65
8) L'analyse des fragments des MSI	69
Résultats et discussion	
	70
I-Etude statistique	71
II- Etude immunohistochimique	75
III- Etude moléculaire	78
Conclusion et perspectives	
	88
Références bibliographiques	
	89
Annexes	
	95
Glossiare	
	99

Listes des figures

Figure 1 : Le processus multiétapes du cancer

Figure 2 : L'anatomie du colon

Figure 3 : Répartition des différents types de cancers colorectaux

Figure 4 : Modèle de cancérogenèse colorectale

Figure 5 : Localisation chromosomique du gène K-ras sur le chromosome 12

Figure 6 : Localisation chromosomique du gène B-raf sur le chromosome 7

Figure 7 : Voie de signalisation simplifiées des MAP Kinases et PI3K/PTEN/AKT

Figure 8 : Principe de l'instabilité des microsatellites.

Figure 9 : Mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR

Figure 10 : Schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne

Figure 11 : Biopsie sous forme de plusieurs fragments

Figure 12 : Coloplastie

Figure 13 : Inclusion des fragments dans les cassettes

Figure 14 : Histokinette

Figure 15 : Enrobage dans la paraffine

Figure 16 : Microtomie

Figure 17 : Lames montées et colorées

Figure 18 : Les différents composants d'une immunoréaction

Figure 19 : Schéma général du fonctionnement du RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

Figure 20 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance.

Figure 21 : répartition du CCR selon le sexe

Figure 22 : répartition du CCR selon le milieu de résidence (N= 42)

Figure 23 : localisation de la tumeur dans le colon

Figure 24 : adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation

Figure 25 : résultats d'immunohistochimie présentant une expression de la protéine MLH1

Figure 26 : résultat d'immunohistochimie présentant une extinction d'expression de la protéine MSH2 de tissu tumoral et expression de MSH2 de tissu sain grâce à la coloration du noyau du tissu sain et tumoral.

Figure 27 : résultat d'immunohistochimie présentant une extinction d'expression de la protéine MSH6 de tissu tumoral et expression de la protéine du tissu sain.

Figure 28 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 4% des produits PCR des gènes MMR (5 amorces)

Figure 29 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 4% des produits PCR des gènes MMR.

Figure 30 : Mise en évidence d'instabilité des microsatellites

Figure 31 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15

Figure 32 : séquençage direct de l'exon 15 du gène B-raf vérifié chez 5 patients (CURI Fès)

Figure 33 : Alignement entre le segment du gène BRAF amplifié par l'amorce BRAF-15R et le segment de référence dans les bases de données

Figure 34 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits du PCR du gène KRAS exon 2

Figure 35: Séquençage direct de l'exon 2 du gène KRAS (CURI Fès)

Figure 36 : Alignement entre le segment du gène KRAS amplifié par l'amorce KRAS 2-Bis+ et le segment de référence dans les bases de données.

Liste des tableaux

Tableau 1: Facteurs de risque impliqués dans la cancérogenèse colorectale

Tableau 2 : Classification TNM de l'Union internationale contre le cancer pour le cancer du côlon (cinquième édition).

Tableau 3 : Équivalence entre les différentes classifications utilisées dans le cancer colique.

Tableau 4 : Amorces utilisées pour le séquençage de l'exon 15 de BRAF

Tableau 5 : Composition du mix PCR pour l'amplification des gènes BRAF et KRAS

Tableau 6: Récapitulatif du programme du thermocycleur (Thermocycler- Programme)

Tableau 7 : Amorces utilisées pour le phénotypage RER

Tableau 8 : Programme du thermocycleur

Tableau 9 : Composition de mélange de réaction de séquence

Tableau 10 : DichloroRhodamines utilisées et le spectre d'émission maximum de ddNTP

Liste des abréviations

ADN	: Acide Désoxyribonucléique
CCR	: Cancer colorectal
PCR	: Polymerase Chain Reaction
MLH1	: human Mut L Homolog 1
MSH2 et MSH6	: human Mut s Homolog 2 et 6
MUTYH	: Mut Y Homolog
HNPCC	: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
MMR	: MisMatch Repair
MSI	: Microsatellite Instability
MSS	: Microsatellite Stable
BER	: Base Excision Repair
RER	: Replication Error
IGF	: Insulin growth Factor
EGFR	: Epidermal Growth Factor Receptor
IGFR	: Insulin-like Growth Factor Receptor
MICI	: Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales

LOH	: Loss Of Heterozygosity
MUTYH	: Mut Y Homologue
CIMP	: CpG Island Methylator Phenotype
PAF	: Polypose Adénomateuse Familiale
APC	: Adenomatous Polyposis Coli
IHC	: Immunohistochimie
Raf	: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
Pb	: Paire de base
dATP	: désoxy Adénine tri-phosphate
dCTP	: désoxy Cytosine tri-phosphate
dGTP	: désoxy Guanine tri-phosphate
dTTP	: désoxy thymine tri-phosphate
PBS	: Phosphate buffered saline
BET	: Bromure d’Ethidium
HES	: Hématoxyline Eosine Safran
EDTA	: Ethylène diamine tétra acétique
µl	: microlitre
ng	: nanogramme
sec	: seconde
min	: minute

Présentation de l’unité de génétique médicale et d’oncogénétique UGMO du CHU Hassan II

Notre stage s’est déroulé dans l’unité de génétique médicale et d’oncogénétique UGMO au sein du laboratoire central d’analyse médicales du centre hospitalier et universitaire CHU Hassan II de Fès.

L’unité de génétique médicale et d’oncogénétique, représente une première expérience dans un CHU au Maroc, après l’INH et l’institut Pasteur de Rabat, elle est activement mise en place depuis sa création en Mars 2009.

Elle est subdivisée en deux disciplines : la génétique médicale et l’oncogénétique.

La génétique médicale par les méthodes de cytogénétique permet la mise en évidence des anomalies chromosomiques.

L’oncogénétique est une nouvelle discipline, qui en association avec l’anatomie pathologique devient une méthode clé pour le diagnostic en cancérologie.

Ainsi la cytogénétique et la biologie moléculaire sont devenues des outils complémentaires et nécessaires pour le choix de traitement et pour une meilleure prise en charge des patients.

Les animations de l'unité comprennent des staffs hebdomadaires, des conférences et des formations continues.

INTRODUCTION

L'oncogénétique est une nouvelle discipline qui étudie l'origine génétique des tumeurs solides. Cette définition restrictive a aujourd'hui laissé place à une définition beaucoup plus large, puisqu'elle parle de l'étude des anomalies génétiques des cancers. Cette discipline est ainsi née durant ces vingt dernières années et liée aux progrès de la biologie moléculaire. Il est aujourd'hui admis que le développement d'une tumeur résulte de l'altération des processus de contrôle de la croissance, de l'organisation et de la mort cellulaire. Cette altération des mécanismes cellulaires normaux est le résultat de l'acquisition de mutations dans trois types principaux de gènes :

- les proto-oncogènes, qui codent pour des protéines qui interviennent le plus souvent, dans les voies de signalisation régulant le cycle cellulaire. Après mutation, ces proto-oncogènes deviennent des oncogènes dominants.
- les gènes suppresseurs de tumeurs : sont impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et aussi dans l'adhésion cellulaire.
- les gènes codant pour des enzymes impliqués dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dont les mutations provoquent une instabilité du génome à l'origine du développement des tumeurs.

Le cancer colorectal occupe le deuxième rang des cancers dans le monde avec une probabilité d'être atteint de CCR au cours de la vie de 5% [1]. Ils représentent 25% des cancers digestifs avec un risque élevé dans les familles atteintes de cancers à transmission héréditaire. Au Maroc l'incidence est mal connue vu l'absence d'un registre national, cependant il y a des registres régionaux : registre des cancers de Rabat, registre du Casablanca. En oncogénétique, les outils moléculaires dans le diagnostic précoce du cancer colorectal représentent une méthode clé dans le diagnostic et l'évaluation de la prédisposition héréditaire dans les familles à haut risque.

Ces outils moléculaires qui se développent très rapidement à l'heure actuelle sont généralement effectués à partir de l'ADN extrait de matériel tissulaire et étudié ensuite « en tube » sans repère morphologique. De plus ils sont souvent effectués au sein de plateformes de biologie moléculaire lourdes, car elles nécessitent un équipement de plus en plus onéreux et un personnel très qualifié, biologistes moléculaires, ingénieurs, bio-informaticiens, etc.

Vu l'intérêt des outils moléculaires en diagnostic des tumeurs et en particulier le cancer colorectal, l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique (UGMO) du centre Hospitalier et universitaire CHU Hassan II, a tracé parmi ses principaux objectifs, la mise en place de la

plateforme nécessaire pour le diagnostic des maladies cancéreuses dans le but de garantir aux patients une meilleure prise en charge et un bon pronostic.

Ce présent travail consistera d'abord en une étude immunohistochimique pour l'étude de l'expression tissulaire des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN, et par la suite l'application de biologie moléculaire pour l'analyse du matériel génomique (à partir de sang et de tissus tumoraux) de patients atteints de cancer colorectal (extraction d'ADN génomique, PCR, séquençage des régions d'intérêt). En effet, on sera amené à amplifier les gènes *BRAF* et *KRAS* qui seront alors séquencés en vue de mettre en évidence la présence ou non de la mutation caractéristique de ces gènes, et par la suite la mise au point de la PCR des gènes de réparation des mésappariements a fin de déterminer l'instabilité microsatellitaire responsable du cancer colorectal sporadique.

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

Le cancer colorectal

Le cancer colorectal représente un problème majeur de santé publique. C'est le cancer le plus fréquent en France, et il représente près de 15% de l'ensemble des cancers. On estime à 33 500 le nombre de nouveaux cas de cancer colorectal par an, dont 22 000 cas environ de cancers du colon (Réseau FRANCIM). L'incidence augmente régulièrement mais de façon modérée (3 à 5% par an). Il existe une prédominance masculine, mais qui est cependant moins marquée que pour le cancer du rectum. La fréquence augmente régulièrement avec l'âge ; l'âge moyen au moment du diagnostic étant de 70 ans environ. Le majeur des cancers du colon se développent à partir d'un polype adénomateux. La survie relative (décès dus au cancer) des patients atteints de cancers colorectaux est de 53% à 5 ans, tous stades confondus. Pendant les deux dernières décennies, le pronostic des cancers colorectaux s'est amélioré en raison du diagnostic plus précoce et de la réduction de la mortalité opératoire. D'importants progrès ont été réalisés ces dernières années, dans des domaines aussi variés que la génétique moléculaire, le dépistage, la prise en charge médicochirurgicale et la chimiothérapie.

I-Epidémiologie du cancer du colon :

Le cancer du colon se développe à partir de la muqueuse du (gros intestin) ou colon. Dans 70% des cas, la tumeur se développe dans le sigmoïde (boucle située dans la fosse iliaque gauche). Les cancers du colon et du rectum étant assez semblables, on les regroupe sous le terme de cancer colorectal.

C'est le second cancer, en termes de fréquence, chez la femme (après le cancer du sein) et le troisième chez l'homme (après le cancer du poumon et celui de la prostate). (Fédération nationale des centres de lutte contre le cancer, 2009).

Le cancer colorectal est le quatrième cancer dans le monde. Les cancers de l'intestin (côlon et rectum) sont la troisième cause de mortalité au Maroc derrière les cancers du sein et du poumon. C'est ce qu'a expliqué le 9 octobre à Casablanca, Dr Mounir Bachouchi, cancérologue au Centre d'oncologie Al-Azhar de Rabat et membre de la Société Marocaine de Cancérologie. Au Maroc l'incidence est mal connue vu l'absence d'un registre national, cependant il y a des registres régionaux dont on citera le registre des cancers de Rabat, registre de cancer du Casablanca.

D'après le registre des cancers de Rabat pour l'année 2005, le cancer du colon à Rabat est relativement peu fréquent. Son incidence est proche des incidences retrouvées par les autres registres de cancer au Maghreb (excepté en Lybie) et reste très inférieure aux incidences observées dans les pays occidentaux, au Japon ou en Chine (Registre des cancers de Rabat, 2005)

Alors que dans la région du grand Casablanca, l'incidence du cancer colorectal est de 5,3 nouveaux cas/100000 habitants, à savoir 192 cas enregistrés en 2004. La moyenne d'âge étant de 56 ans avec des cas extrêmes de 17-83 ans. La répartition par sexe du cancer colorectal est de 51% femmes et 49% hommes. (Registre des cancers de la région du grand Casablanca, 2007).

En France, il est au premier rang des cancers pour les deux sexes, avec 33 500 nouveaux cas par an (16)

L'incidence la plus faible (<10 pour 10 000 habitants) est observée dans les pays en voie de développement d'Asie et d'Afrique. L'incidence la plus élevée est observée en Amérique du Nord, en Australie et en Nouvelle-Zélande (30-50 pour 10 000 habitants).

L'incidence du cancer du colon au sein des populations qui émigrent d'un pays à faible incidence vers un pays à forte incidence rejoint celle du pays d'accueil en une génération, ce qui témoigne de l'intervention de facteurs d'environnement. La probabilité d'être atteint d'un cancer colorectal au cours de la vie est de 5% [2].

Le cancer colique est rare avant 50 ans (6% des cas). L'incidence augmente ensuite rapidement avec l'âge. La proportion de cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes. L'âge moyen au diagnostic est de 69 ans chez l'homme et 72ans chez la femme.

L'augmentation de l'incidence du cancer colique pourrait être liée au vieillissement de la population. [3]

II-Facteurs de risque :

Tous les cancers sont causés par des mutations de gènes qui contrôlent des aspects de la biologie cellulaire comme la multiplication et la différenciation cellulaires.

Les tests moléculaires en cancérologie, consistent à analyser les gènes de la personne atteinte, qui prédisent partiellement le futur de celle-ci, et les gènes de la tumeur, qui prédisent partiellement le futur de la tumeur.

Le cancer est l'émergence d'un clone cellulaire qui prolifère, envahit, et métastase malgré les différents niveaux de contrôle de l'organisme. Ceci n'est possible que par l'accumulation de nombreuses anomalies génétiques. [100]

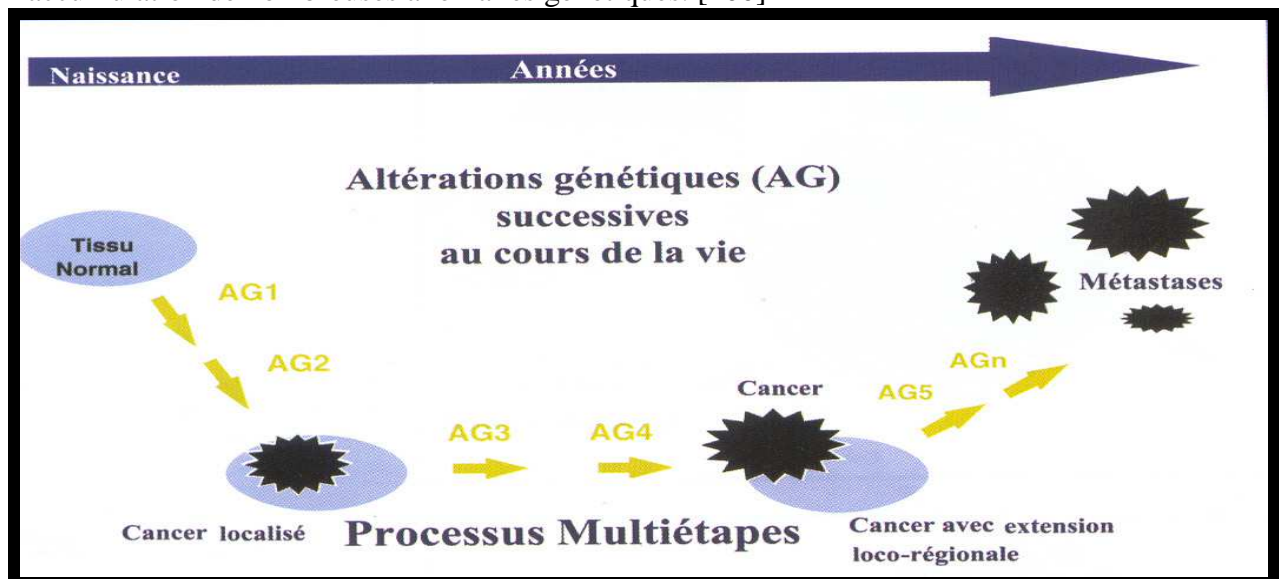


Figure 1 : le processus multiétapes du cancer

Plusieurs gènes présentent une expression altérée dans les cellules tumorales. [101]. Les altérations peuvent être :

- des mutations.

- Des translocations.
- Divers réarrangements chromosomiques.
- Des délétions.
- Des amplifications géniques.
- Des pertes ou gains de chromosomes entiers.
- Des mécanismes épigénétiques (Méthylation de l'ADN).

- Les cellules cancéreuses :

Les cellules cancéreuses résultent de plusieurs altérations géniques successives. Les caractéristiques des cellules cancéreuses sont essentiellement :

- Capacité de croissance.
- Insensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaires.
- Echappement à l'apoptose.
- Capacité de se diviser de façon illimitée.
- Capacité d'induire une néo-angiogenèse.
- Capacité d'invasion et de métastases.
- Modifications cytologiques.

Les facteurs de risques impliqués dans le cancer colorectal sont :

1) Facteurs d'environnement :

Les différents facteurs de risque impliqués dans la cancérogenèse colorectale figurent dans le tableau ci-dessous [4]:

Tableau 1: Facteurs de risque impliqués dans la cancérogenèse colorectale [4]	
Facteurs associés à une augmentation de risque de tumeur colorectale	Facteurs associés à une diminution du risque de tumeur colorectale
Excès calorique, obésité, sédentarité	Légumes, en particulier crucifères (choux, navets, brocolis)
Repas fréquent, grignotage	Fibres (surtout les fibres des légumes et les son de blé ¹)
Viandes grasses : charcuterie, mouton, abats	Calcium et produits laitiers fermentés
Céréales raffinées	Vitamines antioxydantes
Fer	Folates
Alcool et tabac	Café

1 : l'effet protecteur des fibres semble s'exercer sur la transformation de l'adénome en cancer.

1.1 Facteurs associés à une augmentation de risque de tumeur colorectale :

a) Calories, obésité, sédentarité :

Un apport calorique élevé, une obésité de type androïde ainsi que la sédentarité sont associés à un risque augmenté d'adénome ou de cancer colique [5].

b) Hydrates de carbone :

Plusieurs études ont retrouvé une association positive avec une relation dose-effet, entre la consommation de sucres et le risque de cancer colorectal [6].

c) Graisses, viandes et protéines :

La majorité des études ne retrouvent aucun lien significatif entre consommation de lipides saturés et risque de cancer colorectal [7, 8, 9]. Les lipides polyinsaturés pourraient même avoir un rôle protecteur. La consommation de protéines apparaît liée à une augmentation du risque de cancer colorectal. Les données concernant la consommation de viande sont discordantes, le risque étant plutôt lié à une consommation excessive de viande rouge (>133g/jour) [8, 9]. Ce rôle a été constaté en Amérique du Nord et en Australie, où la teneur en graisse de la viande est beaucoup plus élevée qu'en Europe de l'Ouest. La charcuterie, riche en graisse et conservée à l'aide de nitrites dont les dérivés sont mutagènes, possède un rôle potentiellement néfaste [8]. La cuisson des protéines est source d'amines hétérocycliques carcinogènes.

d) Alcool et tabac :

La consommation d'alcool est associée à un risque relatif de 1,2 de cancer colorectal dès 40g/jour [10]. La bière est la boisson qui augmente le plus ce risque. L'alcool interviendrait sur l'étape précoce de promotion du cancer qu'est la croissance de l'adénome.

1.2 Facteurs associés à une diminution du risque de tumeur colorectale :

A) Fibres alimentaires et végétaux :

Le rôle protecteur des fibres alimentaires a été soupçonné devant les différences géographiques. Le risque relatif est proche de 0,5 pour les sujets consommant plus de 27g de fibres par jour [11]. Cet effet prédomine chez les gros consommateurs de graisse, et ne concernerait que certains types de fibres. Le rôle protecteur de la consommation de légumes serait lié à leur teneur en vitamines et composants oxydants comme les indoles, en fibres alimentaires, en phytates. Les agrumes, les pommes, les melons, les crucifères (choux, brocolis), les légumes verts consommés crus et les oignons sont les plus fréquemment cités.

B) Calcium, sélénium et vitamines :

Le calcium et la vitamine D possèdent un effet protecteur modéré sur le risque de cancer colorectal, noté principalement en cas d'apport préalable faible [12]. Quelques études ont suggéré un rôle protecteur des vitamines A, C, E, du β -carotène et des minéraux (sélénium) à effet antioxydant vis-à-vis du cancer colorectal.

2) Facteurs héréditaires :

Dans environ 5 % des cas, le cancer colique survient dans un contexte de maladies héréditaires prédisposant au cancer colique, à transmission autosomique dominante et à pénétrance élevée. Un âge inférieur à 50 ans lors du diagnostic, des antécédents tumoraux personnels, une agrégation familiale de cancers, doivent faire évoquer une prédisposition familiale et reconstituer l'arbre généalogique du sujet. La polypose adénomateuse familiale et le syndrome de Lynch ou HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) sont les deux maladies associées aux gènes majeurs de susceptibilité du cancer colorectal actuellement identifiés [13].

-Polypose adénomateuse familiale : c'est la maladie pré cancéreuse à partir de laquelle se développe le cancer.

-le syndrome de Lynch ou HNPCC : survient vers 40 à 50 ans, atteint plus souvent le colon droit, et est souvent de type mucineux, peu différencié, avec une réaction stromale très inflammatoire

-En dehors des colites inflammatoires, il s'agit des sujets aux antécédents personnels et familiaux d'adénome et d'adénocarcinome colorectaux.

III. Rappel anatomique :

Le colon, aussi appelé " gros intestin", court du caecum jusqu'au rectum et constitue la partie terminale de l'intestin, appartenant à l'appareil digestif, se terminant au niveau du rectum. Il se dispose en cadre dans la cavité abdominale et mesure de 1m à 1,5m avec un diamètre de 8 cm (caecum) à 4 cm (rectum)[14]. La paroi du colon comprend de la lumière du tube à l'extérieur, un épithélium de revêtement vascularisé et innervé, un tissu conjonctif contenant des glandes exocrines, des fibres musculaires lisses et une mince couche conjonctive dans la quelle circulent les vaisseaux et les nerfs.

La division du cadre colique se fait en deux portions définies par leur vascularisation. Le côlon droit (cæcum, côlon ascendant, angle colique droit et deux tiers droits du côlon transverse) dépend des vaisseaux mésentériques supérieurs, et le côlon gauche (tiers gauche du côlon transverse, angle colique gauche, côlons descendant, iliaque et sigmoïde) dépend des vaisseaux mésentériques inférieurs.

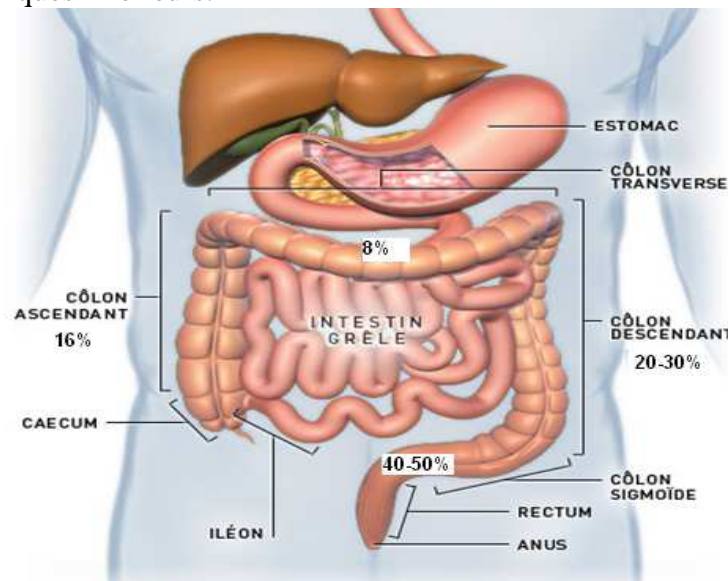


Figure 2 : l'anatomie du colon

VI. Types de tumeurs colorectales :

Le colon et le rectum contiennent différents types de cellules qui peuvent, chacun, être à l'origine d'une forme de cancer spécifique. [15]

Dans la plupart des cas, les cancers colorectaux se développent à partir des glandes qui tapissent l'intérieur de la paroi du colon et du rectum. Cette forme de cancer est appelée adénocarcinome. L'adénocarcinome survient sur un polype préexistant (adénome).

1-De l'adénome vers le cancer :

a) 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 2cm; 30% si supérieure à 2cm. 25 à 30% des adénomes se transforment en cancer.

b) 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.

c) Le cancer invasif :

Lorsque les cellules tumorales dépassent la muqueuse musculaire et envahissent la sous-muqueuse (présence de canaux lymphatiques), le cancer est dit invasif.

2-Histoire naturelle du cancer invasif :

• Evolution morphologique intraluminale :

Le cancer est d'abord de type végétant puis en grossissant et du fait des traumatismes répétés, il perd sa partie centrale et devient ulcéré, enfin, il progresse en profondeur et devient infiltrant.

• L'extension tumorale locale :

a) Extension circonférentielle:

Par épithéliotropisme (en surface) et par voie lymphatique, à cheminement circulaire, le cancer s'étend circonférentiellement pour réaliser à l'extrême une forme sténosante dont la complication clinique est l'occlusion.

b) Extension en profondeur:

Depuis la surface épithéliale, le cancer infiltre progressivement la paroi digestive puis la séreuse (sauf au niveau du rectum où il n'y en a pas), puis l'atmosphère péricolique ou périrectale et les organes adjacents. Cette extension suit la direction d'un rayon (le centre de la roue étant le centre de la lumière digestive), elle est dite extension radiaire.

c) Extension longitudinale:

Dans la paroi digestive, l'extension microscopique déborde rarement de plus de 1cm la tumeur macroscopique en amont et en aval à l'extérieur de la paroi digestive, en particulier dans la graisse péri-rectale, elle peut dépasser 2cm en aval et plus surtout en cas de cancer peu différencié.

d) Extension extradigestive

Peut être continue ou discontinue de façon embolique dans la graisse péri-digestive, en empruntant les lymphatiques, les veines ou les espaces périnerveux.

• **L'extension ganglionnaire :**

Elle est ordonnée. Dans moins de 3% des cas, les cellules sautent un relais ganglionnaire. Le Risque d'extension ganglionnaire augmente avec le degré d'infiltration tumorale en Profondeur.

• **L'extension à distance ou métastatique :**

- péritonéale: les tumeurs coliques ou rectales suspéritonéales peuvent métastaser au Péritoine lorsqu'elles ont franchi la séreuse péritonéale, soit de façon contiguë, soit de Façon discontiguë, à distance dans la grande cavité abdominale.
- hépatique: les cellules tumorales empruntent les veines de drainage qui pour l'essentiel drainent dans la veine porte. Elles peuvent s'arrêter, se développer dans le foie et donner des métastases.
- pulmonaire: les cellules y arrivent en empruntant les veines iliaques puis la veine cave inférieure, cas du bas rectum, ou après avoir franchi le filtre hépatique. [16]

D'autres types de tumeurs cancéreuses peuvent survenir mais elles sont beaucoup plus rares : tumeurs carcinoïdes (se développant à partir de cellules nerveuses digestives, qui sécrètent des hormones ou des neurotransmetteurs), sarcomes (regroupant différents types de tumeurs qui se développent à partir des os ou des tissus mous qui relient, soutiennent et entourent tous les organes du corps), lymphomes (se développant dans les organes lymphoïdes et notamment dans les ganglions lymphatiques).

Enfin, le colon et le rectum peuvent être envahis par des métastases issues de cancers situés dans l'ovaire, la prostate, l'estomac ou le sein.

V. Classification des cancers coliques :

• **Classification de Dukes :**

Proposée par Dukes en 1932 pour les cancers du rectum [17], elle différencie les tumeurs limitées à la paroi (stade A), étendues au-delà mais sans envahissement ganglionnaire (stade B) ou avec envahissement ganglionnaire quel que soit l'envahissement pariétal (stade C). Cependant, le stade B est hétérogène dans le degré d'extension péricolique, et le stade C ne tient compte ni du nombre ni du siège des ganglions envahis.

• **Classification d'Astler-Coller :**

Proposée en 1954, elle différencie les cancers limités à la muqueuse (stade A), s'étendant à la musculature mais limités à la paroi, sans (stade B1) ou avec extension ganglionnaire lymphatique (stade C1), et les cancers atteignant le tissu péricolique, sans (stade B2) ou avec extension ganglionnaire (stade C2) [18]. Cette classification permet de mieux séparer les cas relevant ou non d'un traitement adjuvant.

- **Classification de Gundersen et Sosin :**

Elle différencie les tumeurs étendues aux structures de voisinage par extension directe, sans (stade B3) ou avec (stade C3) extension ganglionnaire, dont l'exérèse à visée curative est possible dans le même geste chirurgical, des stades D métastatiques.

- **Classification TNM et en stades :**

La classification internationale TNM (tumeur maligne [T], atteinte de ganglions [N : nodes], et présence de métastases [M]) de l'UICC est la meilleure classification histopronostique, car elle distingue de façon indépendante cinq stades d'envahissement pariétal et trois stades d'extension ganglionnaire [19] (tableau 2). En fonction de l'envahissement locorégional, de l'extension ganglionnaire et de la présence de métastases est attribué un stade TNM. Les équivalences entre les différentes classifications sont mentionnées dans le (tableau 3).

Tableau 2 : Classification TNM de l'Union internationale contre le cancer pour le cancer du côlon (cinquième édition). [19]

Tumeur primitive (T)	
Tis	Carcinome in situ : tumeur intraépithéliale ou envahissant la lamina propria (intramuqueuse) sans extension à la sous-muqueuse à travers la muscularis mucosae
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse sans la dépasser
T2	Tumeur envahissant la musculuse sans la dépasser
T3	Tumeur envahissant à travers la sous-muqueuse la sous-séreuse sans atteindre le revêtement mésothélial et le tissu péricolique non péritonéalisé
T4	Tumeur perforant le péritoine viscéral et/ou envahissant les organes de voisinage
Ganglions régionaux (N)	
N0	Absence de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase dans un à trois ganglions lymphatiques régionaux
N2	Métastase dans quatre ou plus ganglions lymphatiques régionaux
Nx	Statut ganglionnaire non évaluable
Métastases (M)	
M0	Absence de métastase
M1	Présence de métastases (l'atteinte des ganglions iliaques externes ou iliaques communs est considérée comme M1)
Mx	Statut métastatique inconnu

Tableau 3 : Équivalence entre les différentes classifications utilisées dans le cancer colique. [19]

Stade	TNM			Dukes	Astler et Coller	Gun-derson et Sosin
Stade 0	Tis	N0	M0	A	A	A
Stade I	T1	N0	M0	A	A	A
	T2	N0	M0	A	B1	B1
Stade II	T3	N0	M0	B	B2	B2
	T4	N0	M0	B	B2	B3
Stade III	T1-T2	N1-N2	M0	C	C1	C1
	T3	N1-N2	M0	C	C2	C2
	T4	N1-N2	M0	C	C2	C3
Stade IV	Tout T	Tout N	M1	(D)	(D)	D

VI. Génétiques du cancer colorectal :

1 - Les gènes cibles dans le cancer colorectal :

Dans le cancer, les gènes touchés par des anomalies, ou des gènes cibles, sont des gènes impliqués dans :

- La régulation positive et négative de la prolifération cellulaire
- La régulation de la différenciation et de la sénescence cellulaire
- La régulation de l'apoptose
- Le contrôle du maintien de l'intégrité du génome : mécanisme de réparation de l'ADN, checkpoints et surveillance du déroulement de la réplication et de la ségrégation des chromosomes au cours de la mitose.

Globalement, ils sont regroupés dans trois catégories : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs, et les gènes de réparation des mésappariements ou gènes MMR. [20].

- **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. Le plus impliqué dans le CCR est KRAS 2 le gène (K-ras).

-**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).

-**les gènes MMR (Mis-Match Repair)** : représentent les six gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariement ; on cite h MLH1 (human mutL, homolog = gène homologue au mutL isolé chez *Escherichia coli*), h MSH2 (human mutS homolog = gène homologue au mutS isolé chez *Escherichia coli*), h PMS1, h PMS2, h MSH6, h MSH3 et h MLH3 [21].

2 - les différentes anomalies génétiques touchant ces gènes :

Les types d'anomalies touchant ces gènes cibles sont nombreux. Schématiquement, on peut distinguer trois grands types d'anomalies : anomalies chromosomiques, nucléotidiques et épigénétiques.

- Les anomalies chromosomiques :

Les anomalies chromosomiques touchent le nombre de chromosomes de la cellule, sa quantité d'ADN, ou touchent de gros fragments de chromosomes donc un très grand nombre de gènes en même temps. Dans le premier cas, on aura une aneuploïdie ou une polyploïdie. Dans le second cas il s'agit, soit d'une délétion le plus souvent (perte allélique), soit d'une amplification. Lorsqu'il y a délétion d'un bras chromosomique dans les cellules tumorales, on parle de perte d'hétérozygotie (par rapport au tissu normal) ou LOH pour Loss Of Heterozygosity.

Les segments les plus fréquemment perdus dans les CCR sont : le bras long du chromosome 5 (5q, contenant APC), le bras court du 17 (17p, contenant p53), le bras long du 18 (18q, contenant DCC). [22].

- Les anomalies nucléotidiques :

Les anomalies nucléotidiques touchent la séquence d'un gène en particulier. Globalement, ce sont des mutations ponctuelles (modification d'une paire de bases), de courtes délétions ou insertions. Elles peuvent entraîner un gain de fonction (pour les oncogènes) ou une perte de fonction (pour les gènes suppresseurs).

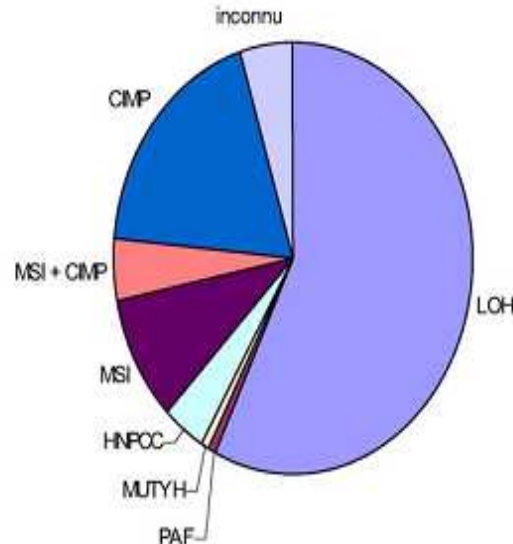
- Les anomalies épigénétiques :

N'altèrent pas la séquence codante du gène mais sa transcription. Ainsi, la méthylation du promoteur d'un gène bloque sa transcription, le rendant inactif. Il existe une méthylation physiologique, notamment liée à l'âge, et une méthylation pathologique, spécifique du cancer. [22]

En plus de ces anomalies, on retrouve des instabilités générant le développement du cancer, comme l'instabilité microsatellitaire.

-Les Instabilités :

L'accumulation de nombreuses mutations dans une même cellule ne peut se faire que par l'atteinte de la stabilité du patrimoine génétique de la cellule. Il existe différents types d'instabilités, auxquels correspondent différentes voies de carcinogenèse colorectale, permettant d'individualiser différents groupes de tumeurs (Fig. 3).



LOH :	Perte d'hétérozygotie
PAF:	Polypose adénomateuse familiale
MUTHY:	Mutation du gène MutY homologue
HNPCC:	Cancer colorectal non polyposis Hériditaire
MSI:	Instabilité des microsatellites
CIMP:	Phénotype méthylateur island de CpG

Figure3 : Répartition des différents types de cancers colorectaux. [23, 24]

-L'instabilité chromosomique : est la voie la plus fréquente dans le CCR (80 % des tumeurs sporadiques). Elle correspond au phénotype CIN pour chromosomal instability, ou aux cancers LOH. Elle entraîne des anomalies de nombre des chromosomes et des pertes alléliques fréquentes [23, 24]. Dans ce groupe de tumeurs, 20 % des chromosomes en moyenne ont subi une délétion majeure. Par ailleurs, les pertes alléliques sont fréquemment associées à des mutations de TP53 ou d'APC conduisant à une inactivation des deux copies de ces gènes suppresseurs. Cette voie de cancérogenèse correspond à la voie impliquée dans la polypose adénomateuse familiale (PAF). Le ou les gènes responsables de cette instabilité chromosomique ne sont pas encore connus, mais il pourrait s'agir entre autres du gène APC, dont la protéine joue un rôle dans la ségrégation des chromosomes lors de la mitose [25, 26].

-L'instabilité nucléotidique : est due à l'inactivation d'un système de réparation de l'ADN. Les anomalies survenant de façon habituelle dans chaque cellule ne peuvent pas être réparées efficacement, les mutations sont donc très fréquentes dans ce type de tumeurs. Deux systèmes de réparation différents ont été impliqués dans la cancérogenèse colique.

Le premier est le système de réparation des mésappariements de bases (MMR). Les gènes impliqués dans ce système sont nombreux, ceux touchés dans la cancérogenèse colique sont essentiellement MLH1 et MSH2 (et hMSH6). Les anomalies initiales sont principalement des mutations de MLH1 ou MSH2 (dans les tumeurs héréditaires) ou une méthylation du promoteur de MLH1 (dans les tumeurs sporadiques). La déficience du système MMR est responsable de mutations fréquentes dans des séquences répétées de nucléotides, appelées microsatellites. Leur phénotype est appelé instabilité des microsatellites (MSI, anciennement appelé RER pour Replication Error) et les mutations touchent des gènes cibles contenant des microsatellites : le gène du récepteur de type II du TGF β , le gène suppresseur de tumeur BAX. Ce groupe de tumeurs correspond au syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) et à 15 % des tumeurs sporadiques [27–28].

Le deuxième est le système de réparation par excision de bases (BER). Le gène dont les mutations sont retrouvées dans le CCR est MUTYH (pour MutY Homologue ou MYH). La déficience du BER est responsable d'une sensibilité accrue aux lésions oxydatives, avec des mutations spécifiques. Elle n'est pour l'instant retrouvée que dans un type de cancer héréditaire (MAP, polypose associée à MYH), mais la découverte de son implication dans les CCR est récente [29, 30].

Enfin, L'instabilité épigénétique : concerne 20 à 30 % des tumeurs sporadiques. Cette voie de carcinogenèse intéresse les tumeurs de phénotype CIMP, pour CpG Island Methylator Phenotype. Celui-ci entraîne l'inactivation de nombreux gènes suppresseurs de tumeur par hyperméthylation de leurs promoteurs. Parmi les gènes suppresseurs inactivés, on rencontre fréquemment MLH1 (gène du MMR), dont l'inactivation entraîne un phénotype MSI : les deux groupes MSI et CIMP peuvent donc se chevaucher. Le ou les gènes responsables de ce phénotype CIMP ne sont pas encore connus [31–34].

3) Formes héréditaires du cancer colorectal :

Les cancers héréditaires posent un énorme problème de santé publique ; en effet, ce sont 10% des cancers qui auraient pour une origine une mutation génétique héréditaire.

Le diagnostic moléculaire de maladies génétiques offre la possibilité de recourir au dépistage génétique pour diagnostiquer les personnes atteintes de cancer et prévoir le risque de cancer chez les parents indemnes. [35].

Dans le cancer colorectal, deux maladies représentent des prédispositions majeures ; la polypose adénomateuse familiale PAF et le syndrome de Lynch HNPCC. [36] mais il existe d'autres types dont on va citer ici :

3.1) Polypose adénomateuse familiale PAF :

Responsable de près de 1 % des CCR, la PAF est une maladie héréditaire à transmission autosomique dominante. Affectant aussi bien l'homme que la femme, elle se caractérise par l'apparition, en général à la puberté, de centaines à milliers d'adénomes disséminés sur le côlon et le rectum [37].

Dans sa forme atténuée, l'apparition des adénomes coliques est plus tardive (vers l'âge de 30 à 40 ans), leur nombre plus limité (de quelques-uns à une centaine) et l'atteinte rectale exceptionnelle. Les adénomes dans la forme atténuée ont cependant un risque élevé de transformation maligne.

La PAF est due à une mutation germinale dans le gène suppresseur de tumeur APC (adenomatous polyposis coli) localisé sur le chromosome 5q21 [38, 39]. Le gène APC est composé de 8 535 paires de bases. Il est organisé en 21 exons et code une volumineuse protéine de 2843 acides aminés dans son isoforme classique [40]. À côté des mutations germinales d'APC à l'origine de la PAF, des mutations somatiques sont observées dans 60 à 80 % des tumeurs colorectales sporadiques [37].

La protéine APC a de multiples fonctions dans la cellule : elle est impliquée dans le contrôle de la voie de signalisation Wnt, dans l'adhésion cellulaire, la migration, l'apoptose et la ségrégation des chromosomes lors de la mitose [41]. L'inactivation de la protéine APC semble impliquée à la fois dans l'initiation tumorale (avantage de sélection via l'activation constitutive de la voie de signalisation Wnt) et dans la progression tumorale (augmentation du taux de mutations via l'instabilité chromosomique) [41].

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 [42].

(Le gène APC intervient à l'état normal dans la dégradation intracellulaire des caténines. Sa mutation entraîne l'accumulation de caténines dans le cytoplasme et le noyau des cellules.

Dans le noyau, elles forment un complexe avec le facteur de transcription Tcf qui va activer Des gènes de croissance et de prolifération cellulaire, c-Myc par exemple).

Le diagnostic génétique moléculaire intervient le plus souvent dans le diagnostic précoce de la maladie chez les membres de la famille à risque et dans la confirmation de la PAF lorsque les signes cliniques sont équivoques. [43]

- **Impact du dépistage moléculaire sur la prise en charge clinique :**

Les mutations d'APC surviennent tôt dans la cancérogénèse colorectale [44], le dépistage moléculaire des mutations du gène APC aux fins diagnostiques, s'il s'avère positif, favoriserait la détection et le traitement précoces de la PAF à savoir une sigmoidoscopie à intervalles réguliers avec colectomie préventive lorsque les polypes apparaissent.

Le diagnostic moléculaire de la PAF est utile quand le résultat est négatif en permettant aux non porteurs de se soustraire à la surveillance clinique et sigmoidoscopie.

3.2) Cancer colorectal non polyposique héréditaire HNPCC :

Le syndrome HNPCC (pour « Hereditary non polyposis colon cancer » ou syndrome de Lynch) est responsable de 3 à 5% des cancers colorectaux [45]. 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) [46,47].

Outre la prédisposition au CCR, le syndrome HNPCC expose au risque de survenue de tumeurs extra-coliques. Il est dû à des mutations germinales d'un des gènes impliqués dans la réparation des mésappariements survenant au cours de la réplication de l'ADN : hMLH1 (60 %), hMSH2 (35 %), hMSH6 (4-10 %), hPMS1 (< 1,5 %), hPMS2 (< 1,5 %) et hMLH3 (< 1,5 %) [48, 49].

L'inactivation d'un de ces gènes de réparation résulte dans une instabilité observée au niveau des loci de type microsatellites (séquences répétitives d'ADN) dans l'ADN tumoral. Cette instabilité (MIN ou MSI pour « microsatellite instability ») observée dans 80- 92 % des cancers de type HNPCC est par ailleurs retrouvée dans 15 % des CCR sporadiques [37]. Contrairement à la PAF, la fréquence des adénomes dans les syndromes HNPCC est comparable à celle dans la population générale.

- **Dépistage moléculaire du syndrome de Lynch :**

La coloration immunohistochimique (CIH) et l'analyse de l'instabilité des microsatellites sont deux techniques de dépistage préliminaire appliquées au tissu tumoral. La CIH pour déterminer l'expression de MLH1 et MSH2 représente une méthode rapide de dépistage préliminaire des tumeurs dans la recherche de mutations causales du syndrome de Lynch. [50].

Le dépistage génétique est une option importante dans la prise en charge clinique du syndrome. Il permet de réduire la morbidité et la mortalité chez les personnes à risque de HNPCC par le dépistage précoce et approfondi. [51]. S'agissant des porteurs de mutations reliées au HNPCC, la colectomie demeure la méthode la plus efficace pour réduire le risque de cancer colorectal.

3.3) Polypose associée à MUTYH (MAP) :

La polypose liée à une mutation du gène MYH est de connaissance plus récente. La particularité de cette prédisposition est sa transmission récessive, c'est-à-dire que les sujets atteints ont reçu un allèle muté de chacun de leurs parents et qu'un quart des enfants seront atteints. Il faut y penser devant une polypose sans PAF dans la famille (surtout dans les formes atténuées). Leurs descendants ne seront pas atteints sauf si leur conjoint est aussi porteur d'une mutation de MYH. Par prudence, un test génétique peut être proposé aux enfants.

L'implication du gène MUTYH dans la prédisposition au cancer colique a été découverte récemment. L'inactivation biallélique de ce gène du BER entraîne une polypose semblable cliniquement à la PAF, mais à transmission autosomique récessive [52,53].

3.4) Polypose juvénile familiale :

Cette polypose rare est caractérisée par la présence de nombreux polypes du côlon et du rectum, mais aussi de l'estomac, du duodénum et du grêle. Les polypes sont majoritairement hamartomateux mais il existe tout de même une prédisposition au CCR avec un risque évalué à 50%. Il s'agit d'une maladie autosomique dominante pour laquelle des mutations de plusieurs gènes ont été retrouvées : les gènes suppresseurs de tumeur SMAD4 et PTEN [54].

4) Le cancer colorectal sporadique :

La tumorigenèse colique suit un processus multiétapes. La séquence adénome-cancer a été décrite en 1990 par Fearon et Vogelstein [55] comme un processus linéaire. En fait, plusieurs voies de cancérogenèse peuvent mener à ces étapes successives (Fig. 4) : l'instabilité chromosomique (cancer LOH), l'instabilité des microsatellites (MSI) ou le phénotype méthylateur (CIMP) [56,57]. 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. Par exemple, un cancer CIN portera une mutation d'APC, alors qu'un cancer MSI aura plutôt une mutation de β -caténine ; les deux protéines APC et β -caténine interagissant entre elles, la résultante fonctionnelle sera semblable [58]. Par ailleurs, les différentes voies de cancérogenèse semblent donner des tumeurs aux caractéristiques différentes.

Ainsi, les cancers LOH sont plus fréquemment retrouvés au niveau du colon gauche. En revanche, les cancers-colorectaux sporadiques de phénotype MSI sont plutôt localisés sur le colon droit et sont en général dus à une perte d'expression du gène MLH1 liée à une hyperméthylation du promoteur et associés à une infiltration lymphocytaire péri-tumorale marquée. La plupart des études ont montré qu'à stade égal, les patients ayant une tumeur de phénotype MSI ont une meilleure survie que les patients ayant une tumeur avec des séquences MicroSatellites Stables (MSS).

Quant au phénotype CIMP, sa découverte est plus récente, et il présente des corrélations au niveau moléculaire avec les tumeurs MSI qui le rendent pour le moment difficilement individualisable au plan clinique.

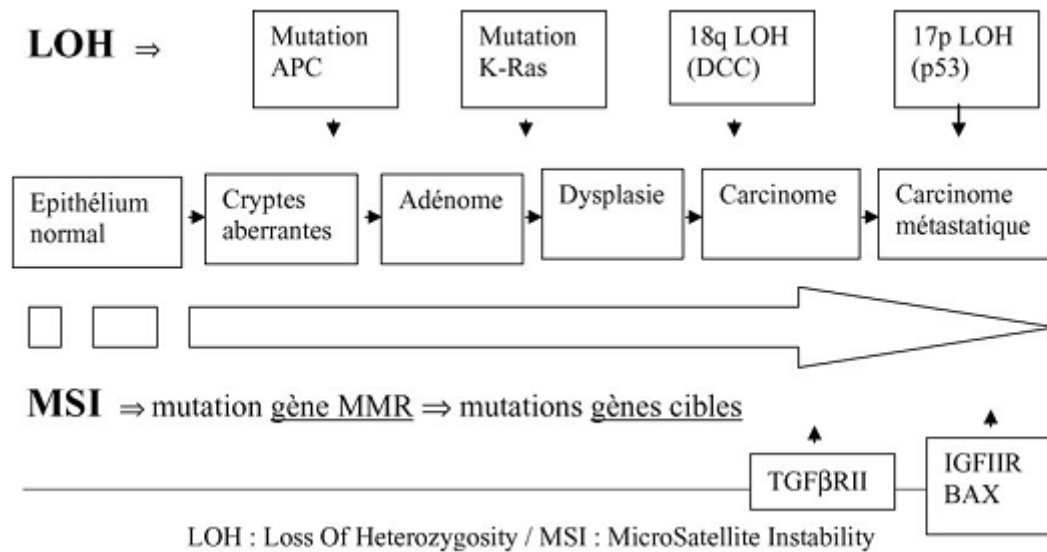


Figure 4: Modèle de cancérogenèse colorectale. [56,57]

4.1) La voie LOH ou CIN :

Les CCR de type LOH représentent environ les trois quarts des CCR sporadiques et tous les CCR héréditaires développés sur polypose adénomateuse familiale (PAF). Ils sont définis par la perte de chromosome(s) ou de fragments de chromosomes [59]. Le type LOH est caractérisé par une aneuploïdie des cellules, des pertes alléliques fréquentes, des mutations fréquentes des gènes (adenomatous polyposis coli), *KRAS* et *P53*, une localisation préférentielle dans le côlon distal et un mauvais pronostic. Nous ne détaillerons dans ce type de cancer que la mise en jeu de la voie de *KRAS*.

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, après une cascade de phosphorylations successives. Les principaux récepteurs de facteurs de croissance capables d'activer cette voie de signalisation sont l'EGFR (ou HER1) (epidermal growth factor receptor) et les autres membres de la famille HER, l'IGFR (insulin-like growth factor receptor) et le PDGFR (platelet derived growth factor receptor).

L'EGFR est un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase, présent au niveau de la plupart des cellules épithéliales. L'activation de l'EGFR intervient dans la prolifération et la migration cellulaire, l'angiogenèse et l'inhibition de l'apoptose. L'EGFR comprend trois domaines : (i) un domaine extracellulaire auquel se lient des ligands spécifiques tels que l'EGF et TGF α (transforming growth factor α), mais aussi l'amphiréguline, l'épiréguline, la β -celluline, HB-EGF et les neurorégulines [60] ; (ii) un domaine transmembranaire hydrophobe qui est impliqué dans les interactions entre les récepteurs cellulaires de surface ; (iii) un domaine intracellulaire doté de l'activité tyrosine kinase. La fixation du ligand sur le récepteur aboutit, après homo- ou hétérodimérisation, à une autophosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire. Ces résidus phosphorylés servent ensuite de point d'ancrage à des protéines intracellulaires à domaine SH2 qui jouent un rôle central dans la transmission de voies de signalisation.

Les deux principales voies de signalisation sont

(i) la voie des MAP (mitogen-activated protein) kinases, à laquelle appartiennent les protéines KRAS et BRAF ; et
(ii) la voie PI3K (phosphoinositide 3-kinase)/PTEN (phosphatase protein homolog to tensin)/AKT. La voie MAPK intervient dans la prolifération cellulaire, et la voie PI3K/PTEN/AKT, dans la survie et la motilité cellulaires.

(i) La voie RAS/RAF/MAP :

La voie RAS/RAF/MAP kinase a pour fonction la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Elle garantit le lien entre les récepteurs membranaires et les protéines kinases intracytoplasmiques. La fixation d'un facteur de croissance sur le récepteur membranaire (EGFR), provoque une dimérisation et une autophosphorylation de ce dernier. Les protéines RAS sont autophosphorylées et passent alors vers un état actif où elles sont liées au GTP. Cette réaction est catalysée par une protéine G appartenant à la famille des protéines appelée GEF (Guanine nucleotide exchange factors). Une fois activée, la protéine Ras active la protéine Raf, provoquant une transduction du signal vers les protéines MAPK, induisant l'expression de gènes dans le noyau de la cellule et une réponse cellulaire. Cette voie contribue alors à la régulation de la prolifération cellulaire et de l'apoptose.

-Le gène K-ras :

KRAS est un proto-oncogène humain homologue d'un oncogène viral (gène transformant) isolé à partir du « Kirsten Rat Sarcoma virus », localisé sur le chromosome 12 (12p12.1), code pour une protéine de 21 kD environ. Constitué de six exons et mesurant 38 kb. [61].

Gène K-ras (12p12.1)



Figure 5 : Localisation chromosomique du gène K-ras sur le chromosome 12

Le gène *KRAS*, code pour une protéine G monomérique activée par les récepteurs membranaires des facteurs de croissance. Il intervient, entre autres, dans le contrôle du cycle cellulaire et l'organisation du cytosquelette. En cas de mutation du gène, la protéine est activée en permanence, en l'absence de facteur de croissance (mutation activatrice).

Les mutations de *KRAS* sont parmi les altérations génétiques les plus précoces au cours de la cancérogenèse colorectale, survenant habituellement dès le stade d'adénome [62]. Ces mutations sont dites dominantes : l'altération d'un seul allèle suffit à l'activation de ce proto-oncogène en oncogène, à son tour responsable de l'activation dérégulée de diverses voies de transduction de signaux intracellulaires.

Par ailleurs, ces mutations étaient mutuellement exclusives de celles présentes sur le gène EGFR.

-Le gène B-raf :

Le gène B-raf est localisé sur le bras long q du chromosome 7 (7q34) et recouvre approximativement 150pb, il code pour une protéine de 806 aa. [63]

La protéine Raf pour 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. [64] et participe à la voie de signalisation des MAP kinases.



Figure 6 : Localisation chromosomique du gène B-raf sur le chromosome 7

La mutation de *BRAF*, mutuellement exclusive de celle de *KRAS*, est présente dans 5 à 10 % des CCR.

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 [65] ;

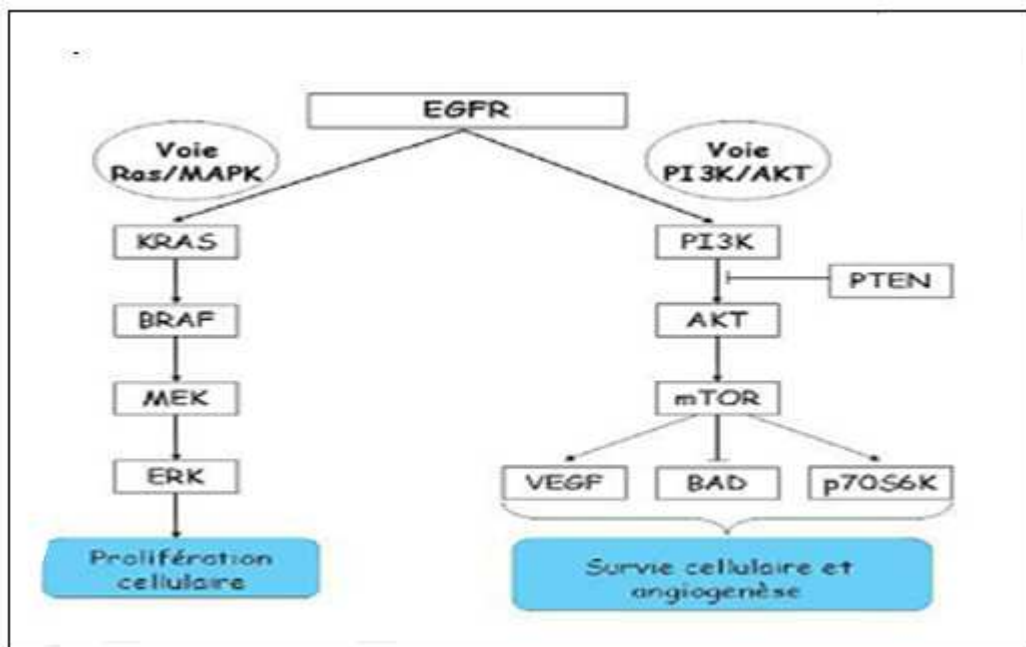


Figure 7 : voie de signalisation simplifiées des MAP Kinases et PI3K/PTEN/AKT [65]

4.2) La voie MSI :

•Définition du phénotype MSI (MicroSatellite Instability) :

Environ 15% des cancers colorectaux présentent une instabilité des séquences microsatellites. Ce phénotype MSI (autrefois appelé RER pour Replication Error) est caractérisé par des altérations de longueur des répétitions nucléotidiques, altérations acquises et touchant l'ensemble du génome. Il est dû à un défaut du système de détection et de réparation des mésappariements (système MMR pour MisMatch Repair) qui corrige les erreurs survenues lors de la replication de l'ADN.

Ce phénotype MSI est observé dans les syndromes HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) mais également dans les cancers colorectaux sporadiques.

L'instabilité des microsatellites (MSI) se caractérise par la variation anormale du nombre de séquences répétées dans l'ADN tumoral comparé à l'ADN du même patient provenant de tissu sain. La recherche de MSI est effectuée par PCR de cinq marqueurs microsatellites répartis dans le génome des cellules tumorales. [61]

Le génome humain est constitué de nombreuses séquences répétées parmi lesquelles les microsatellites, par exemple 5'-CA CA CA CA CA CA CA (écrit aussi sous la forme [CA]₇, constituée de sept répétitions, de deux nucléotides ou dinucléotide, [CA]). Le nombre de séquences répétées est variable.

Lorsque la taille des éléments répétés est inférieure à cinq paires de bases, on parle de microsatellites (par exemple, CA, dinucléotide ; GTC, trinucléotide ; TGCAT, tétranucléotide). On parle aussi de STRs (short tandem repeats). Leur localisation est variable dans le génome. Elles peuvent se trouver dans les régions non codantes (intergéniques ou intragéniques) ou dans les parties codantes des gènes. Le nombre de ces répétitions est souvent très variable d'un individu à un autre (on parle de polymorphisme de répétition). [66]

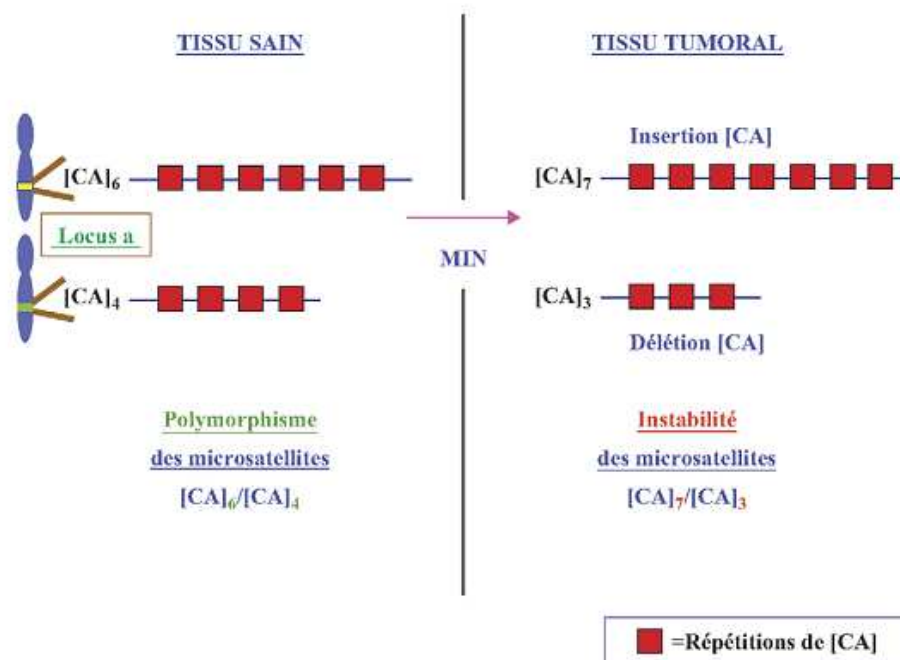


Figure 8 : Principe de l'instabilité des microsatellites. [66]

Le système de réparation des mésappariements des bases (système MMR pour mismatch repair) reconnaît et répare les erreurs produites par l'ADN polymérase lors de la réplication de l'ADN. Le système MMR a d'abord été décrit chez la bactérie *Escherichia coli* (*E. coli*). Son fonctionnement chez les eucaryotes n'est pas totalement connu à ce jour. Chez la bactérie, le système MMR est composé de trois protéines principales, MutS, MutL et MutH. Chez les mammifères, il existe 5 homologues de MutS (de MSH2 à MSH6), 4 homologues de MutL (MLH1, MLH3, PMS1 et PMS2), tandis que MutH n'a pas d'homologue connu.

La reconnaissance des mésappariements des bases et des insertions/délétions de un ou plusieurs nucléotides fait intervenir MSH2, qui réalise un hétérodimère avec MSH3 ou MSH6, créant un complexe analogue à MutS de la bactérie. Les mésappariements ne touchant qu'une seule base sont plutôt réparés par le complexe MSH2/MSH6 (appelé MutS α), tandis que la réparation d'insertions/délétions de plus grande taille (de 2 à 8 bases) fait plutôt intervenir le complexe MSH2/MSH3 (MutS β). Les erreurs de type insertion/délétion d'un seul nucléotide font intervenir les complexes MSH2/MSH3 et MSH2/MSH6, qui sont alors redondants. La reconnaissance des mésappariements est assurée principalement par MutS α , qui est présent à des taux plus importants que MutS β . La redondance partielle de MSH3 et de MSH6 sur la réparation des erreurs de type insertion/délétion a des conséquences sur l'instabilité de microsatellites, l'un des traits phénotypiques clé des tumeurs MMR déficientes. En effet, alors que les tumeurs MSH2-déficientes présentent invariablement un phénotype MSI en raison de l'inactivation des deux hétérodimères, le degré d'instabilité de microsatellites dans les tumeurs MSH6-déficientes peut varier, car l'hétérodimère MSH2/MSH3 compense partiellement la perte de fonction de l'hétérodimère MSH2/MSH6 pour la réparation des erreurs de type insertion/délétion. Une déficience en MSH2 a pour conséquence une dégradation protéolytique à la fois de MSH3 et de MSH6, tandis que MSH2 reste stable en l'absence de l'un de ses partenaires [67].

MLH1 est capable de former des hétérodimères avec les 3 autres protéines homologues de MutL : PMS2, PMS1 et MLH3. C'est le complexe MutL α , formé par MLH1 et PMS2 qui est le composant majeur du système MMR capable d'interagir avec les deux types de complexes contenant MSH2, MutS α et MutS β . Il existerait deux autres hétérodimères contenant MLH1 : MLH1/PMS1 et MLH1/MLH3. L'hétérodimère MLH1/MLH3 pourrait être impliqué dans la réparation de certaines boucles insertions/délétions, en concert avec MutS β .

- Statut MSI dans le cancer du colon sporadique :

Les cancers colo-rectaux sporadiques de phénotype MSI sont en général dus à une perte d'expression du gène MLH1 liée à une hyperméthylation du promoteur de ce gène. La plupart des études ont montré qu'à stade égal, les patients ayant une tumeur de phénotype MSI ont une meilleure survie que les patients ayant une tumeur avec des séquences MicroSatellites Stables (MSS).

Récemment, la mutation V600E (pour certains auteurs, V599E) dans le gène codant pour BRAF (v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1, Omim 164757) a été associée au statut MSI des tumeurs coliques sporadiques (mais, non au syndrome HNPCC). D'autres mutations sont décrites dans le gène BRAF. Seule, la mutation V600E possède cette association sans que le mécanisme en cause ne soit connu. Ce gène dont un certain nombre de mutations est impliqué dans d'autres cancers, appartient à la famille des gènes RAF codant pour des kinases régulées par les gènes Ras et impliquées dans la réponse cellulaire aux signaux de croissance. La mutation V600E est présente dans environ 40 % des cancers du

côlon sporadique ayant un statut MSI positif [68, 69, 70]. Cette mutation est retrouvée plus rarement dans les cancers du côlon sporadiques sans MSI [69]. Dans ce dernier cas, elle serait associée à un moins bon pronostic [71]. La mutation V600E est ainsi étroitement corrélée à l'hyperméthylation du promoteur du gène MLH1 et donc à l'absence d'expression de ce dernier gène [72, 73, 74, 75]. Certains auteurs ont alors proposé d'associer systématiquement la recherche de cette mutation à la recherche de MSI, la présence de la mutation V600E affirmant un cancer sporadique en présence d'une tumeur colique avec MSI ce qui éviterait la recherche de mutations dans les gènes MMR. Il n'y a cependant pas encore de consensus international pour la recherche de cette mutation [76, 70]. D'autres gènes non identifiés et impliqués dans la maintenance surveillance de l'ADN sont probablement en cause [70]. Par ailleurs, la mutation sur le gène BRAF est le plus souvent mutuellement exclusive avec la mutation sur le gène K-RAS, les mutations sur ce dernier gène étant essentiellement associées à un cancer du côlon sans instabilité de microsatellites [77, 75]. Cette dernière notion est cependant contestée par certains auteurs [41]. Comme cela a déjà été précisé, la présence de MSI peut correspondre à un défaut de réparation des mésappariements au cours de la réplication de l'ADN (conséquence d'une mutation germinale sur un des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN) ou la conséquence d'une inactivation biallélique somatique du gène MLH1. Il peut donc s'agir d'un syndrome de Lynch (où le MSI est présent 95 % des cas) ou d'un cancer sporadique (où le MSI est présent dans 10–20 % des cas). Afin de chercher une signature moléculaire spécifique séparant les patients avec MSI et MSS (sans instabilité de microsatellites) tant dans les cancers sporadiques que dans les HNPCC, différents tissus tumoraux coliques ont été étudiés à partir de l'expression de 15 000 gènes représentés sur une puce d'ADN. Les tumeurs MSI ont pu être séparées en cancer sporadique ou en tumeur HNPCC à partir de l'expression de deux gènes seulement, hMLH1 et PIWIL1 (Omim 605571), ce dernier gène ayant un rôle encore mal défini [78]. Il est fort probable que d'autres gènes modulent le risque de développer un cancer du côlon [79].

Le phénotype MSI est mis en évidence lors de la comparaison des produits d'amplification par PCR (Polymerase Chain Reaction) de loci microsatellite, obtenus à partir de l'ADN tumoral et non tumoral du même patient. Ces analyses moléculaires peuvent être réalisées à partir de tissu congelé ou de tissu fixé au formol et inclus en paraffine. Le phénotype MSI se traduit par l'apparition d'allèles de taille différente dans la tumeur, n'existant pas dans l'ADN non tumoral du patient. Une conférence de consensus internationale a proposé en 1998 un panel de référence comportant 5 marqueurs microsatellites (BAT25, BAT26, D2S123, D17S250 et D5S346) et défini le phénotype MSI « high » par la présence de deux marqueurs ou plus instables (ou plus de 30% des microsatellites instables si l'analyse est étendue à un plus grand nombre de microsatellites). Les tumeurs présentant un seul marqueur instable, appelées « MSI-Low », ne présentent pas de caractéristiques cliniques, histologiques et moléculaires différentes des tumeurs ayant des séquences MicroSatellites Stables (MSS) et sont donc actuellement considérées comme telles. Un autre panel, constitué de 5 marqueurs mononucléotidiques quasi-monomorphe (BAT25, BAT26, NR21, NR22 et NR24 qui semble plus sensible pour la détection du phénotype MSI (avec un seuil de positivité d'au moins 3 marqueurs instables), a été proposé comme alternative au panel d'origine [80].

Il est possible, avec ce panel, d'utiliser de l'ADN extrait de tissus fixés en formol 4 % prédilué et tamponné à pH 7,2- 7,4 et inclus en paraffine. En revanche, il est impossible d'utiliser de l'ADN extrait à partir de prélèvements fixés dans du liquide de Bouin.

- L'immunohistochimie (IHC) :

L'alternative au génotypage pour la détermination du statut MSI d'une tumeur est l'immunohistochimie. En effet, les altérations génétiques ou épigénétiques des gènes du système MMR se traduisent par une perte de fonction, et d'expression dans la plupart des cas, de la protéine correspondante.

L'IHC permet d'étudier, sur une coupe histologique, l'expression tissulaire des protéines du système MMR. À l'état normal, ces protéines sont ubiquitaires et de localisation nucléaire. Elles sont exprimées en particulier dans les cellules du tiers inférieur des cryptes de la muqueuse intestinale, dans les lymphocytes du centre germinatif des follicules lymphoïdes, dans les lymphocytes et dans les cellules endothéliales du stroma de la tumeur. Le principe du test IHC consiste à rechercher une perte d'expression, par les cellules tumorales, de la protéine étudiée, les deux copies du gène étant inactivées dans les tumeurs MSI.

La perte d'expression ne s'observe que dans les cellules tumorales, et il est donc nécessaire de disposer d'un témoin interne positif sur la coupe.

L'expression des principales protéines du système MMR peut être actuellement étudiée à l'aide d'anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce depuis 1996 : hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2. La perte d'expression des protéines hMLH1 et hMSH2 est exclusive, c'est-à-dire elle ne concerne qu'une seule des deux protéines.

En revanche, en cas de perte d'expression de la protéine hMLH1, on observe une perte d'expression conjointe de la protéine hPMS2. De la même manière, l'extinction de la protéine hMSH2 s'accompagne d'une extinction de la protéine hMSH6. À l'inverse, hMLH1 reste stable en l'absence de la protéine hPMS2, probablement du fait d'interactions avec d'autres homologues de MutL, tels que hPMS1 ou hMLH3.

L'extinction des protéines hMSH2, hMSH6 et hPMS2 est un bon argument en faveur d'une altération constitutionnelle, à l'exception des rares CCR MSI survenant dans un contexte de maladie inflammatoire chronique de l'intestin [82]. L'extinction de la protéine MLH1 peut être liée, quant à elle, soit à une mutation constitutionnelle de *MLH1* soit à une méthylation de son promoteur, en relation, dans ce dernier cas, avec un mécanisme de sénescence de l'épithélium colique, comme cela s'observe dans les cancers MSI sporadiques.

L'IHC est une technique peu onéreuse et peu consommatrice de temps. Elle est utilisée en routine dans les laboratoires d'anatomie pathologique. C'est une technique extrêmement sensible, utilisable même si l'on dispose de peu de matériel tumoral (biopsie, carcinome mucineux pouvant être responsable de faux négatifs avec la technique du génotypage, cancer du rectum en grande partie stérilisé par le traitement néo-adjuvant). Elle permet en outre de déterminer la protéine défectueuse, et d'orienter ainsi les généticiens vers le gène *MMR* à séquencer [81].

VII. Prévention et traitement du cancer colorectal :

1) Prévention :

Dans la population générale, on identifie trois niveaux de risque : moyen, élevé et très élevé. [83].

Un risque très élevé est défini comme le risque observé chez des sujets ayant des antécédents personnels d'adénome ou de cancer colorectal ou encore appartenant à une famille atteinte de polypose adénomateuse familiale (PAF) ou de cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC).

Il est recommandé de proposer à ces sujets une consultation de génétique oncologique pour la recherche de mutations.

Dans la PAF la détection se fait par sigmoïdoscopie à partir de la puberté jusqu'à 40 ans. Dans le HNPCC, on préconise la coloscopie totale tous les deux ans à partir de 25ans.

Alors qu'un risque élevé est défini comme le risque observé chez des sujets apparentés au premier degré à un patient atteint de cancer colorectal avant 60 ans, ou apparentés au premier degré à deux parents atteints de cancer colorectal (quel que soit l'âge). [84]

On distingue par contre, une prévention primaire qui consiste entre autres en la correction des habitudes alimentaires, qui aurait une influence importante sur l'apparition du cancer colorectal : environ 30 à 40% des cancers du colon et du rectum pourraient en effet être prévenus par une alimentation adéquate.

La consommation du poisson aurait aussi un effet protecteur : le risque de cancer colorectal est de 31% inférieur chez les personnes qui ont une consommation plus élevée de poisson par rapport aux sujets qui en consomment le moins. [85]

La promotion des activités physiques et la multiplication des opportunités pour pratiquer un sport auraient également un rôle important dans ce domaine.

2) Traitement :

La chirurgie est le principal traitement, dans la plupart des cas. Elle consiste en une exérèse "en bloc" de la tumeur associée à l'ablation des différents relais ganglionnaires. Une radiothérapie est systématiquement associée à la chirurgie car elle permet de diminuer les récurrences locales. Cette radiothérapie est réalisée avant la chirurgie, en association avec une chimiothérapie.

2.1) Thérapies ciblées anti-EGFR :

Une meilleure connaissance des cibles moléculaires des chimiothérapies a permis l'identification de facteurs génétiques prédictifs de la réponse et/ou de la toxicité aux drogues utilisées dans les cancers digestifs. [87].

Parmi les nouvelles thérapies utilisées, les anticorps anti-EGFR.

C'est à partir du constat du rôle de la voie de l'EGFR (le récepteur de l'épidermal growth factor) dans la tumorigenèse colorectale et d'études précliniques in vivo et in vitro ayant montré que le blocage de l'EGFR pouvait inhiber la croissance des cellules tumorales, que des thérapeutiques ciblées anti-EGFR ont fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique du CCR métastatique. Il s'agit de deux anticorps monoclonaux anti-EGFR, le cetuximab (Erbix®) et le panitumumab (Vectibix®), qui se lient à l'EGFR avec une haute spécificité et bloquent la phosphorylation du récepteur induite par le ligand. L'efficacité de ces deux molécules est désormais bien démontrée dans le traitement du CCR métastatique [88]. Les

molécules ciblant de façon sélective le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, l'erlotinib (Tarceva®) et le gefitinib (Iressa®), n'ont montré, à ce jour, aucune efficacité dans le CCR, contrairement à d'autres cancers (cancer pulmonaire non à petites cellules avancé et cancer du pancréas).

Les récepteurs EGFR sont des molécules transmembranaires permettant à partir de signaux extracellulaires (facteurs de croissance), une succession d'évènements intracellulaires dont la transduction, entraînant une activation du facteur de transcription qui a pour résultat la croissance cellulaire, la différenciation, la survie, la progression du cycle cellulaire, l'angiogénèse et la réponse aux médicaments. [61].

2.2) La protéine EGFR :

Le REGF est une glycoprotéine transmembranaire, membre d'une sous-famille de récepteurs à tyrosine kinase comprenant le REGF (HER1), HER2, HER3, et HER4. Son activation par autophosphorylation est induite par la fixation de ses ligands naturels, l'EGF et le TGF.

Cette glycoprotéine est de 170 KDa codée par un proto-oncogène situé sur le chromosome 7q22. Composés d'un domaine de fixation extracellulaire, d'un domaine lipophile transmembranaire et d'un domaine tyrosine kinase.

2.3) Stimulation d'EGFR et transduction de signal :

Plusieurs ligands se fixent sur le domaine tyrosine kinase de l'EGFR, provoquant sa dimérisation. Cette modification moléculaire provoque l'activation de sa tyrosine kinase et son autophosphorylation, puis l'activation d'un ensemble de signaux moléculaires intracellulaires. [89]

Cette voie de transduction induit 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. [90].

2.4) Traitement du cancer colorectal par inhibition d'EGFR :

L'EGFR est exprimé dans 60 à 80 % des cancers colorectaux. [91]. L'activation de l'EGFR dans la tumeur joue un rôle majeur dans la tumorigénèse en stimulant la prolifération cellulaire et en inhibant l'apoptose. Elle favorise aussi l'angiogénèse et génération de métastases.

Les anticorps anti-EGFR sont des inhibiteurs des EGFR. En se fixant sur leur cible, ils provoquent l'internalisation d'EGFR et sa dégradation. Actuellement, il existe deux inhibiteurs commercialisés pour le traitement des cancers colorectaux : Cetuximab et Panitumumab.

a) Cetuximab :

Le cétuximab est un anticorps monoclonal chimérique de type IgG1 qui se lie spécifiquement à l'EGFR avec une plus grande affinité que le TGF. Il bloque la phosphorylation du récepteur, vient se fixer sur la partie extracellulaire de l'EGFR,

empêchant ainsi que son ligand ne s'y fixe. Il en résulte une inhibition de la dimérisation et de l'activation de l'EGFR et, par conséquent, des voies de signalisation intracellulaires situées en aval (fig.9).

b) Panitumumab :

Le panitumumab (Vectibix) a le même mécanisme d'action, mais avec la particularité d'être un anticorps monoclonal de type IgG2 et totalement humain, qui s'oppose à la fixation du ligand sur l'EGFR, inhibant de ce fait la transduction du signal et donc l'ensemble des mécanismes de prolifération cellulaire, d'angiogenèse et de dissémination des métastases. [87].

Le cétuximab a été le premier anticorps anti-EGFR à avoir été développé dans le traitement du cancer colorectal métastatique. Des études de phase II ont montré son efficacité en cas de tumeur colorectale résistante à une chimiothérapie à base d'irinotécan puis à toutes les chimiothérapies conventionnelles du cancer colorectal.

L'indication initiale du cétuximab selon l'autorisation de mise sur le marché (AMM) était donc le traitement du cancer colorectal métastatique résistant à l'irinotécan (en monothérapie ou associé à une chimiothérapie à base d'irinotécan).

Le panitumumab, développé ensuite, a d'emblée montré dans une étude de phase III randomisée sa supériorité en monothérapie par rapport à des soins de confort en termes de survie sans progression chez des patients chimiorésistants.

Parmi les facteurs de résistance primaire aux anticorps anti-EGFR, il est maintenant établi que les mutations du gène *KRAS*, en aval de l'EGFR, ont un rôle prédictif majeur de la résistance aux anticorps anti-EGFR [92]. Les mutations du proto-oncogène *KRAS*, qui sont observées dans 30 à 50 % des CCR sporadiques, représentent un marqueur quasi-certain de résistance aux anticorps anti-EGFR [93].

Les mutations affectent surtout le codon 12 de l'exon 2 (80 % des cas), moins fréquemment le codon 13 de l'exon 2, et encore plus rarement le codon 61 de l'exon 3, un autre codon, ou les codons 12 et 13 simultanément. Elles sont retrouvées aussi bien dans la tumeur primitive que dans les métastases, avec une excellente corrélation. Ainsi, la recherche de mutations de *KRAS* est maintenant une étape préliminaire indispensable avant toute prescription d'anticorps anti-EGFR chez les malades atteints de CCR métastatique, comme l'a stipulé l'AMM en 2008.

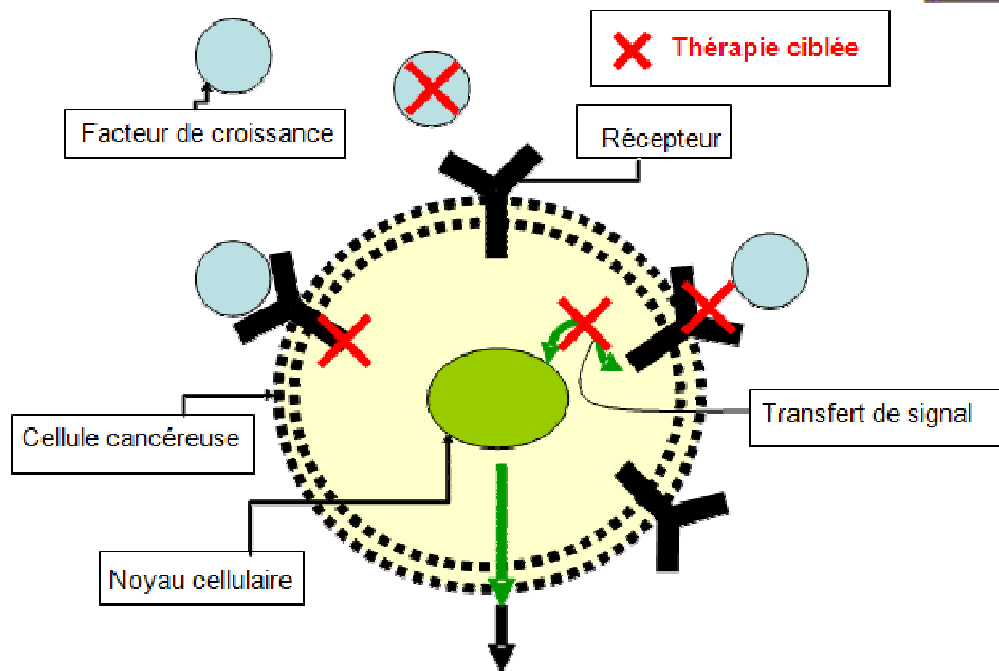


Figure 9 : Mécanisme d'action des anticorps anti-EGFR.

2.5) d'autres facteurs prédictifs de réponse aux anti-EGFR :

Cinquante pour cent des malades dont le cancer ne présente pas de mutation de KRAS ne répondent pas aux anticorps anti-EGFR. Dans ce contexte, les mutations activatrices de BRAF, de PI3KCA, ainsi que la perte d'activité d'un inhibiteur de PI3KCA, PTEN (PTEN est un gène suppresseur de tumeur qui régule négativement la voie de signalisation intracellulaire PI3K/Akt.), pourraient constituer d'autres biomarqueurs de résistance [95]. Les mutations de BRAF, mutuellement exclusives de celles de KRAS, constituent un facteur de résistance aux anticorps anti-EGFR obéissant aux mêmes mécanismes que les mutations de KRAS. Il existe un point chaud de mutation au niveau du quinzième exon du gène BRAF, représentant plus de 90 % des mutations observées, responsable du changement d'une valine en acide glutamique en position 600 (V600E), du fait de la transversion T1799A. La région mutée correspond au domaine kinase de la protéine, qui est une sérine/thréonine kinase. La mutation de BRAF, outre sa valeur prédictive négative, représente également un facteur de très mauvais pronostic [95]. La recherche d'une perte d'expression de PTEN, mise en évidence en immunohistochimie, n'est pas applicable en routine à l'heure actuelle, en raison de difficultés de standardisation [95].

2.6) Instabilité des microsatellites et pronostic des cancers du côlon :

La présence ou non d'un statut MSI semble avoir un intérêt pronostic dans le traitement des cancers du côlon. Une méta-analyse récente a démontré l'importance du profil moléculaire des tumeurs coliques pour la survie des patients, les tumeurs avec MSI ayant un meilleur pronostic et une plus grande résistance au FU [96].

La majorité des études tendent néanmoins à montrer l'intérêt de la recherche de MSI pour établir un pronostic et son utilité pour l'adaptation aux traitements des cancers du côlon.

L'accumulation de mutations dans d'autres gènes pourrait conduire à l'expression aberrante de protéines membranaires, à leur tour responsables de l'intense infiltration

lymphocytaire tumorale (de type Crohn-like), souvent observé dans les CCR MSI. Il n'a pas été observé de différence de survie entre les malades atteints d'un CCR MSI sporadique et ceux atteints d'un CCR MSI héréditaire [97].

De plus, ces malades semblent répondre différemment aux chimiothérapies. Trois molécules de chimiothérapie ont fait la preuve de leur efficacité dans le CCR : il s'agit du 5-FU, avec ou sans levamisole, de l'oxaliplatine, et de l'irinotecan (ou CPT11). Le traitement adjuvant postopératoire par 5FU plus levamisole donné pendant six mois réduit la mortalité chez les malades atteints de CCR de stade III. L'ajout de l'oxaliplatine au 5FU (FOLFOX) améliore le traitement adjuvant des CCR de stade III en réduisant le risque de récurrence et en améliorant la survie globale [98].

Les données actuellement disponibles sur le phénotype MSI montrent qu'il semble être associé à l'absence de bénéfice d'une chimiothérapie adjuvante par 5FU/acide folinique, voire à un effet délétère de cette dernière [69].

Toutefois, certains centres préconisent d'arrêter toute chimiothérapie chez les malades ayant un CCR de phénotype MSI si l'oxaliplatine doit être stoppé.

3) L'intérêt des techniques de la biologie moléculaire dans le diagnostic du CCR :

Les techniques de la biologie moléculaires ont permis, en moins de 30 ans d'établir la carte d'à peu près tous les gènes humains. L'automatisation des techniques, en particulier pour l'amplification de l'ADN et le séquençage, permet une accélération constante du rythme des recherches.

La réaction de polymérisation en chaîne est une technique extrêmement puissante pour l'amplification d'ADN. La PCR a de nombreuses variantes, comme la (RT-PCR) et plus récemment la PCR en temps réel permet des mesures quantitatives de molécules d'ADN ou

La biologie moléculaire a pris une place importante aussi en cancérologie, dans le cadre d'un diagnostic oncogénétique, qui est orienté par une analyse immunohistochimique en amont.

Elle contribue de ce fait à la médecine prédictive qui incite des individus reconnus vulnérables à se protéger plus que d'autres vis-à-vis de facteurs cancérogènes. [102]

3.1 L'amplification d'ADN par PCR :

➤ Principe :

Cette méthode de Biologie Moléculaire a été mise au point en 1985 par Kary Mullis. Aujourd'hui, ce procédé révolutionnaire couplé à l'utilisation d'une ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase) permet d'obtenir, sans clonage, une amplification considérable d'un fragment donné d'ADN avec un gain important en temps. .

La PCR est une technique basée sur une répétition de cycles de transition de température. chaque cycle contient trois étapes décrites ci-dessous :

- **Etape 1 : La dénaturation** : tous les doubles brins d'ADN sont dissociés par la chaleur en brins monocaténares.
- **Etape 2 : L'hybridation** : fixation des amorces sur les séquences complémentaires. Un refroidissement de l'ADN en présence d'un large excès des deux oligonucléotides permet leur hybridation spécifique avec les séquences d'ADN complémentaires.

- **Etape 3 : L'élongation** : synthèse des brins à partir des amorces hybridés par la Taq polymérase: le mélange préassocié est ensuite incubé en présence de l'ADN polymérase et des quatre désoxyribonucléosides triphosphates de sorte que les régions de l'ADN en aval des amorces soient sélectivement synthétisées.

Il faut 20 à 30 cycles de cette réaction pour qu'il y ait une réelle amplification de l'ADN. Chaque cycle double la quantité d'ADN synthétisée au cours du cycle précédent. Un seul cycle prend environ 5 min, permettant l'obtention en quelques heures le « clonage acellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage.

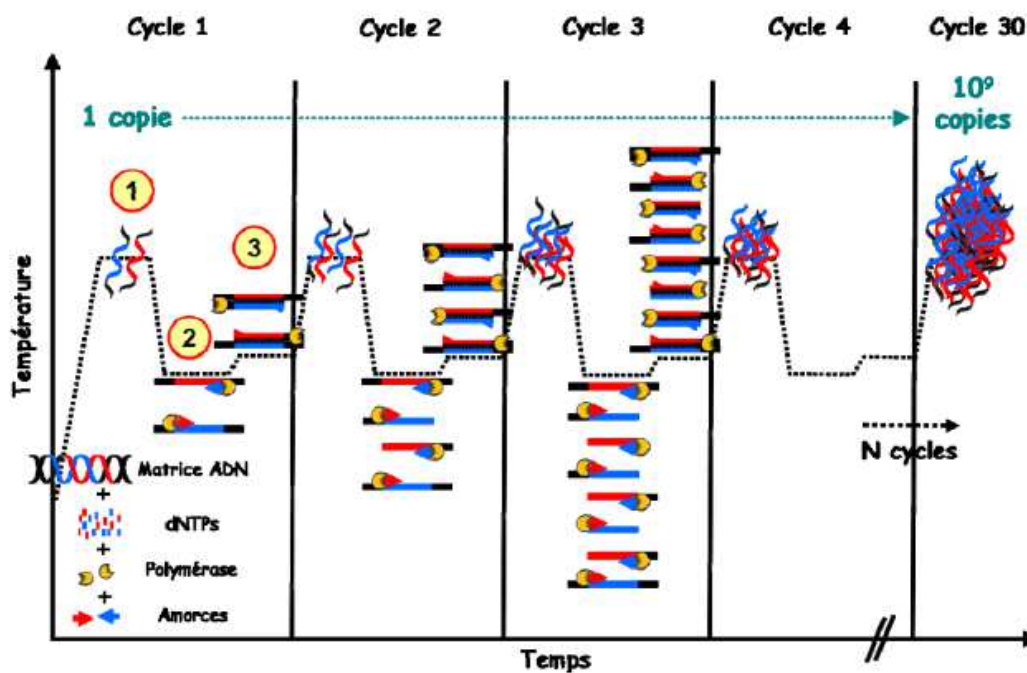


Figure 10 : schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne

- ① : La phase de dénaturation
- ② : la phase d'hybridation
- ③ : la phase d'élongation

MATERIEL ET METHODES

I) Matériel utilisé :

Il s'agit d'étude prospective de 15 patients ayant un cancer colorectal issu de la tumeur primitive ou des métastases.(

II) Méthodes :

Il s'agit des prélèvements tissulaires obtenus par résections chirurgicales ou de biopsies qui ont été collectés du Service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de FES.

1) Biopsie :

Elle correspond au prélèvement d'un échantillon de tissus de l'organisme dans le but de réaliser un examen microscopique, et elle peut se faire de trois façons différentes suivant l'échantillon :

- ⌘ Prélèvement surfacique.
- ⌘ Prélèvement à l'aide d'une aiguille.
- ⌘ Prélèvement par aspiration avec une seringue-aiguille.

N.B : (Les foyers de nécrose ou d'hémorragie doivent ne pas être prélevés).

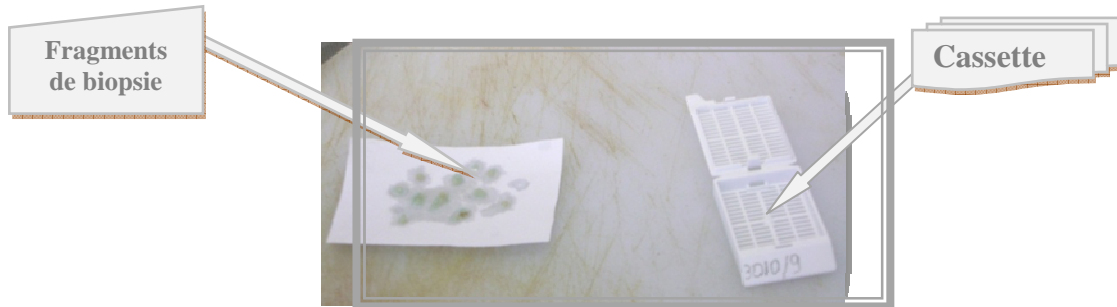


Figure 11 : Biopsie sous forme de plusieurs fragments

Une biopsie au niveau du côlon ou du rectum se fait pendant une coloscopie ou une rectoscopie, grâce à de petites pinces introduites dans l'endoscope.

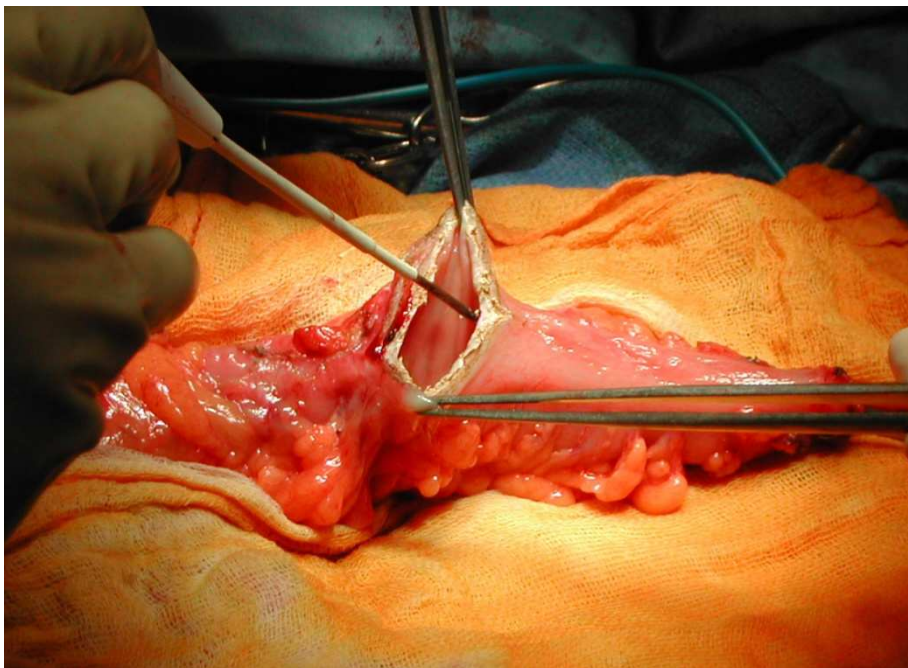


Figure 12 : Coloplastie

Tout ce qui est prélevé lors de la biopsie est ensuite envoyé rapidement dans un laboratoire d'anatomopathologie pour être analysé au microscope.

Les fragments sont placés dans une solution de fixation (formol 10%) dans un délai moins d'une heure, et avec une quantité suffisante d'au moins dix fois le volume de la pièce chirurgicale.

2) Examen histologique sur tissu fixé :

Les prélèvements destinés au laboratoire pour un examen histologique, passent par une série d'étape avant qu'ils soient lus et interprétés par le pathologiste responsable.

La technique est réalisée en cinq étapes, et il s'agit principalement de :

- La fixation.
- L'inclusion.
- La microtomie.
- La coloration.
- Le montage.

a) La fixation :

Elle constitue une technique de référence pour l'étude histologique des prélèvements humains destinés à un examen anatomopathologique ; étape essentielle dans la préparation tissulaire.

Son but est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, garantir la conservation des structures et le durcissement des pièces, afin de garder le prélèvement dans un état aussi proche que possible de l'état vivant.

Le choix du fixateur dépend de la nature du sujet à couper, le laboratoire d'anatomopathologie utilise le formol 10% dont sa durée d'action et sa quantité sont proportionnelles à la taille du de la pièce.

Les prélèvements arrivent au laboratoire l'après midi, ils restent toute la nuit dans le fixateur, et ils sont analysés le lendemain par un anatomopathologiste qui se chargera de faire tout d'abord un examen macroscopique, au cours duquel il fait un descriptif détaillé de la biopsie ou de la pièce (taille mesurée dans les dans les 3 dimensions, couleur, forme, aspect à la coupe, ...etc.), et il peut même avoir recours à une balance afin d'apprécier d'éventuelles variations de poids des organes.

Selon cet examen macroscopique, le pathologiste incube les fragments dans des cassettes susceptibles de subir une inclusion dans la paraffine.

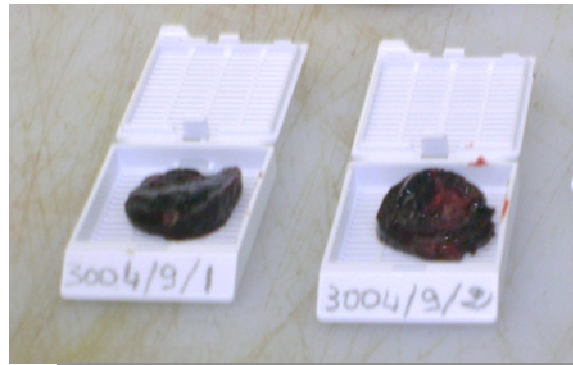


Figure 13 : inclusion des fragments dans les cassettes

b) L'inclusion :

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltrer. Les tissus acquièrent ainsi une consistance permettant d'obtenir des coupes minces au microtome.

La substance d'inclusion, généralement la paraffine, est une substance liquide à chaud, solide à température ambiante et insoluble dans l'eau et dans l'alcool.

Comme cette substance est hydrophobe (non miscible à l'eau), la pièce anatomique doit être entièrement déshydratée avant son inclusion dans la paraffine. Mais vu qu'elle n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; on procède donc à une double substitution, c'est à dire qu'on remplace l'eau par de l'alcool (déshydratation) et on remplace l'alcool par le toluène (substitution).

Pour réaliser cette étape, on utilise un automate d'inclusion appelé histokinette qui peut se charger de toutes les phases conduisant à la mise à disposition d'un bloc de paraffine prêt à être microtomisé.



Figure 14 : Histokinette

L'étape qui consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires a reçu le nom de circulation :

2 bains de Formol 10% (30 min x 2) → 5 bains d'Alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h) → 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h) → 2 bains de Paraffine (2h et 3h)

- **Déshydratation par l'alcool :**

Consiste à débarrasser le tissu de l'eau qu'il contient, tenant compte que l'agent déshydratant doit être miscible en même temps à l'eau et à la paraffine.

- **Eclaircissement par le toluène :**

C'est l'étape qui réalise le remplacement de l'alcool par un solvant de la paraffine, qui est destiné à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène.

Le toluène en remplaçant l'agent déshydratant, le tissu devient transparent d'où le nom d'éclaircissement.

- **Enrobage dans la paraffine :**

C'est l'étape terminale de la circulation, réalisée par passage du tissu dans la paraffine liquide.

L'inclusion ne se fera de façon satisfaisante que si la pièce à couper ne contient ni eau ni solvant intermédiaire (alcool).

Ce bloc est plus facile à manipuler que le tissu seul, et il peut s'attacher à la pince porte-objet du microtome sans briser la pièce.

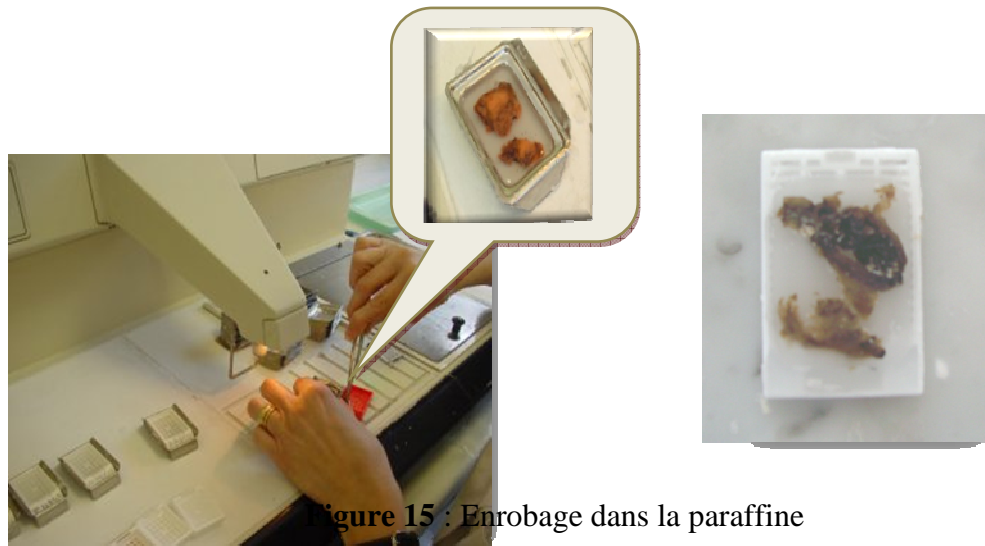


Figure 15 : Enrobage dans la paraffine

c) Réalisation des coupes ou microtomie :

Après montage du bloc dans le porte-bloc du microtome qui est construit de manière à produire de fine tranche de matière en opérant un mouvement vertical, et après réglage du rasoir de manière à dresser une face de coupe nette, ainsi qu'un réglage de l'épaisseur des coupes (3-5 μ) ; on procède à la réalisation des rubans.

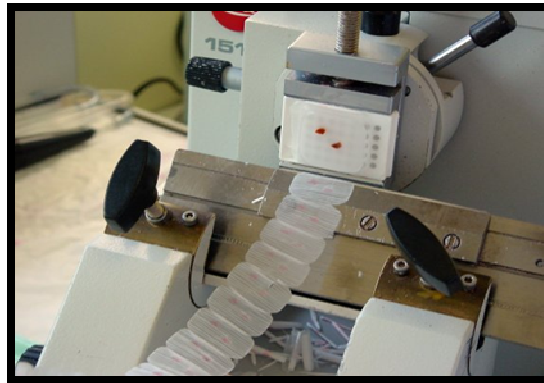


Figure 16 : Microtomie

Ces coupes sont immergées dans des bains d'alcool, puis étalées en les dépliant sur la lame par flottation à la surface d'un bain chaud.

d) Coloration :

La coloration histologique est celle qui permet de différencier finement tous les éléments d'un tissu.

Elle consiste à accentuer les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation.

La coloration utilisée est de type H.E.S (hématoxyline-éosine safran). Elle a pour but de permettre la mise en évidence des noyaux et du cytoplasme des cellules ainsi que des fibres de collagène. Dont l'hématoxyline colore le noyau en violet, l'éosine colore le cytoplasme en rose, et le safran se charge de colorer les fibres de collagène en jaune.

Les lames doivent être préparées, afin de pouvoir recevoir les colorants.

• **Déparaffinage :**

Consiste à enlever la paraffine de la coupe tissulaire pour que les colorants (préparés en phase aqueuse), puissent pénétrer le tissu et le colorer.

Ce déparaffinage se réalise tout d'abord par la mise des lames dans l'étuve sous une température de 70° pendant une heure, puis les faire plonger dans le toluène.

• **Hydratation :**

Elle a pour objet de retirer le toluène du tissu et le remplacer par de l'eau. Le toluène et l'eau n'étant pas miscibles, on procède d'abord au remplacement du toluène par l'alcool, puis les coupes sont passées dans un bain d'eau courante, dont l'eau remplacera l'alcool du fait de leur miscibilité.

e) **Le montage :**

Opération consistant, une fois la coloration est terminée, à fixer à l'aide d'une substance appelée milieu de montage (composé de glycérol, de gélatine et de thymol), une lamelle de verre sur la coupe tissulaire.

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants.

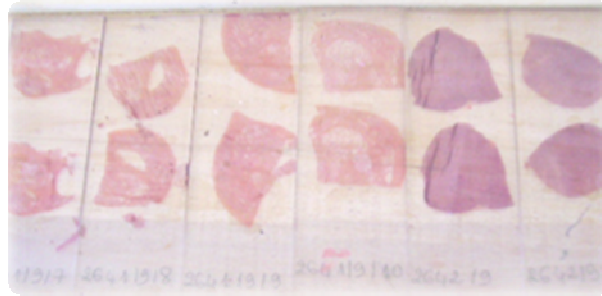


Figure 17 : Lames montées et colorées

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. S'il y a plus de 50% de cellules tumorales, le test est considéré comme fiable, dans le cas contraire, les cellules saines peuvent interférer et il y a un risque de conclure à un résultat faux négatif.

Les lames préparées sont ensuite étudiées par l'immunohistochimie.

3) Immunohistochimie :

Avant d'avoir recours aux outils moléculaires, la méthode d'immunohistochimie (IHC) permet d'étudier sur une coupe histologique l'expression tissulaire des protéines de réparation des mésappariements (MMR) de l'ADN, sur cellules colorectales tumorales ; à l'état normal, ces protéines sont exprimées dans le noyau de plusieurs cellules. Pendant la croissance tumorale, l'allèle sauvage est inactivé par mutation délétion ou méthylation, ce qui aboutit à une perte d'expression de la protéine dans les cellules tumorales. Ceci permet d'orienter le généticien dans le choix du test moléculaire à effectuer [103].

Des marqueurs spécifiques sont ainsi aujourd'hui connus pour divers cancers. Nous pouvons citer à titre d'exemples :

- L'antigène carcino-embryonnaire (CEA) ;
- Le CD15 et CD30 : utilisés pour la maladie de hodgkin ;
- L'alpha-foetoprotéine : en cas de carcinome hépatocellulaire ;
- Le CD117 : en cas de tumeur stromale gastro-intestinale ;
- Le Ki-67 : un des indices de prolifération tumorale

➤ Principe :

Le principe du test d'IHC consiste à rechercher une perte de l'expression d'une ou plusieurs des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN à savoir MSH6, MSH2, MLH1, PMS2, PMS1, MLH2 ; par rapport aux tissus normaux présents sur la coupe histologique.

Une immunoréaction est composée de trois éléments principaux :

1. La préparation (tissu, cellule, organite subcellulaire, virus...) contenant l'antigène à étudier
2. Un anticorps primaire dirigé contre l'antigène recherché ;
3. Le système révélateur qui permet de visualiser l'immunoréaction. (Figure 17).

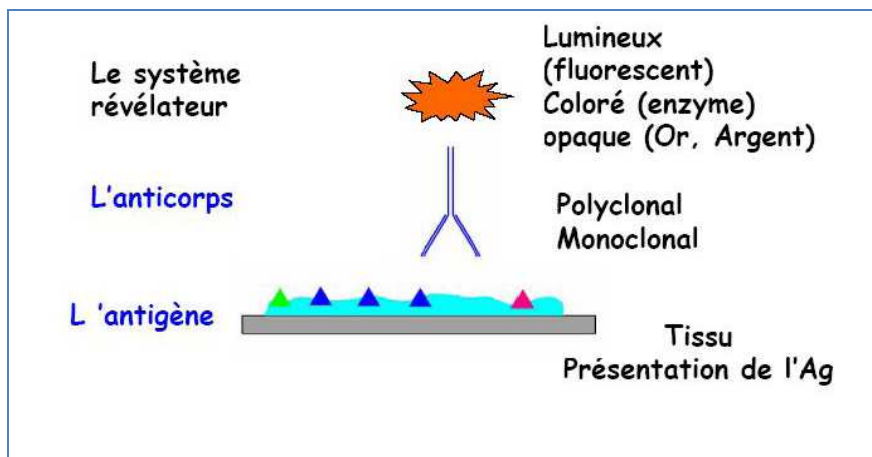


Figure 18 : Les différents composants d'une immunoréaction

Le système révélateur est composé d'un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire.

➤ **Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle :**

-Préparation à la technique :

• **Déparaffinage**

Le déparaffinage consiste à enlever la paraffine fixée dans le tissu. Il s'effectue par passage à l'étuve (58°C) pendant 1 nuit, puis dans deux bains de toluène et d'alcool absolu pendant 7 min chacun. Ensuite par rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée.

• **Technique**

- Egoutter les lames
- Passage dans H₂O₂ à 0,4% (H₂O 30%) 10 min
- ✓ Plusieurs tissus contiennent des peroxydases endogènes qui peuvent donner des réactions non spécifiques donc on traite les tissus par H₂O₂ puis par rinçage en tampon PBS pendant 5 min
- Rinçage à l'eau courante puis à H₂O distillée 10 min
- Passage dans le tampon citrate bouillant (cocotte) 5 min

- ✓ Le démasquage antigénique permet aux anticorps d'accéder aux antigènes en coupant les liaisons covalentes et intramoléculaires entre les protéines, les glycoprotéines, les polysaccharides et les acides nucléiques.
- Rincer à l'eau distillée
- Rincer avec du PBS (1 bain) 5 min
- Egoutter les lames et entourer les fragments par le Pap-Pen
- Mettre le bloquant sur le fragment (lait écrémé 0,4%) 10 min
- Disposer les lames dans une chambre humide
- Enlever le surplus du bloquant en secouant
- Application de l'anticorps primaire 1h
- ✓ Laisser l'anticorps primaire anti MSH6 sur le fragment couvert pour qu'il ne sèche pas.
- Couvrir les lames pour qu'elles ne sèchent pas
- Egoutter un peu les lames et les mettre dans un panier
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Application de l'anticorps secondaire (1 goutte) 15 min
- Couvrir les lames pour qu'elles ne sèchent pas
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Application de la peroxydase (1 goutte) 15 min
- Rinçage dans du PBS (3 bains) 5 min chacun
- Egoutter les lames
- Application sur chaque lame du substrat chromogène fraîchement préparé (2 gouttes + 5 ml d'AEC) 4-15 min
- ✓ Pour la révélation du complexe Ag-Ac primaire on utilise une technique basée sur l'utilisation de Streptavidine-Biotine.
- Rinçage à l'eau courante 10 min
- Egoutter les lames
- Application de l'hématoxyline 3 min
- Rinçage à l'eau de robinet
- Rinçage à l'eau distillée
- Montage à l'eau

Etude moléculaire :

4)Extraction d'ADN à partir de tissus tumoraux

➤ **But :**

Extraction d'ADN à partir de tissus FFPE (formaldehyd/paraformaldehyd fixed/parafin-embedded tissues) : ADN et ARN

➤ **Kit utilisé :**

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit. (Voir ANNEXE 1)

➤ **Principe general de fonctionnement:**

Les échantillons inclus en paraffine sont incubés dans le xylène à température élevée afin d'enlever la paraffine des tissus, ensuite lavés dans des solutions d'alcool pour enlever les traces de xylène. Les échantillons ainsi déparaffinés sont sujets à une étape de digestion des protéines liées à l'ADN et l'ARN par l'action d'une protéase. Enfin les acides nucléiques sont purifiés par capture sur un filtre puis lavage et élution.

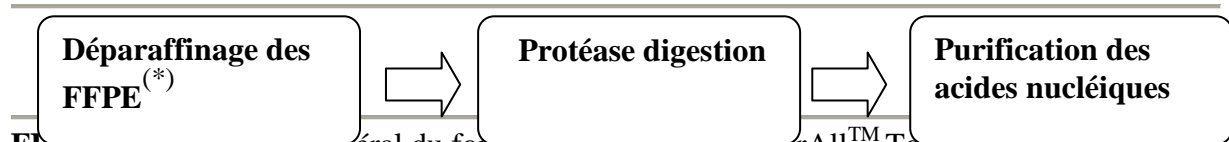


FIGURE 15 . Schéma général du fonctionnement du RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

(*) Formaldehyde or paraformaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues

5) Test qualité de l'ADN :

➤ **Principe :**

En biologie moléculaire, il est utilisé après l'extraction de l'ADN, pour quantifier l'ADN et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport R. doit être compris entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Supérieur à 2, ce rapport indique une probable contamination par des ARN.

$$R = (A_{260} - A_{320}) / (A_{280} - A_{320})$$

R est simplifié lorsque (cas fréquent) $A_{320} = 0$.

La concentration d'ADN peut-être calculée à partir de la mesure à 260 nm en utilisant un facteur de corrélation :

- * ADN double-brin : 1 Abs = 50 ng/μl
- * ADN simple-brin : 40 ng/μl (comme l'ARN simple brin)
- * ARN : 1 Abs = 40 ng/μl.

➤ **But :**

Après extraction de l'ADN à partir de tissu tumoral, on procède à un test qualité de l'ADN. On estime la concentration de l'ADN extrait par spectrophotométrie. Car 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 (10 ng/ml), il faut donc estimer la quantité d'ADN pour diluer à la bonne concentration.

6) Amplification de l'ADN extrait par PCR :

➤ **Le protocole expérimental :**

On a fait une amplification par PCR du gène *BRAF*, *KRAS* et la PCR pentaplex pour déterminer MSI.

Les constituants utilisés pour la réaction PCR sont : les amorces, la Taq polymérase, les dNTP, le tampon et l'ADN, atteignant un volume finale de 25 µl.

- **Constituants de la réaction d'amplification des gènes *BRAF* et *KRAS*.**

- Les amorces utilisées pour l'amplification du gène ***BRAF* (l'exon 15 de 147 pb)** :

Tableau 4 : Amorces utilisées pour le séquençage de l'exon 15 de *BRAF* de 147 pb

NOM	SEQUENCE 5' - 3'
BRAF_15F	TGC-TTG-CTC-TGA-TAG-GAA-AAT-G
BRAF_15R	GTA-ACT-CAG-CAG-CAT-CTC-AGG-G

- AMORCES utilisés pour l'amplification du gène ***KRAS* (l'exon 2 de 115pb)**

**KRAS* 2 BIS +/-

***KRAS* 2BIS+/ AGGCCTGCTGAAAATGACTG (20nt)**

***KRAS* 2BIS - / TGGATCATATTCGTCCACAAAA (22nt)**

- On prépare le mix PCR selon les indications des tableaux
- On aliquote le mix préparé à raison de 23 µl par tube et on ajoute dans chaque tube 2 µl d'ADN pour avoir un volume total de 25 µl.
- On met les tubes dans le thermocycleur et on lance le programme de dénaturation/hybridation/élongation
- A la fin de la PCR, on prépare un gel d'agarose de 2% (voir Annexe)
- Pour chaque échantillon, on mélange 5 µl de produit PCR avec 2 µl de tampon de charge.
- On lance la migration à 100V
- On visualise les bandes à l'aide des ultraviolets

Tableau 5 : composition du mix PCR pour l'amplification des gènes *BRAF* et *KRAS*

MIX PCR	Concentration initiale	Volume pour 1 réaction
Eau stérile		13,3 µl
Amorce sens F	10 µM	1 µl
Amorce anti-sens R	10 µM	1 µl
dNTPs	10 µM	1 µl
MgCl ₂	25µM	2,5 µl
Tampon PCR 5x		5 µl
Taq polymérase	5 U/µl	0,2 µl
ADN		1 µl
Volume total		25 µl

Le programme du thermocycleur :

Tableau 6 : Récapitulatif du programme du thermocycleur (Thermocycler- Programme)

Cycles	Températures	Temps
1	95°C	10 min
35/40 cycles	94°C	30 sec
	60°C	1 min
	72°C	30 sec
1	72°C	10 min
1	4°C	∞
VERIFICATION DES PRODUITS DE PCR PAR ELECTROPHORESE		

N.B : 35 cycles pour BRAF et 40 cycles pour KRAS

- **Constituants de la réaction d'amplification des loci microsatellites (phénotype RER)**

Cette étape correspond à l'amplification des loci microsatellites choisis par PCR multiplex. Les 5 couples d'amorces permettant d'obtenir des amplicons de tailles proches mais de marquage différent de façon à pouvoir les distinguer lors de l'analyse de fragments. Les amorces sens sont donc marquées en 5' par différents fluorochromes
 Les amorces utilisées sont

Tableau 7 : Amorces utilisées pour le phénotypage RER

Nom du marqueur	Taille du fragment	SEQUENCE 5' - 3'
NR21 R	103 pb	ATT-CCT-ACT-CCG-CAT-TCA-CA
NR21 F		NED- TAA-ATG-TAT-GTC-TCC-CCT-GG
NR22 R	142 pb	AAT-TCG-GAT-GCC-ATC-CAG-TT
NR22 F		HEX - GAG-GCT-TGT-CAA-GGA-CAT-AA
NR24 R	132 pb	ATT-GTG-CCA-TTG-CAT-TCC-AA
NR24 F		NED - CCA-TTG-CTG-AAT-TTT-ACC-TC
BAT25 R	123 pb	TCT-GCA-TTT-TAA-CTA-TGG-CTC
BAT25 F		6- FAM- TCG-CCT-CCA-AGA-ATG-TAA-GT
BAT26 R	119 pb	AAC-CAT-TCA-ACA-TTT-TTA-ACC-C
BAT26 F		HEX- TGA-CTA-CTT-TTG-ACT-TCA-GCC

-On a utilisé seulement 3 amorces: NR22/NR24/BAT25

Les deux autres amorces ont perdu leur fluorescence.

✓ **Préparation des amorces MSI :**

- 7,5 µl d'amorce NR22 R + 7,5 µl d'amorce NR22 F
- 7,5 µl d'amorce NR24 R + 7,5 µl d'amorce NR24 F
- 7,5 µl d'amorce BAT25 R + 7,5 µl d'amorce BAT25 F

-On ajoute 200 µl du TE 1X

-On prépare le mélange dans un tube eppendorff de 0,5 µl

✓ **Condition de PCR MSI :**

- Tampon 5x : 5 µl
- MgCl₂ : 2,5 µl
- dNTP : 1 µl
- Amorces 10x : 5 µl
- Taq : 0,2 µl
- Eau stérile : 19 µl
- ADN : 1 µl

-On obtient le volume de 33,7 µl par tube

-On met les tubes dans le thermocycleur et on lance le programme suivant :

✓ **Programme du thermocycleur :**

- 15 min : 95°C → 1 cycle
- 30 sec : 94°C
- 90 sec : 61°C → 35 cycles
- 60 sec : 72°C
- 30 min : 60°C → 1 cycle

-A la fin de la PCR, on prépare un gel d'agarose de 4%

-Pour chaque échantillon, on mélange 5 µl de produit PCR avec 2 µl de tampon de charge.

-On lance la migration à 100V

-On visualise les bandes à l'aide des UV

-Les produits PCR des gènes BRAF et KRAS ont été séquencés

-Les produits PCR des loci microsatellites ont été analysés (l'analyse des fragments

7) Séquençage des produits PCR des gènes BRAF et KRAS :

➤ **Principe général de la méthode :**

Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire à une partie du fragment d'ADN à séquencer. L'élongation de l'amorce est réalisée par la « séquenase » (une ADN polymérase I dépourvue d'activités exonucléasiques 5'→3'et 3'→5', et 100 fois plus rapide que le fragment de Klenow). Les quatre désoxynucléosides (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoxynucléosides (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoxynucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, empêchent la poursuite de l'élongation. Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par électrophorèse sur un gel de polyacrylamide.

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 jaune + ddTTP fluorescent rouge

Le séquençage a été fait au CURI (Centre Universitaire Régional et d'Interface)

➤ **But :**

Notre objectif est d'appliquer le séquençage pour détecter les différentes mutations pour les différentes maladies étudiées avant de passer nos produits PCR, il faudra les purifier pour éliminer l'excès d'amorces, dNTP et d'ADN polymérase pour ne pas s'interférer avec séquenceur, pour cela il s'agit de 3 réactions essentielles comme suit :

- **Purification par ExoSAP®**

ExoSAP-IT est conçu pour une purification rapide et efficace des produits de PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques, l'exonucléase I(Exo) qui dégrade les ADN Simple brins et la phosphatase alcaline de crevette (SAP) qui hydrolyse les dNTPs libres, et en excès sans interférence avec les applications en aval. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simple brins inférieurs à 100pb sont ainsi dégradés.

-On utilise 2µl de l'enzyme ExoSAP avec 10µl du produit PCR

-On le place au niveau du thermocycleur suivant le cycle suivant :

Tableau 8 : Programme du thermocycleur

Température	Durée
37°C	3 min
80 °C	15 min
10°C	∞

- **Reaction de sequence par BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing :**

Selon la réaction de Sanger qui repose sur l'incorporation aléatoire par cette ADN polymérase de didéoxynucléotides interrupteurs de chaîne (ddNTP) eux aussi présents dans le milieu réactionnel dont chacun est marqué par un fluorophore spécifique dont le spectre d'émission est spécifique. Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes, associer 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 "*BigDye Terminators*" ou "*Dye-labeled terminator*".

Nous utilisons la technologie Big Dye Terminator_version2 (Applied Biosystems : ABI), version 2.

Tableau 9 : composition de mélange de réaction de séquence

Tube	F (Forwad)/ +	R (reverse)/-
Amorce	1 µl (KRAS 2bis+ : 12,5 µM /BRAF F : 10 µM)	1 µl (KRAS 2 bis- : 12,5 µM/ BRAF R : 10 µM)
Big dye	1,5 µl	1,5 µl
Produit de purification par EXOSAP	2 µl	2 µl

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Le premier est une fluorescéine (6 carboxyfluorescéine) appelé fluorochrome donneur, commun aux quatre ddNTP. Le second est une dichlororhodamine (dRhodamine) qui joue le rôle de fluorochrome accepteur.

Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour. Le fluorochrome accepteur ou dichloroRhodamine est différent pour chaque type de ddNTP.

Tableau 10: dichloroRhodamines utilisées et le spectre d'émission maximum de ddNTP

ddNTP	dichloroRhodamines utilisées	Spectre d'émission maximum
A	dR6G	560-565nm
T	dROX	615-620nm
C	dR110	530-535nm
G	dTAMRA	590-595nm

Le spectre de la fluorescence réémise sera ainsi spécifique de chaque type de ddNTP. Le transfert du signal de la fluorescéine vers la dRhodamine permet une amplification du signal et, par conséquent, une augmentation de la sensibilité de la technique (fig20).

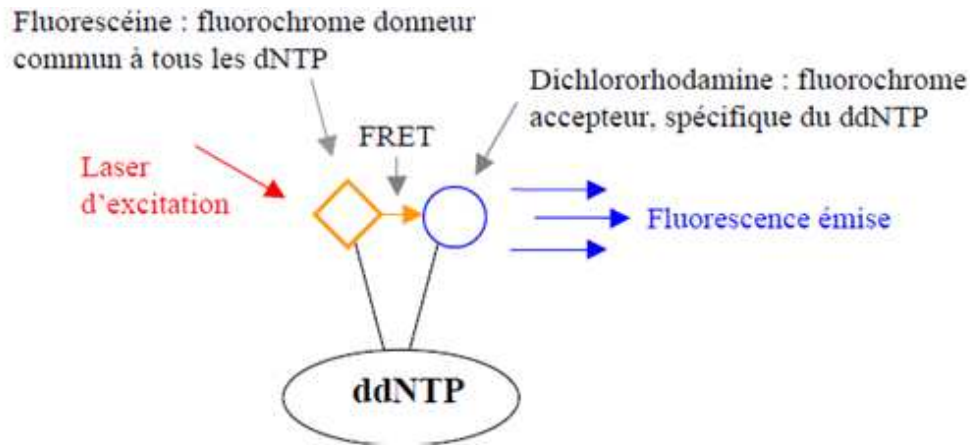


Figure 20 : Mécanisme de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie par résonance

On effectue 25 cycles d'amplification sur le thermocycleur dans des conditions spécifiques à la réaction de séquence. Un cycle correspond à :

- **Une étape de dénaturation de l'ADN** à 96°C pendant 10 sec pour obtenir l'ADN sous forme simple brin.
- **Une étape d'hybridation** à 50°C pendant 5 sec (température moyenne d'hybridation pour la majorité des amorces utilisées).
- **Une étape d'élongation de l'ADN** par la Taq polymérase à 60°C pendant 2 min.

Cette température faible ralentit la Taq et va déplacer l'équilibre pour permettre une meilleure incorporation des ddNTP.

Une fois l'étape de thermocyclage effectuée, il est nécessaire de purifier la réaction de séquence.

- **Purification de la réaction de séquence avec le Kit BigDye-X Terminator :**

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: « X Terminator Solution (stockage à 4°C, ne pas congeler)

1. Déposer 10µl de produits de réaction de séquence dans la plaque Applied.
2. Centrifuger la plaque.
3. Préparer un mix contenant :
 - 45 µl de solution SAM par puits
 - 10 µl de X Terminator Solution par puits à l'aide des cônes spécifiques.**!! Vortexer 10'' le flacon X Terminator Solution et prélever immédiatement la quantité nécessaire.**
4. Vortexer le mélange et ajouter 55µl dans chaque puits à l'aide de la pipette distritips ou de la pipette monocanal.

!! Vortexer le mix très régulièrement (la solution Xterminator « se redépose » très rapidement)

5. Sceller la plaque correctement avec un film adhésif
 6. Mettre la plaque sur l'agitateur Eppendorf Mix Mate.
 7. Lancer l'agitateur sur la position 1800 rpm pendant 30secondes et vérifiez que tout se mélange bien et que la plaque reste bien attachée.
 8. Agiter à 1800 rpm pendant 30 minutes.
 9. Centrifuger la plaque 2 minutes à 1000 g (Centrifugeuse Heraus Multifuge 3S-R)
 10. Lancer le run sur le séquenceur 3730 avec le Run Protocole Module adapté
- N.B : Les plaques peuvent être conservées 7 jours à 4°C (pas congelées) avant d'être analysées avec le séquenceur.**

- **Détermination de la séquence :**

Les séquences d'ADN sont déterminées par séquençage automatique (séquenceur capillaire ABI Prism™ 3130 Genetic Analyser et séquenceur 8 capillaires ABI PRISM 3130xl)

8) L'analyse des fragments des MSI :

Cette analyse a été faite au CURI.

- On a préparé un mélange de formamide (9,25 µl) et de standard (0,25µl). Ces deux produits sont prêts à l'emploi.
- On a déposé dans chaque puits de l'appareil 9,5 µl de mélange préparé et ajouté 1,5 µl de l'échantillon. Les fragments sont ainsi analysés par le logiciel Peak Scanner Software V1.0

Résultats et discussion

I-Etude statistique :

Une étude statistique rétrospective portant sur 42 cas de tumeurs colorectales, recrutés et recensés au sein du service d'Anatomie Pathologique du CHU Hassan de Fès, a été réalisée par l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique (UMGO), afin d'évaluer les caractéristiques épidémiologiques des tumeurs colorectales.

1) Répartition des tumeurs colorectales selon l'âge, le sexe et le milieu de résidence :

Dans notre série, l'âge médian des patients ayant des tumeurs colorectales malignes est de 64 ans, avec des extrêmes de 22 ans et de 84 ans.

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

Et d'après une étude descriptive intitulée « les aspects épidémiologiques des cancers au CHU HASSAN II de Fès » réalisée au sein du service d'anatomie pathologique du CHU HASSAN II de Fès pendant une période s'étalant du 1er Octobre 2003 au 30 Juin 2004, l'âge moyen des patients était de 60 ans pour les cancers coliques

En France, le cancer colique est rare avant 50 ans (6 % des cas), alors qu'au Maroc le CCR est plus fréquent avant 50 ans d'après plusieurs études. L'incidence augmente ensuite rapidement avec l'âge. La proportion de cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes. L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 ans chez la femme. L'augmentation de l'incidence du cancer colique pourrait être liée au vieillissement de la population.

Ces résultats sont comparable avec nos résultats, sauf qu'il ya une petite différence qui est expliquée par la taille de l'échantillon qui n'est pas représentative.

Ensuite, notre étude montre qu'il y avait une légère prédominance masculine avec 54,4% des hommes et 43% de femmes (figure 21). Comparativement à l'étude réalisée par la clinique chirurgicale « C » du CHU IBN SINA de Rabat, constatant ainsi une nette prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,66 (60,1% d'hommes et 38,8% de femmes), et celui trouvé par **Viguié J .et ses collègues en 2003** qui a noté une prédominance masculine, avec un sexe ratio de 1,5. Et que Le risque cumulé de développer un cancer colique entre 30 et 74 ans est de 3,4 % chez l'homme et 1,6 % chez la femme, nés entre 1937 et 1945.

Donc, les trois études confirment que les hommes sont plus susceptibles de développer le cancer colorectal que les femmes. Cette prédominance masculine est nette dans les deux

études de CHU IBN SINA de Rabat et celui trouvé par **Viguié J .et ses collègues en 2003** en France. Par contre les résultats trouvés dans le CHU Hassan II de Fès n'est pas très significatifs vue la taille restreinte de l'échantillon étudié.

Par la suite, notre étude a trouvé une différence d'incidence entre le milieu urbain (57 %) et le milieu rural (43%).

Tandis que l'étude épidémiologique faite 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 ces deux milieux avec 64,7% pour le milieu urbain et 35,3 attribué au milieu rural. Cette différence est généralement attribuée à des facteurs de risque environnementaux, notamment les habitudes alimentaires différentes, comme il a été décrit dans la littérature [36].

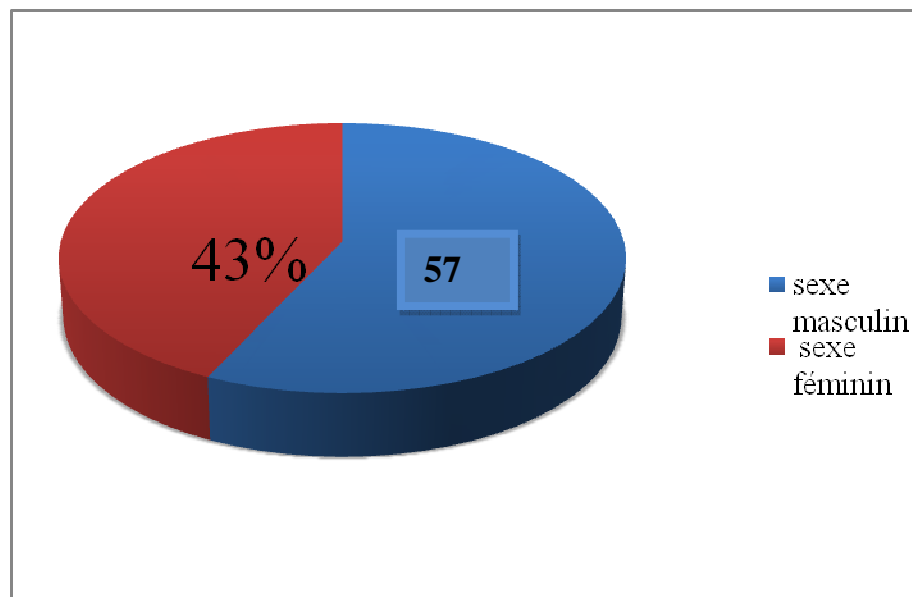


Figure 21 : la répartition du CCR selon le sexe

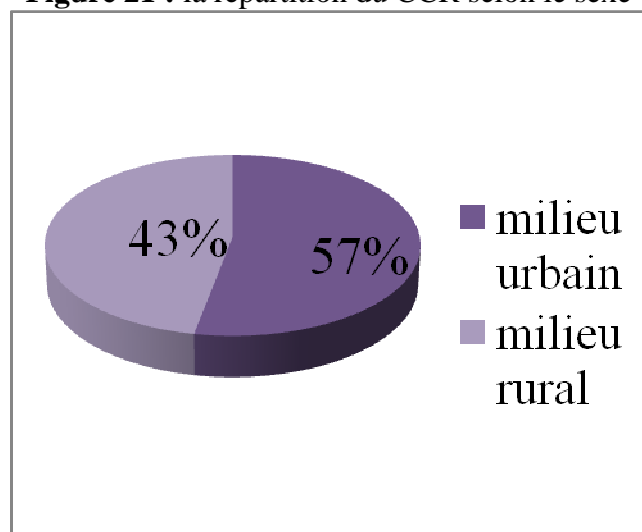


Figure 22 : répartition du CCR selon le milieu de résidence (N= 42)

Enfin, la localisation de la tumeur chez 8 patients a été déterminée dans la figure (23)

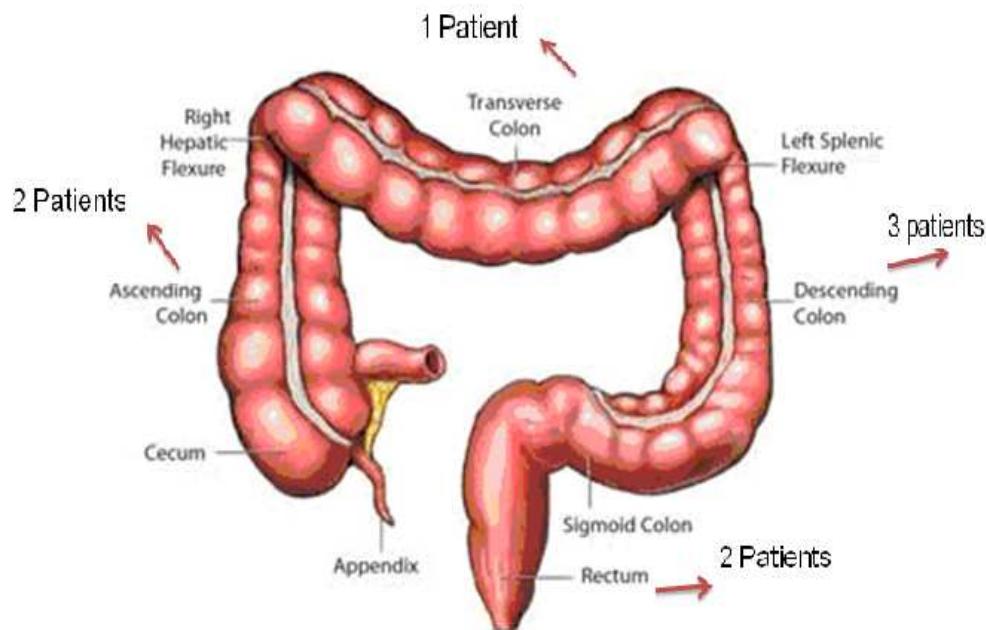


Figure 23 : localisation de la tumeur dans le colon

La taille des échantillons de notre étude reste insuffisante pour déterminer le pourcentage de la localisation de la tumeur dans le colon, mais il s'agit d'un pourcentage de (52,9%) de cancer colorectal au niveau du colon et de (47,1%) au niveau du rectum.

Avant de passer à l'étude immunohistochimique, une étude histologique est nécessaire pour déterminer le type de tumeur, son aspect ainsi que son stadification afin de déterminer l'étendue de la tumeur, et le choix du traitement, et il tient également compte de la propagation de la tumeur dans les organes voisins ou plus éloignés (métastases).

D'après plusieurs études qui est faite par **Faivre J** en France en 2001, Le cancer colorectal se situe le plus souvent au niveau du colon proximal, viennent ensuite le rectum et en dernier lieu le colon distal.

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 RAS proto-oncogène sont plus fréquemment localisées au niveau du coecum, du colon ascendant et du colon transverse.

A partir de nos résultats, on conclue que Les adénocarcinomes représentent 94% des cancers colorectaux. Le grade histologique de malignité défini par le degré de différenciation est un facteur prédictif aussi bien de l'invasion locorégionale, que de la dissémination métastatique. On définit 4 types de tumeurs :

- A) Tumeurs bien différenciées, B) Tumeurs moyennement différenciées, C) Tumeurs peu ou indifférenciées et D) Adénocarcinome colloïde ou mucineux.

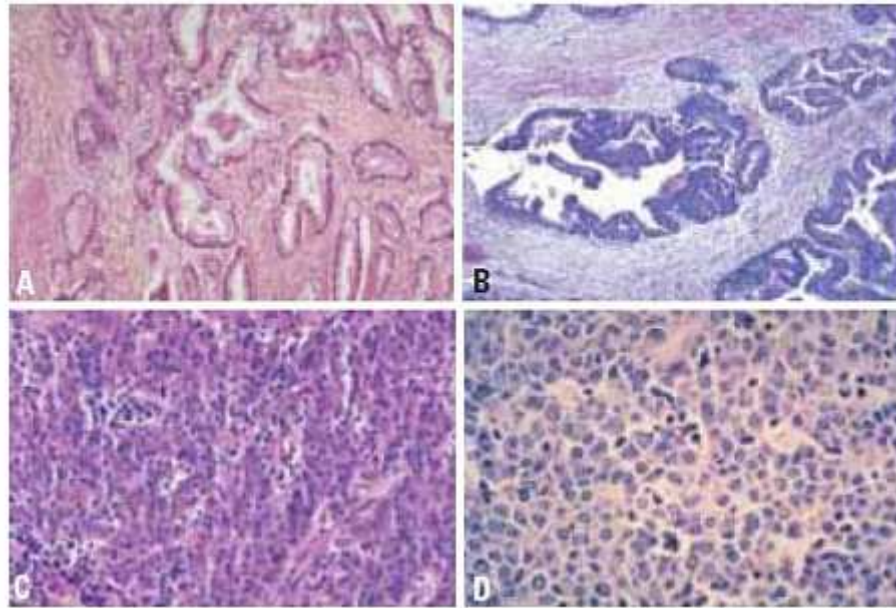


Figure 24 : adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation
Et enfin, le stade de la tumeur colorectale est déterminé par le pathologiste par microscopie, pour le bon choix de traitement ainsi d'étude moléculaire.

II- Etude immunohistochimique :

Sur 42 patients, une série de 15 patients a fait l'objet d'une étude immunohistochimique, visant à étudier l'expression des protéines de réparation des mésappariement, afin de garantir aux patients une meilleure prise en charge et un bon choix thérapeutique.

L'analyse immunohistochimique des protéines de réparation des mésappariement a été effectuée dans le laboratoire d'anatomie pathologique, sur une coupe histologique d'une tumeur colorectale.

Les résultats obtenus sont les suivants :

MLH1 tissu non tumoral : expression +

tissu tumoral : expression +

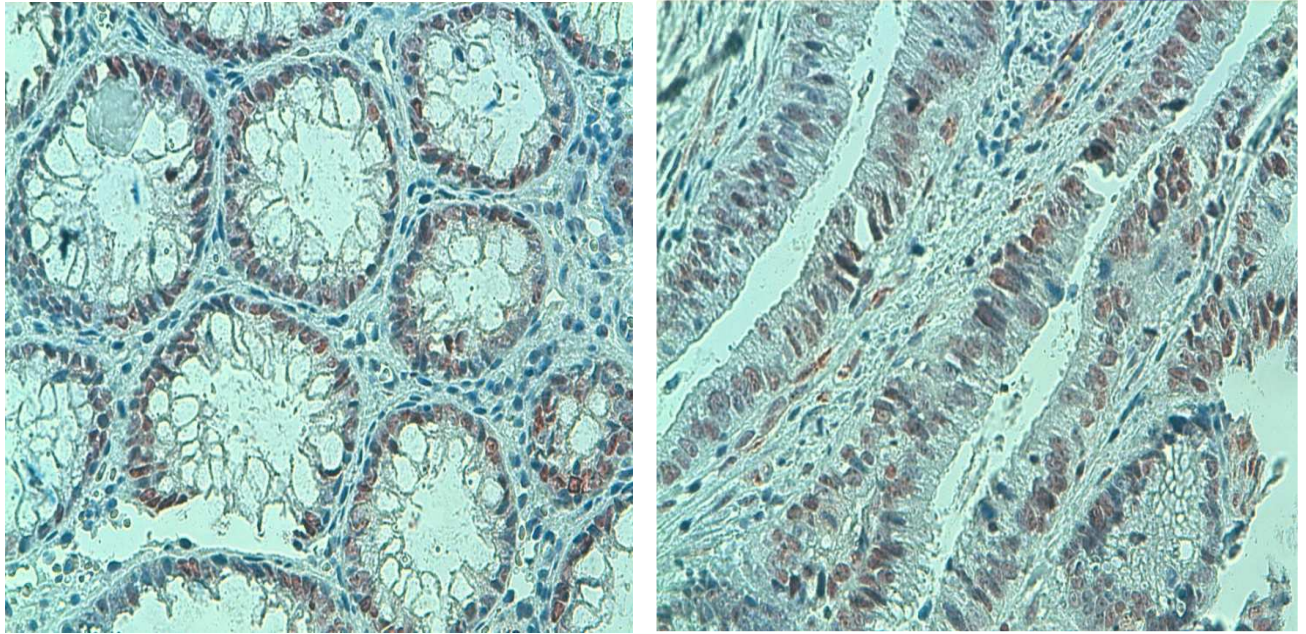


Figure 25 : résultats d'immunohistochimie présentant une expression de la protéine MLH1 du tissu sain et tumoral.

Le résultat montre sur le fragment de tissu tumoral, des glandes adénocarcinomeuses présentant une expression normale de la protéine MLH1 par la présence de coloration des noyaux. Cela ne permettra pas de savoir s'il ya une mutation ou pas, mais il faut s'assurer par l'étude moléculaire.

MSH2 : Tissu non tumoral: expression +

Tumeur: expression -

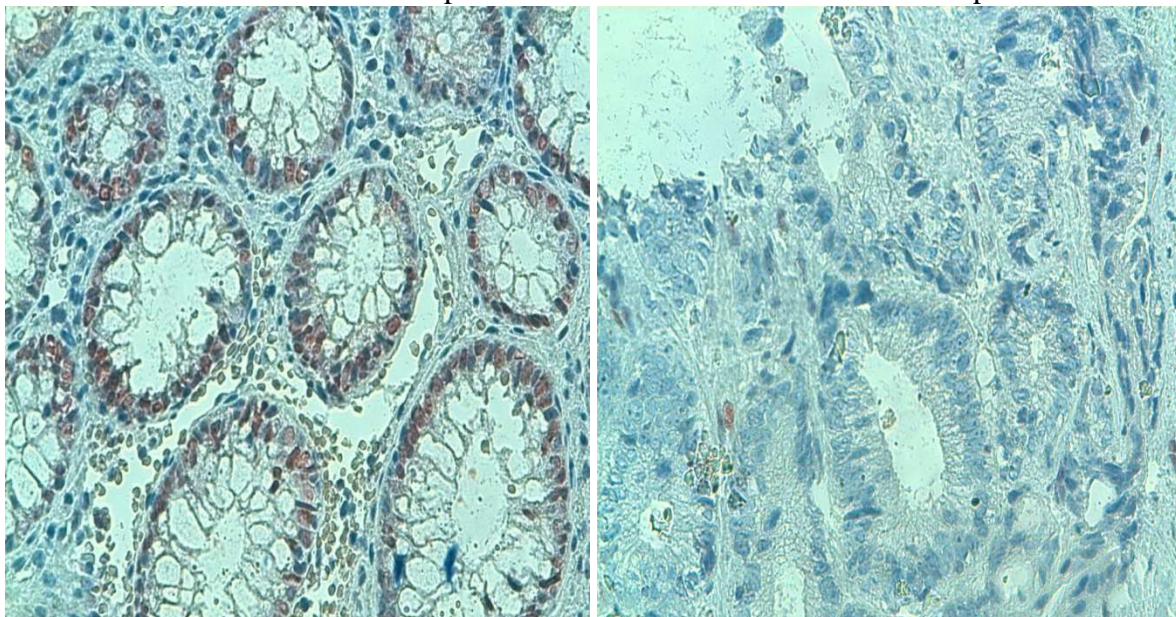
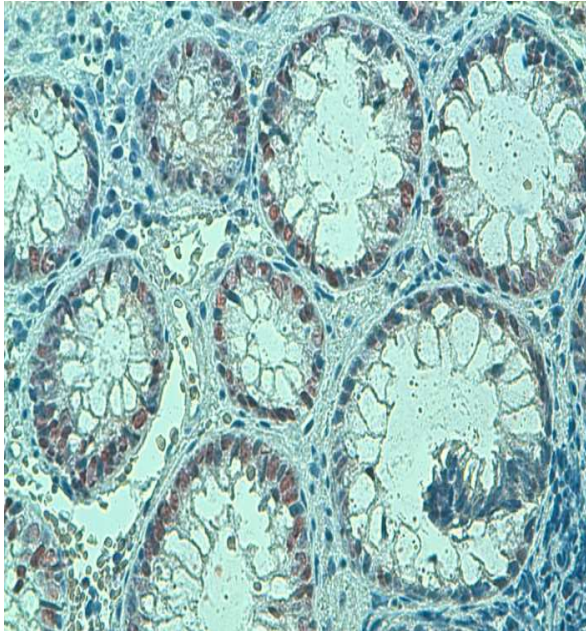


Figure 26 : résultat d'immunohistochimie présentant une extinction d'expression de la protéine MSH2 de tissu tumoral et expression de MSH2 de tissu sain grâce a la coloration du noyau.

MSH6 : Tissu non tumoral: expression +



Tumeur : expression -

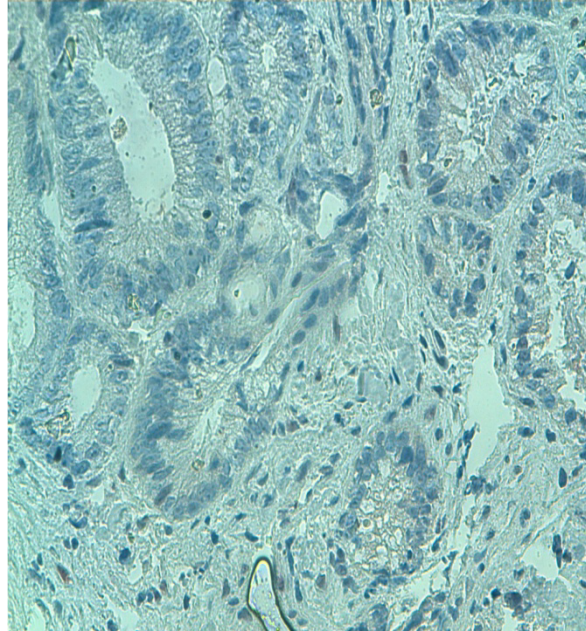


Figure 27 : résultat d'immunohistochimie présentant une extinction d'expression de la protéine MSH6 de tissu tumoral et expression de la protéine du tissu sain.

L'immunohistochimie qui est faite pour 15 cas, a montré une extinction de protéines de 7 cas :

- 3 patients ont une double extinction :
 - 2 patients ont une extinction de protéines (MLH1 ; PMS2)
 - 1 patient a une extinction de protéines (MSH2 ; MSH6)
- 1 patient a une triple extinction :
 - Extinction de protéines (MSH2 ; MSH6 ; PMS2)
- 1 patient a une extinction de la protéine : PMS2
- 1 patient a une extinction de la protéine : MLH1
- 1 patient a une extinction de la protéine : MSH6

L'expression des principales protéines du système MMR peut être actuellement étudiée à l'aide d'anticorps mono-clonaux disponibles dans le commerce depuis 1996 : hMLH1, hMSH2, hMSH6 et hPMS2.

D'après les résultats d'études de Svrcek M et al., faites en 2007, montrent qu'en cas de perte d'expression de la protéine hMLH1, on observe une perte d'expression conjointe de la protéine hPMS2. De la même manière, l'extinction de la protéine hMSH2 s'accompagne d'une extinction de la protéine hMSH6. À l'inverse, hMLH1 reste stable en l'absence de la protéine hPMS2 probablement du fait d'interactions avec d'autres homologues de MutL, tels que hPMS1 ou hMLH3, ce qui est confondu avec nos résultats.

Alors on peut aussi conclure que l'extinction de la protéine MLH1 peut être liée, soit à une mutation constitutionnelle de gène *MLH1* soit à une méthylation de son promoteur, en

relation, avec un mécanisme de sénescence de l'épithélium colique, qui est observé dans les cancers MSI sporadiques.

L'IHC peut toutefois être mise en défaut en cas de mutations faux sens, responsable d'une perte de fonction d'un gène *MMR*, sans perte d'expression du gène concerné.

Enfin, il est important d'avoir à l'esprit que les techniques d'IHC ne sont pas encore suffisamment standardisées, ni parfaitement reproductibles d'un cas à l'autre (en particulier avec hMLH1), ce qui rend leur interprétation difficile, vue sa grande sensibilité. D'où la nécessité d'une étude moléculaire.

III- Etude moléculaire :

Une série de 15 patients a fait l'objet d'une analyse moléculaire, visant à amplifier les gènes *MMR* et les analyser, ainsi que les gènes *KRAS* et *BRAF* et les séquencer

Même si on a trouvé l'extinction des protéines à partir de 7 cas, il est obligatoire de confirmer les résultats par la biologie moléculaire de tous les échantillons.

1) Amplification par PCR :

1.1 Résultats de PCR multiplex des Loci MSI :

Les produits d'amplification ont été visualisés sous U.V après électrophorèse sur gel d'agarose à 4%. Au premier temps ils ont faits 5 amorces, les résultats sont les suivants :

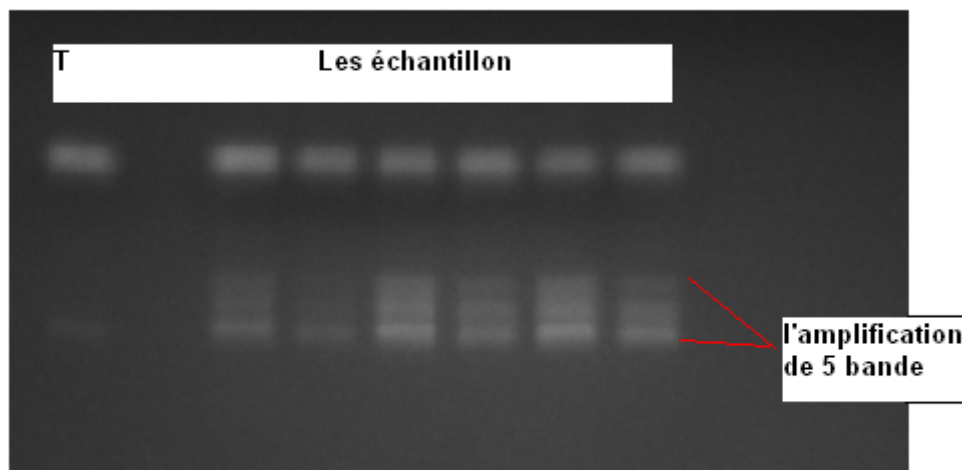


Figure 28 :

Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 4% des produits PCR des gènes *MMR* (5 amorces).

D'après la migration des amorces sur gel d'agarose on a pu remarquer le fonctionnement que de 3 amorces : NR22, NR24 et BAT25, vue la perte de la fluorescence.

La spécificité des séquences d'ADN amplifiés a été confirmée par comparaison à un marqueur de taille de dilution de 1/10.

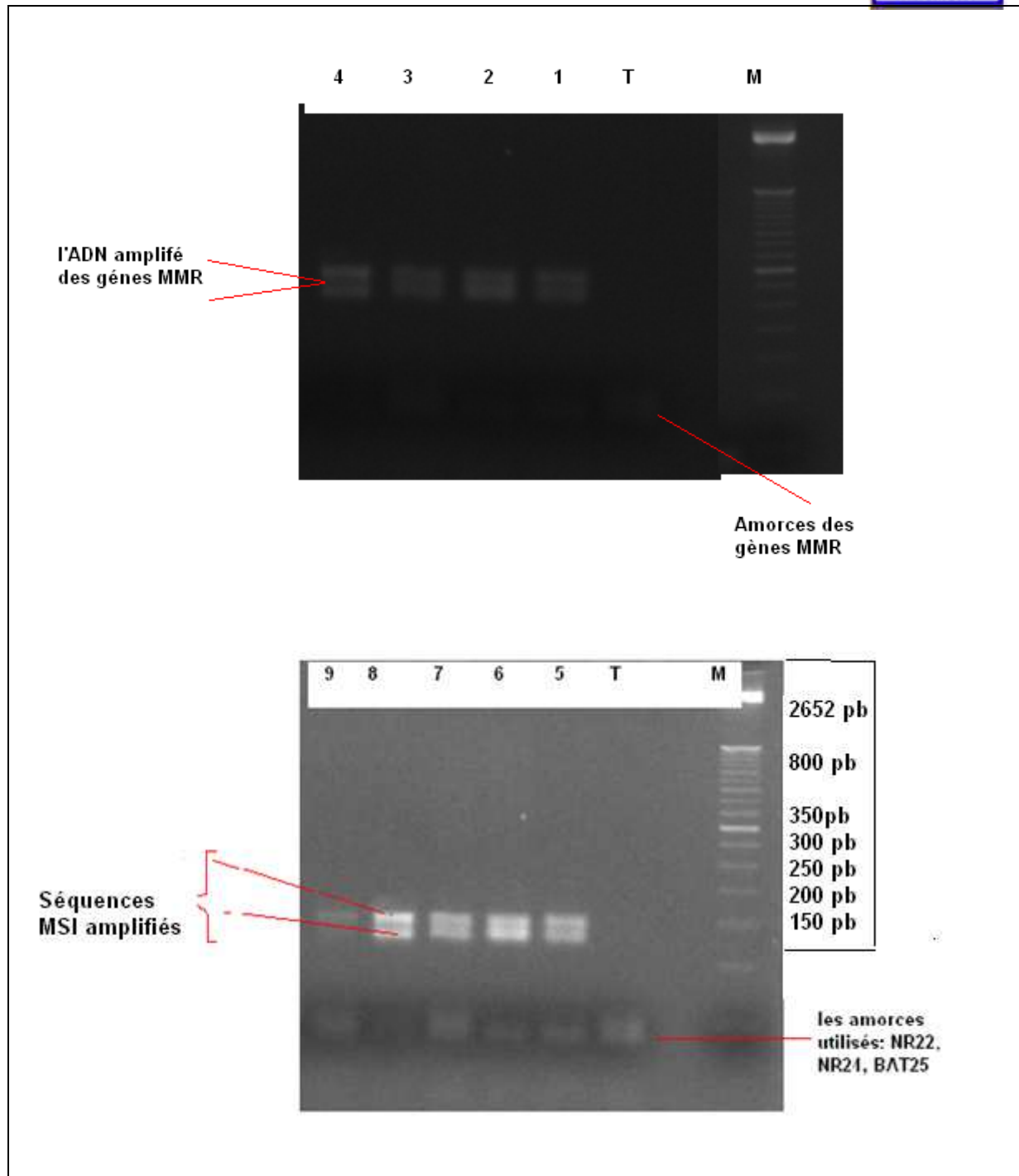


Figure 29 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 4% des produits PCR des gènes MMR

Le résultat PCR montre 3 bandes correspondant à la séquence amplifiée des gènes MMR de taille proche et approximative de (140, 135, 125 pb), pour 15 patients atteints du cancer colorectal. Les puits T correspondent aux témoins négatifs exempts d'ADN, et les puits M correspondent au marqueur de taille.

Cet ADN amplifié a été analysé au CURI pour la recherche du phénotype d'instabilité des microsatellites.

En effet, la comparaison des cellules tumorales vs cellules normales est rendue nécessaire par le polymorphisme des marqueurs utilisés.

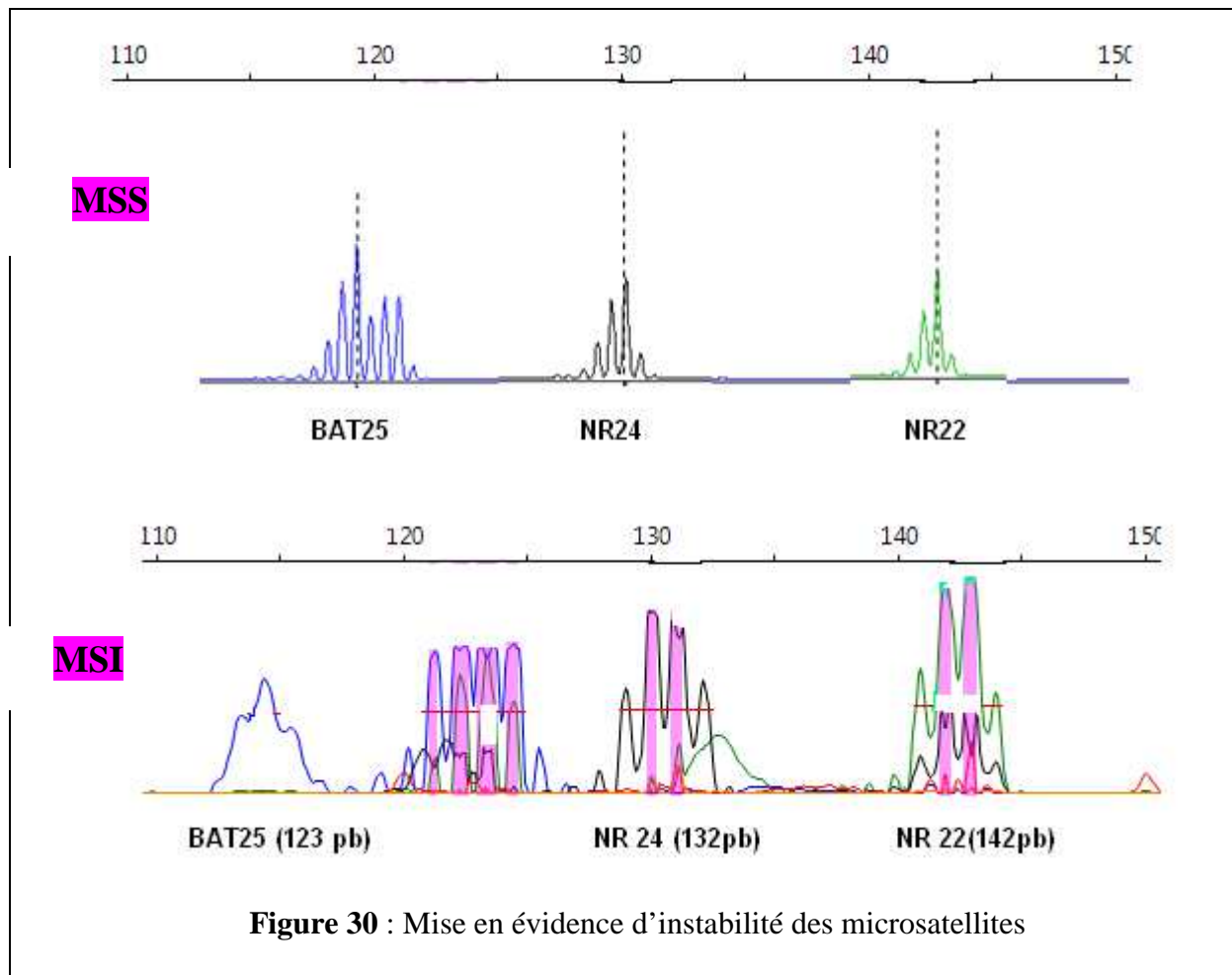


Figure 30 : Mise en évidence d'instabilité des microsatellites

Pour parler d'instabilité de microsatellites à l'aide de ces marqueurs, seulement 3 marqueurs des 5 sont instables. (d'après **Buhard O et ces collègues ., 2006**), Dans le cas contraire, il n'y a pas d'instabilité de microsatellites.

Certains auteurs parlent de MSI-L (MSI-low) lorsqu'il y a un marqueur instable, et de statut MSS (MSI-stable) lorsqu'aucun marqueur n'est instable.

En pratique, deux ou plus de marqueurs instables signent le statut MSI positif et zéro ou un marqueur instable signe l'absence de statut MSI (MSI négatif).

Après PCR multiplex l'utilisation de marqueurs quasi-monomorphiques a permis de démontrer qu'il était inutile d'étudier l'ADN normal du patient, l'ADN tumoral étant suffisamment informatif pour déterminer le statut MSI avec ces marqueurs.

D'après l'analyse qu'on a effectuée au CURI on a obtenu une instabilité microsatellitaire de 12 patients, dont 7 seulement ont une extinction de l'expression des protéines de réparation des mésappariement. Donc on parle d'instabilité des microsatellites (MSI-H). Ce qui confirme la sensibilité et la faible reproductibilité de technique d'immunohistochimie. (Figure 29).

Cependant, l'analyse de ce profil génétique pourrait permettre de préciser son pronostic et de mieux cibler la chimiothérapie.

Plusieurs études faites par (**Gryfe R et al., en 2000** et **Ribic CM et al., en 2003**) rapportent une augmentation de la survie des patients porteurs d'une tumeur MSI par rapport aux

tumeurs MSS (stabilité des microsatellites), indépendamment des autres facteurs pronostiques. Cette notion est encore controversée, mais semble très prometteuse.

Trois molécules de chimiothérapie ont fait la preuve de leur efficacité dans le CCR : il s'agit du 5-FU, avec ou sans levamisole, de l'oxaliplatine, et de l'irinotecan (ou CPT11).

L'ajout de l'oxaliplatine au 5FU (FOLFOX) améliore le traitement adjuvant des CCR de stade III en réduisant le risque de récurrence et en améliorant la survie globale.

Dans une étude récente, le phénotype MSI était associé à une meilleure réponse au traitement par FOLFOX.

Cette étude suggère également que seules les tumeurs surexprimant p53 bénéficieraient de l'ajout de l'oxaliplatine au 5FU.

Par ailleurs, en 2003 une étude rapportait aussi que la présence de MSI était prédictive de la réponse à l'irinotecan (inhibiteur de la topo-isomérase I) chez les patients à un stade avancé du cancer. La discussion est cependant encore ouverte

Toutes ces données sont à interpréter avec précaution pour leur utilisation en pratique clinique et nécessitent d'être confirmées par des études prospectives randomisées.

La mutation du gène BRAF (V600E) est présente dans environ 40 % des cancers du côlon sporadique ayant un statut MSI positif. D'où la nécessité d'une étude moléculaire de ce gène.

1.2 Résultats de PCR du gène BRAF exon 15 :

Nous avons effectué la PCR du gène BRAF pour 15 patients, dans le but de rechercher la mutation ponctuelle de ce gène dans l'exon 15. Cet exon comprend le codon 600 du gène BRAF, où se produit fréquemment la mutation de ce gène comme la plupart des auteurs l'ont rapporté [36].

Ensuite, 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.

Les résultats de PCR sont les suivants :

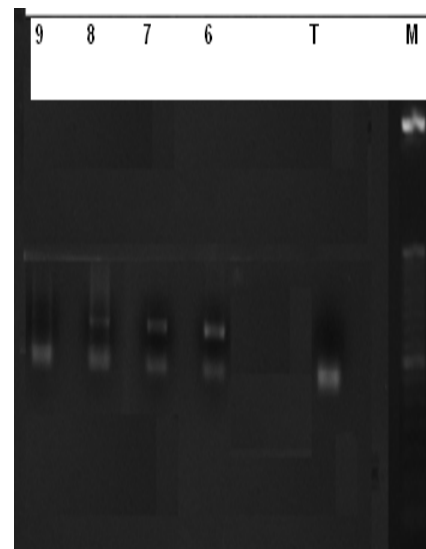
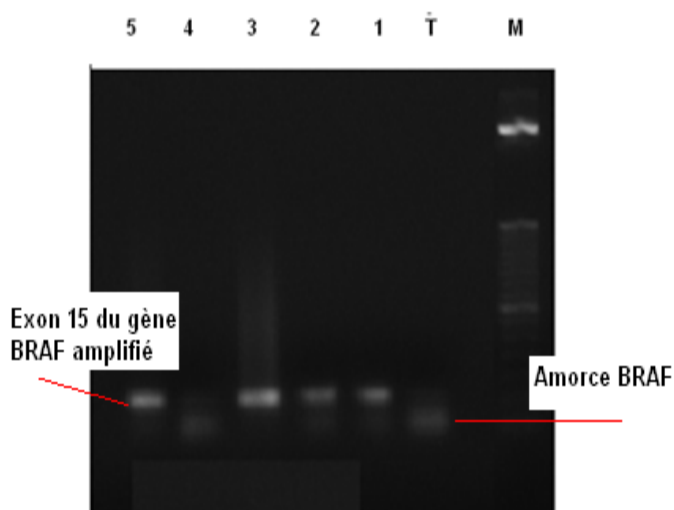
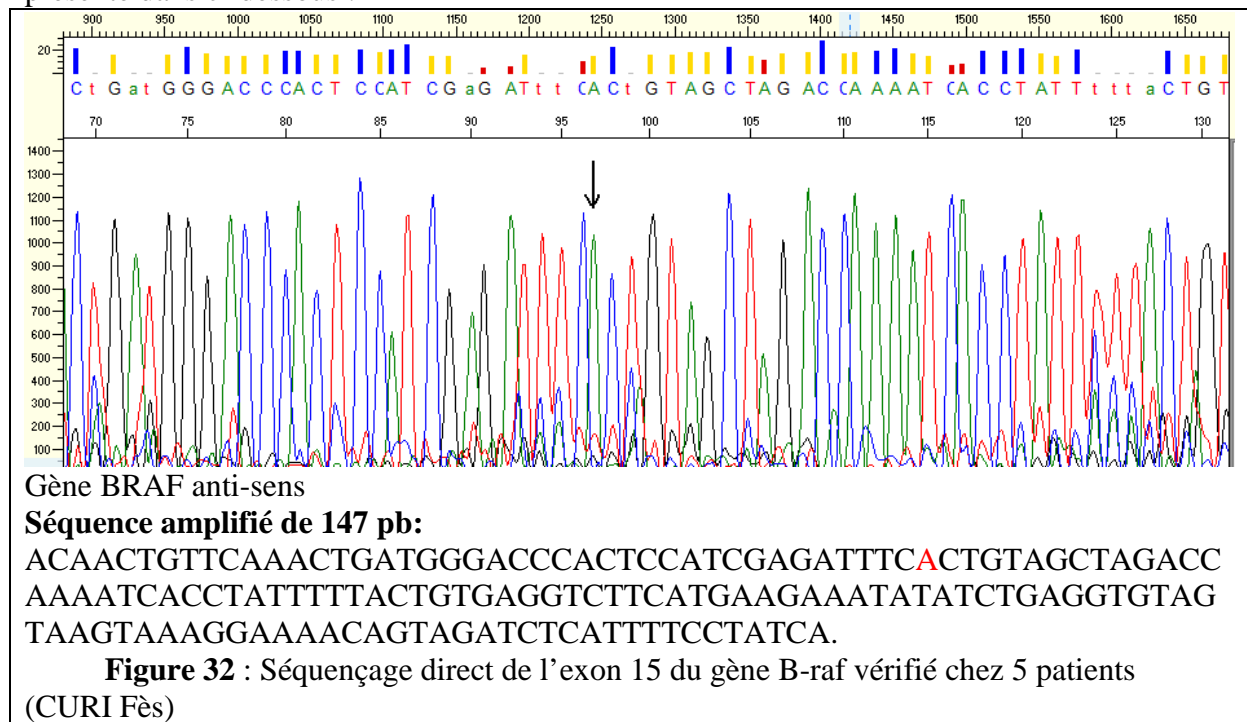


Figure 31 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15

Le résultat PCR montre une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 15 du gène BRAF d'une taille approximative de (143), pour 15 patients atteints du cancer colorectal. Les puits **T** correspondent aux témoins négatifs exempts d'ADN, et les puits **M** correspondent au marqueur de taille.

Les ADN amplifiés doit être séquencer afin de mettre en évidence la présence ou non de la mutation ponctuelle T1799A touchant l'exon 15 de ce gène. Cependant on n'a pas pu séquencer l'ADN des 15 patients.

Alors que, d'après les résultats précédents faite au laboratoire du génétiques au CHU Hassan II, la séquence du gène BRAF, et la position de la mutation ponctuelle si elle existe est présenté dans ci-dessous :



N.B : la base **A** en rouge montre la localisation de la mutation si elle existe. (A/T)

B-raf :

Score = 272 bits (147), Expect = 3e-71
 Identities = 147/147 (100%), Gaps = 0/147 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 1
ACA A C T G T T C A A A C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C G A G A T T T C A C T G T A G C T A G A C C A A A A T 60
|||||
Sbjct 1048718
ACA A C T G T T C A A A C T G A T G G G A C C C A C T C C A T C G A G A T T T C A C T G T A G C T A G A C C A A A A T 1048777

Query 61
C A C C T A T T T T T A C T G T G A G G T C T T C A T G A A G A A T A T A T C T G A G G T G T A G T A A G T A A A G G 120
|||||
Sbjct 1048778
C A C C T A T T T T T A C T G T G A G G T C T T C A T G A A G A A T A T A T C T G A G G T G T A G T A A G T A A A G G 1048837
  
```

```

Query 121      AAAACAGTAGATCTCATTTCCTATCA 147
                |||
Sbjct 1048838 AAAACAGTAGATCTCATTTCCTATCA 1048864
  
```

Figure 33 : Alignement entre le segment du gène BRAF amplifié par l’amorce BRAF-15R et le segment de référence dans les bases de données.

L’alignement montre un degré d’homologie de 100% pour la séquence de l’exon 15 du gène BRAF, ce qui confirme l’absence de la mutation T1799A. De façon plus spécifique, les mutations de gène BRAF surviennent presque exclusivement dans des CCR MSI sporadiques présentant une méthylation du gène MLH1.

Ces données suggèrent que les mutations activatrices de BRAF sont liées au caractère sporadique du phénotype MSI. Cette mutation est retrouvée plus rarement dans les cancers du côlon sporadiques sans MSI [37]. Dans ce dernier cas, elle serait associée à un moins bon pronostic [58]. La mutation V600E est ainsi étroitement corrélée à l’hyperméthylation du promoteur du gène MLH1 et donc à l’absence d’expression de ce dernier gène.

D’après un travail de Kadiyska et al., 2007, la mutation a été détectée chez 8 sur 140 patients atteints de CCR (5,7%) et présentant des caractéristiques communes telles que le statut MSI et la localisation approximative de la tumeur

Certains auteurs ont alors proposé d’associer systématiquement la recherche de cette mutation à la recherche de MSI, la présence de la mutation V600E affirmant un cancer sporadique en présence d’une tumeur colique avec MSI ce qui éviterait la recherche de mutations dans les gènes MMR.

Par ailleurs, la mutation sur le gène BRAF est le plus souvent mutuellement exclusive avec la mutation sur le gène KRAS, les mutations sur ce dernier gène étant essentiellement associées à un cancer du côlon sans instabilité de microsatellites.

D’après l’étude de Laurent-Puig P et al., en 2009 ; cinquante pour cent des malades dont le cancer ne présente pas de mutation de gène KRAS ne répondent pas aux anticorps anti-EGFR. Dans ce contexte, la mutation activatrice de BRAF, pourrait constituer d’autres biomarqueurs de résistance. Les mutations de BRAF, mutuellement exclusives de celles de KRAS, constituent un facteur de résistance aux anticorps anti-EGFR obéissant aux mêmes mécanismes que les mutations de KRAS. Il existe un point chaud de mutation au niveau du quinzième exon du gène BRAF, représentant plus de 90 % des mutations observées, responsable du changement d’une valine en acide glutamique en position 600 (V600E), du fait de la transversion T1799A. La région mutée correspond au domaine kinase de la protéine, qui est une sérine/thréonine kinase. La mutation de BRAF, outre sa valeur prédictive négative, représente également un facteur de très mauvais pronostic.

Donc on peut conclure que le rôle des mutations du gène BRAF chez les patients traités par des agents anti-EGFR est identique à celui joué par les mutations du gène KRAS. Ils proposent que l’analyse combinée des mutations de KRAS et BRAF soit utilisée pour sélectionner prospectivement les patients atteints de CCR éligibles pour un traitement par les anti-EGFR.

D’où la nécessité d’étudier par la biologie moléculaire la mutation du gène KRAS.

1.3 Résultats de PCR du gène KRAS exon 2 :

La PCR a été réussie pour les 15 patients en utilisant les deux amorces **KRAS 2 bis +** et **KRAS 2 bis-**. Ensuite, 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 34).

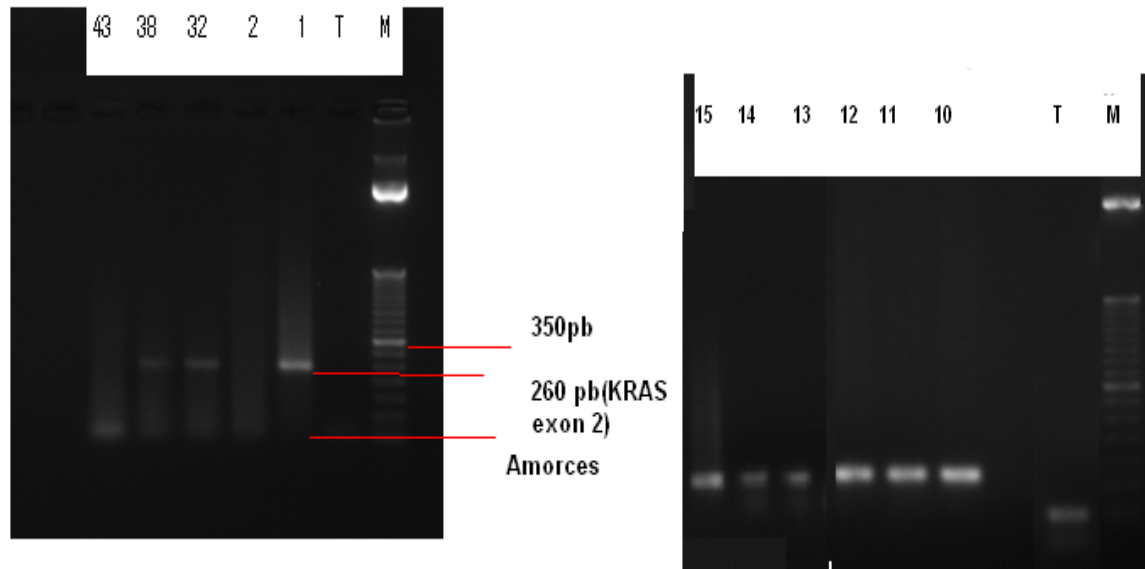


Figure 34 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène KRAS exon 2

Le résultat PCR montre une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 2 du gène KRAS d'une taille approximative de (110), pour 15 patients atteints du cancer colorectal. Les puits **T** correspondent aux témoins négatifs exempts d'ADN, et les puits **M** correspondent au marqueur de taille.

Ensuite les ADNs amplifiés correspondant au gène KRAS ont été séquencés afin de mettre en évidence la présence ou non des mutations touchant plus fréquemment les codons 12 et 13 de l'exon 2. Les résultats sont les suivants :

La séquence sauvage du gène KRAS exon 2 est la suivante:

Codon
d'initiation
cgggtttgatt agGCCTGCTGAA↓A [ATG] ACTG AATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCG
TAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCA TTTTGTGGACGAATA
TGATCCAACAATAGAGgtaaactctgtttaatatgcatattactggtgcaggaccattcttgatacagataaacccg
codon 12
codon 13

D'après nos résultats la séquence qu'on trouve est ci-dessous :

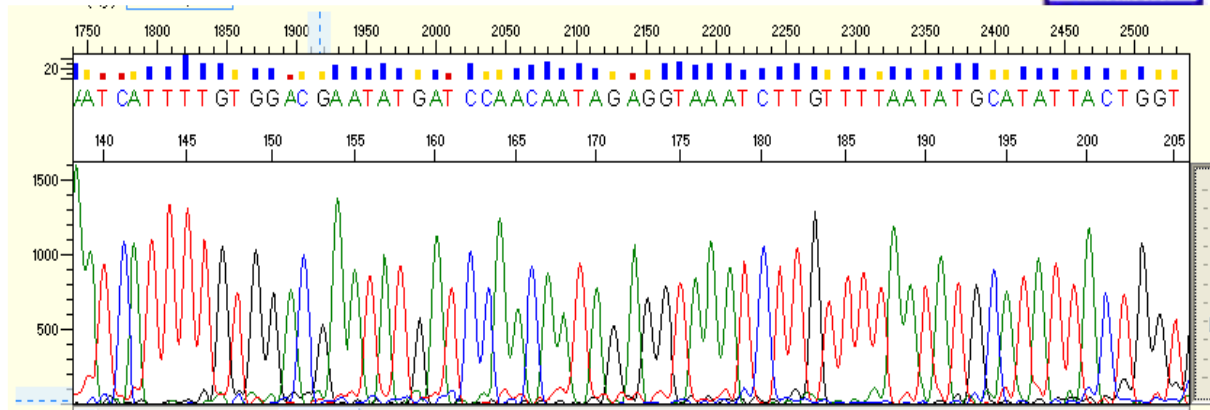


Figure 35: Séquençage direct de l'exon 2 du gène KRAS (CURI Fès)

La séquence amplifiée exon 2 de 115 pb:

GAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATT
TGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTT

Le codon en rouge = codon 12 "G/A"GT

}

La position des mutations si elles existent

Le codon en bleu = codon 13 G"G/A" C

Score = 180 bits (97), Expect = 1e-43
Identities = 97/97 (100%), Gaps = 0/97 (0%)
Strand=Plus/Minus

```

Query 1
GAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATT TGTGG 60
|||||
Sbjct 18158414
GAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATT TGTGG 18158355

Query 61          ACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTT 97
                  |||||
Sbjct 18158354    ACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTT 18158318
    
```

Figure 36 : Alignement entre le segment du gène KRAS amplifié par l'amorce KRAS 2-Bis+ et le segment de référence dans les bases de données.

L'alignement montre un degré d'homologie de 100% pour toutes les séquences de l'exon 2 qu'on a séquencé, ce qui confirme l'absence de la mutation des codons 12 et 13.

De nombreuses études ont démontré qu'en absence de mutations KRAS, le cetuximab et le panitumumab seuls ou en association avec d'autres anticancéreux (cf. 5-fluoro-uracil, irinotecan, oxaliplatine) amélioreraient la survie des patients et le taux de réponse anti-tumorale. En particulier le rôle du gène oncogénique KRAS a fait l'objet d'analyse approfondies ayant

abouti à la conclusion que la survenue de mutations de KRAS constitue un marqueur prédictif de la résistance aux anti-EGFR.

Quatre-vingt-dix pour cent de ces mutations sont situées sur les codons 12 et 13 du gène codant pour KRAS (70 % pour le codon 12 et 30 % pour le codon 13). Dans quelques cas, on en retrouve au niveau des codons 61 et 63. Rouleau E et al., en 2008 a été démontré, par ailleurs, que ces mutations étaient mutuellement exclusives de celles présentes sur le gène EGFR.

Plusieurs études ont comparé les patients ayant une mutation KRAS et ceux ne l'ayant pas au cours d'un traitement avec un anti-EGFR. De manière générale, chez les patients n'ayant pas la mutation KRAS sur les codons 12 et 13, 59,3 % obtenaient une réponse anti-tumorale lors d'un traitement contenant du cetuximab contre 43,2 % parmi ceux qui ne prenaient pas de cetuximab. En présence d'une mutation sur un des deux codons, il n'y avait plus de différence de réponse avec ou sans cetuximab. De manière plus générale, 3 % des sujets ayant une mutation KRAS répondent au traitement par les anti-EGFR contre 27 % des sujets n'ayant pas de mutation KRAS.

Conclusion et perspectives

L'utilisation de la biologie moléculaire et la génétique est devenue désormais un outil clé dans le diagnostic du cancer colorectal. Elles permettent à la fois la détermination des facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR, par la recherche de mutations des gènes KRAS et BRAF et sélectionner les patients ayant une absence de mutations de ces gènes, pour prescrire un anticancéreux et éviter un traitement coûteux, non dénué d'effets toxiques potentiels.

mais aussi la détermination du statut MSI des tumeurs qui devrait être entreprise chez tout sujet présentant un cancer du colon avant l'âge de 60 ans pour adapter le traitement, et pour mieux déterminer le pronostic et de modifier les indications de chimiothérapie.

Vu l'importance de ce sujet certes très vaste et qui demande un travail laborieux, on n'a pas pu cerner toutes les études devant être mise en œuvre pour le dépistage et l'évaluation de la prédisposition héréditaire au CCR, nous citons :

- Etude des autres gènes de la prédisposition héréditaire au cancer colorectal par amplification et recherche de leur mutation caractéristiques à savoir :
 - Gènes MMR du système de réparation des mésappariements de l'ADN : MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 ET MSH6 impliqués dans le syndrome HNPCC
 - Gène APC impliqué dans la polypose adénomateuse familiale PAF
 - Gène KRAS
- Analyse d'instabilité des microsatellites MSI par PCR multiplex
- Analyse de perte d'hétérozygotie qui atteint les chromosomes 5 et 18
- Caryotype métaphasique sur tumeur pour mise en évidence de la monosomie 18 dans les tumeurs colorectales
- Technique FISH sur tissu tumoral pour la détection du nombre de copies du gène de l'EGFR dans les tumeurs colorectales avant et après traitement avec les anticorps anti-EGFR.

Références bibliographiques

- 1) Sidney J, (2007). Colorectal cancer screening. Best Practice & Research Clinical Gastroenterology, Volume 21, Issue 6. Pp : 1031-1048.
- 2) Menegoz F, Black RJ, Arveux P, Magne V, Ferlay J, Buemi A et al. Cancer incidence and mortality in France in 1975-1995. Eur J Cancer Prev 1997;6: 442-466
- 3) Benhamiche AM. Cancer du côlon: épidémiologie descriptive et groupes à risque élevé. Gastroentérol Clin Biol 1998 ; 22 (suppl 3bis) : S3-S11
- 4) Boutron-RuaultMC, Laurent-Puig P. Épidémiologie, cancérogenèse, facteurs de risque, prévention et dépistage du cancer colorectal. In : Rambaud JC ed. Traité de gastroentérologie. Paris : Flammarion Médecine Sciences, 2000 : 541-549
- 5) Boutron-Ruault MC, Senesse P, Faivre J, Couillaud C, Belghiti C. Folate and alcohol intakes: related or independent roles in the adenoma-carcinoma sequence? Nutr Cancer 1996 ; 26 : 337-347
- 6) Bostick RM, Potter JD, Kushi LH, Sellers TA, Steinmetz KA, McKenzie DR et al. Sugar, meat and fat intake, and non-dietary risk factors for colon cancer incidence in Iowa women (United States). Cancer Causes Control 1994;5: 38-52
- 7) Faivre J, Boutron MC, Senesse P, Couillaud C, Belghiti C, Meny B. Environmental and familial risk factors in relation to the adenoma-carcinoma sequence: results of a case control study in Burgundy (France). Eur J Cancer Prev 1997; 6 : 127-131
- 8) Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: a dose-response meta-analysis of epidemiological studies. Int J Cancer 2002 ; 98 : 241-256
- 9) Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM. Colon cancer, a review of the epidemiology. Epidemiol Rev 1993 ; 15 : 499-545
- 10) Boutron-RuaultMC, SenesseP, MeanceS, BelghitiC, FaivreJ. Energy intake, body mass index, physical activity and the colorectal adenoma-carcinoma sequence. Nutr Cancer 2001 ; 39 : 50-57
- 11) HoweG, BenitoE, CastellatoR, CorneeJ, EsteveJ, Gallagher RP et al. Dietary intake of fiber and decreased risk of cancers of the colon and rectum: evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. J Natl Cancer Inst 1992; 84 : 1887-1896
- 12) Bonithon-KoppC, KronborgO, Giacosa A, RåthU, Faivre J, for the ECP study group. Calcium and fiber supplementation in the prevention of colorectal adenoma recurrence: a placebo-controlled intervention trial from the European cancer prevention organisation (ECP). Lancet 2000; 356 : 1300-1306
- 13) Ponz de LeonM, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary non-polyposis colorectal cancer in the general population. Cancer 1993 ; 71 : 3493-3501
- 14) (Hould, et al 2009).
- 15) (Bretagnol et al, 2010).

- 16) Cancer colorectal (148) J.F. BOSSET, P. ROUANET Décembre 2005 (mise à jour décembre 2005), Université Médicale Virtuelle Francophone, Polycopié national de cancérologie
- 17) Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol* 1932 ; 35 : 323-332
- 18) Astler VB, Collier FA, Arbor A. The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum. *Ann Surg* 1954 ; 139 : 846-852
- 19) Sobin LH, Wittekind C. International union against cancer (UICC). TNM classification of malignant tumors. New York : John Wiley and Sons, 1997
- 20) Blanchard J-M. (2003) Des oncogènes aux régulateurs de la mitose : un changement de perspective dans notre vision des processus cancéreux. *Med Sci (Paris)*. 19. pp : 187-99
- 21) Philippe T., Marie-Odile J. « Pathologie moléculaire du cancer du colon : vers la mise en place de stratégies diagnostiques intégrées ». (2002) *Ann Pathol*. pp : 253-7.
- 22) Jenkinson F., Steele R.J.C. (2010). Colorectal cancer screening _ Methodology. *The Surgeon, Journal of the Royal Colleges of Surgeons of Edinburgh and Ireland The surgeon* 8. pp : 164-171.
- 23) Albertson DG, Collins C, McCormick F, Gray JW. Chromosome aberrations in solid tumors. *Nat Genet* 2003; 34: 369–76.
- 24) Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 1998; 396: 643–9.
- 25) Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001; 1: 55–67.
- 26) Kaplan KB, Burds AA, Swedlow JR, Bekir SS, Sorger PK, Nathke IS. A role for the Adenomatous Polyposis Coli protein in chromosome segregation. *Nat Cell Biol* 2001; 3: 429–32.
- 27) Duval A, Hamelin R. Réparation des erreurs de réplication, microsatellites et cancer. *Med Sci (Paris)* 2003; 19: 55–62.
- 28) Wheeler JM, Bodmer WF, Mortensen NJ. DNA mismatches repair genes and colorectal cancer. *Gut* 2000; 47: 148–53.
- 29) Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, Lipton L, Tomlinson I, Karja V, et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* 2003; 163: 827–32.
- 30) Lipton L, Halford SE, Johnson V, Novelli MR, Jones A, Cummings C, et al. Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway. *Cancer Res* 2003; 63: 7595–9.
- 31) Frazier ML, Xi L, Zong J, Viscofsky N, Rashid A, Wu EF, et al. Association of the CpG island methylator phenotype with family history of cancer in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 2003; 63: 4805–8.
- 32) Issa JP. The epigenetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 910: 140–53.
- 33) Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, Issa JP. Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 710–5.
- 34) Van Rijnsoever M, Elsaleh H, Joseph D, McCaul K, Iacopetta B. CpG island methylator phenotype is an independent predictor of survival benefit from 5-fluorouracil in stage III colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 2898–903.
- 35) Chuong H., Srabani B., Shaila M. (2003). Le diagnostic moléculaire au regard de syndromes de prédisposition à un cancer héréditaire: le dépistage génétique et son retentissement Clinique. 41. pp : 1-18-28 .

- 36) Viguier J., Bourlier P., Karsenti D., De Calan L., Danquechin Dorval E. (2003). Cancer du colon. Encyclopédie médico-chirurgicale, Gastroentérologie. p : 18
- 37) de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:769-780.
- 38) Groden J, Thliveris A, Samowitz W et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991; 66: 589-600.
- 39) Kinzler KW, Nilbert MC, Su LK et al. Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* 1991; 253: 661-665.
- 40) Fearnhead NS, Britton MP, Bodmer WF. The ABC of APC. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 721-733.
- 41) Fodde R, Smits R, Clevers H. APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nat Rev Cancer* 2001;1: 55-67.
- 42) Olschwang S. Les polyposes intestinales: aspects génétiques. *Gastro-enterol Clin Biol* 2001;25:B26-B30
- 43) Ahnen D.J., (2001). Colorectal cancer screening in average and high risk groups. *Adv Intern Med.* 46. pp : 77-106. vv
- 44) Powell S.M., Zilz N., Beazer Y., Bryan T.M., Hamilton S.R., Thibodeau S.N. (1992). APC mutation occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature.* 359. pp : 235-237.
- 45) Frebourg T, Mauillon J, Thomas G, Olschwang S. Le cancer colorectal héréditaire non polyposique: définition, génétique, diagnostic e surveillance médicale. *Gastroenterol Clin Biol* 2003;27:708-14.
- 46) Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la ChapelleA, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214-8.
- 47) Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, et al. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 105-10.
- 48) Chung DC, Rustgi AK. The hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: genetics and clinical implications. *Ann Intern Med* 2003;138:560-570.
- 49) Gimbaud R, Selves J. Dépistage des formes héréditaires de cancer colorectal non liées à la polypose (HNPCC). *J Chir* 2003;140:317-323.
- 50) Berends M.J., Hollema H., WU Y., Sluis T., Mensink R.G., Hoor K.A. (2001). MLH1 and MSH2 protein expression as a pre-screening marker in hereditary and non-hereditary endometrial hyperplasia and cancer . *Int J Cancer* 92 (3). pp: 398-403.
- 51) Jarvinen H.J., Mecklin J.P., Sistonen P. (1992). Scree ning reduces colorectal cancer rate in families of childhood soft-tissue-sarcoma patients. *Am J Hum Genet* 51 (2). pp: 344-356.
- 52) Sampson JR, Dolwani S, Jones S, Eccles D, Ellis A, Evans DG, et al. Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* 2003; 362: 39-41.
- 53) Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinimann K, Fidalgo P, Phillips RK, et al. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-lin mutations in MYH. *N Engl J Med* 2003; 348: 791-9.
- 54) Teniere P, Songne K, Frebourg T, Moguelet P, Foulatier O, Michot F, et al. Polypose juvénile familiale. Intérêt de l'étude génétique et place du traitement chirurgical. *Gastroenterol Clin Biol* 2002;26:1047-50.

- 55) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61: 759–67.
- 56) Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med* 2002; 137: 603–12.
- 57) Neibergs HL, Hein DW, Spratt JS. Genetic profiling of colon cancer. *J Surg Oncol* 2002;80:204–13.
- 58) Chung DC. The genetic basis of colorectal cancer: insights into critical pathways of tumorigenesis. *Gastroenterology* 2000; 119: 854–65.
- 59) Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759–67.
- 60) Yarden Y. The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities. *Eur J Cancer* 2001; 37(Suppl4):S3-8.
- 61) Lamoril J., Deybach J.-C., Bouizegarenea P. (2006). Microsatellites instability in colon cancer. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*. pp 211-222.
- 62) Span M, Moerkerk PT, de Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996; 69: 241-5.
- 63) Peyssonnaud C, Eychéne A. (2001). The Raf/MEK/ERK pathway: new concepts of activation. *Biology of the cell*, Volume 93, Issues 1-2. pp: 53-62
- 64) (Gaedcke J., Grade M., Jung K., Schirmer M., JO P., Obermeyer C., Wolff A., Herrmann K., Beissbarth T. (2010). KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Radiotherapy and Oncology* 94. pp: 76-81.
- 65) Lièvre A, Blons H, Laurent-Puig P. Oncogenic mutations as predictive factors in colorectal cancer. *Oncogene* 2010; 29(21): 3033-43.
- 66) De La Chapelle A. Microsatellite instability. *N Engl J Med* 2003;349: 209–10.
- 67) Jiricny J, Marra G. DNA repair defects in colon cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2003; 13(1):61-9.
- 68) Fransen K, Klintenas M, Osterstrom A, Dimberg J, Monstein HJ, Soderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2004; 25: 527–33.
- 69) Li WQ, Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 2006; 5:2.
- 70) Lubomierski N, Plotz G, Wormek M, Engels K, Kriener S, Trojan J, et al. BRAF mutations in colorectal carcinoma suggest two entities of microsatellite-unstable tumors. *Cancer* 2005; 104: 952–61.
- 71) Samowitz WS, Sweeney C, Herrick J, Albertsen H, Levin TR, Murtaugh MA, et al. Poor survival associated with the BRAF V600E mutation in microsatellite-stable colon cancers. *Cancer Res* 2005; 65: 6063–9.
- 72) Chang SC, Lin JK, Yang SH, Wang HS, Li AF, Chi CW. Relationship between genetic alterations and prognosis in sporadic colorectal cancer. *Int J Cancer* 2006; 118: 1721–7.
- 73) Deng G, Bell I, Crawley S, Gum J, Terdiman JP, Allen BA, et al. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 191–5.

- 74) Kambara T, Simms LA, Whitehall VL, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, et al. BRAF mutation is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut* 2004; 53: 1137–44.
- 75) Rajagopalan H, Bardelli A, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature* 2002; 418:934.
- 76) Domingo E, Laiho P, Ollikainen M, Pinto M, Wang L, French AJ, et al. BRAF screening as a low-cost effective strategy for simplifying HNPCC genetic testing. *J Med Genet* 2004; 41:664–8.
- 77) Konishi K, Takimoto M, Kaneko K, Makino R, Hirayama Y, Nozawa H, et al. BRAF mutations and phosphorylation status of mitogen-activated protein kinases in the development of flat and depressed-type colorectal neoplasias. *Br J Cancer* 2006; 94:311–7.
- 78) Kruhoffer M, Jensen JL, Laiho P, Dyrskjot L, Salovaara R, Arango D, et al. Gene expression signatures for colorectal cancer microsatellite status and HNPCC. *Br J Cancer* 2005; 92: 2240–8.
- 79) Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 2006;14 (4):390–402.
- 80) A Umar, R Boland, J Terdiman et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary non polyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer*
- 81) Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352(18):1851–60 *Inst* 2004 ; 96 : 261-8
- 82) Loukola A, Eklin K, Laiho P, Salovaara R, Kristo P, Jarvinen H, et al. Microsatellite marker analysis in screening for hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Cancer Res* 2001; 61: 4545–9.
- 83) Puddu M., Tafforeau J. (2006). Cancer colorectal : état des connaissances et données disponibles pour le développement d'une politique de santé en Belgique. pp : 60-61.
- 84) Dove-Edwin I., Sasieni P., Adams J., Thomas H.J.W. (2005). Prevention of colorectal cancer by colonoscopie surveillance in individuals with a family history of colorectal cancer: 16 year, prospective, follow-up study; *BMJ*. 331(7524). p : 1047. et al., 2009
- 85) Norat T., Bingham S., Ferrari P., Slimani N., Jenab M., Mazuir M. (2005). Meat, Fish, and colorectal cancer risk: the European Prospective Investigation into cancer and nutrition. *Natl Cancer Inst*; 97(12). pp: 906-916
- 86) Oliver R.T.D. (1993). Screening for colorectal cancer. *The lancet*; 341. P: 1033.
- 87) (Bouché et al., 2010)
- 88) Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(5):663-71.
- 89) Halilovic E., Solit D.B. (2008) Therapeutic strategies for inhibiting oncogenic BRAF signaling. *Curr Opin Pharmacol* 8 pp: 419-26.
- 90) Lièvre A., Laurent-Puig P. (2005). Molecular biology in clinical cancer research : the example of digestive cancers. *Revue d'Epidémiologie et de santé Publique*. Vol 53, N°3. pp : 267-282.
- 91) Goldstein N.S., 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. pp : 1331-46.

- 92) Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008;26(3):374-9.
- 93) Bardelli A, Siena S. Molecular mechanisms of resistance to cetuximab and panitumumab in colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010;28(7):1254-61.
- 94) 1. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351:337-45.
- 95) Laurent-Puig P, Cayre A, Manceau G, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 2009; 27(35):5924-30.
- 96) Popat S, Hubner R, Houlston RS. Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis. *J Clin Oncol* 2005; 23:609–18
- 97) Lackner C, Hoefler G. Clinical and genetic criteria are important for identification and management of hereditary non polyposis colorectal cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2005; 17:1143–4.
- 98) Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993; 75:1215–25.
- 99) Li WQ, Kawakami K, Ruzskiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer* 2006; 5:2.
- 100) Ferron M., Praz F., Pocard M. (2005). « The genetics of colorectal cancer ». pp: 602-607.
- 101) Sefiani A. (2009). Faculté de médecine et de pharmacie Rabat. Cours de génétique Médicale., 2009).
- 102) (Hoerni, 2005).
- 103) (Truninger K., Menigatti C., Luz J., Russel A., Haider R., Gebbers J., Bannwart F., Yurtesever H., Neuweiler J., Riehle H., Cattaruzza M, Heinimann K., Schar P., Jiricny J., MarraG. (2005). Immunohistochemical Analysis Reveals High Frequency of PMS2 Defects in Colorectal Cancer. *GASTROENTEROLOGY* 128. pp: 1160-1171.

Annexes

Annexe1:

- **Protocole expérimental** : extraction de l'ADN à partir de tissus tumoraux par le Kit :

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

1. Préparation des solutions de lavage :

- Ajouter 42 ml éthanol 100% à la bouteille de concentré de lavage → Wash 1
- Ajouter 48 ml éthanol 100% → Wash 2/3

2. Déparaffinage

- Dans un tube de 1,5 ml contenant 8 coupes de 10 µm ou 4 coupes de 20 µm, on ajoute 1 ml de Xylène ou le toluène
- Centrifuger brièvement à l'aide d'une centrifugeuse pour tubes de 1,5 ml
- Incuber 3 min à 50°C
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 2 min à 140 rpm x 100
- Eliminer le xylène
- Laver le culot avec l'éthanol absolu 2 fois pour enlever l'excès de xylène (ajouter 1ml EtOH → vortexer → centrifuger 140 rpm 2 min) x 2
- Enlever le surnagent
- Sécher le culot dans l'étuve à 45°C pour éliminer l'éthanol pendant 30 min

3. Digestion à la protéase :

- Ajouter le tampon de digestion et 4 µl de la protéase K

Tableau : Volume du tampon de digestion selon la taille des échantillons FFPE

Taille de l'échantillon	Tampon de digestion par échantillon
≤40 µm	100 µl
40-80 µm	200 µl

- Déposer 104/204 µl du mélange dans chaque tube
- Mélanger légèrement les tubes du bout des doigts pour décoller les culots si nécessaire faire immerger le bout sortant avec un cône
- Incuber pendant 16H à 50°C au bain marie
- Si on obtient au bout de 16 H des culots très clairs on arrête l'incubation sinon on augmente le temps d'incubation

4. Isolement des acides nucléiques

- Préparer le mélange « Isolation Additif/Ethanol »
- Ajouter le mélange Isolation Additif/Ethanol et mélanger

Tableau : Volume du mélange Isolation Additif/Ethanol selon le volume du tampon de digestion

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

- Passer le mélange à travers un filtre à cartouche.
- Laver avec 700 ml de la solution de lavage Wash 1.
- Centrifuger pendant 30sec puis éliminer les débris restant sur le filtre et replacer le filtre sur le même tube de collecte x 2
- Laver avec 500 ml de la solution de lavage Wash 2/3.
- Centrifuger 30 sec à 10000 rpm.
- Jeter les débris restant sur le filtre et replacer le filtre sur le même tube.

5. Digestion à la nucléase et purification finale de l'ADN

- Préparer le mélange RNase :

Tableau : Volume de chaque constituant du mélange RNase

Volume (par réaction)	Composant
10 μ l	RNase A
50 μ l	Eau Stérile Ultra Pure

- Ajouter 60 μ l du mix au centre du filtre
- Incuber à température ambiante pendant 30min
- Ajouter 700 μ l de Wash 1
- Incuber 30 sec à température ambiante
- Centrifuger à vitesse maximale 100 rpm x 100 pendant 30 sec

- Eliminer le liquide
- Laver 2x avec 500 µl de Wash 2/3, puis centrifuger pour éliminer le liquide résiduel.
- Transférer le filtre dans un nouveau tube de collecte
- Ajouter 60 µl de la solution d'éluion à 95°C
- Centrifuger pendant 1min à 140 rpm x 100
- Récupérer l'ADN.
- Conserver l'ADN à – 20°C

Annexe 2:

➤ Préparation du gel d'électrophorèse:

- Gel d'agarose 2% pour KRAS et BRAF :
 - Peser 2g d'agarose
 - Solubiliser l'agarose dans 100 ml de TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA)
 - Chauffer le mélange à la micro-onde
 - Couler le gel et laisser gélifier
 - Déposer 5 µl d'ADN, mélanger avec 2 µl de tampon de charge
 - Et laisser migrer dans la cuve d'électrophorèse.
- Gel d'agarose 4% pour MSI

Même démarche mais ici on pèse 4g d'agarose.

✓ BET (Bromure d'Ethidium) :

- BET : 0,5 g
- Eau distillé : qsp 50 ml
- Laisser dissoudre
- Conserver à 4°C et à l'abri de la lumière

✓ Tampon TAE (Tris-Acétate-EDTA) 50X :

- Tris-base : 242 g
- EDTA 0,5 M PH 8 : 100 ml
- Acide acétique : 57 ml
- Eau distillée : qsp 1000 ml
- Alliquoter et autoclaver
- Conserver à 4°C

✓ Tampon de charge :

- Bleu de Bromophénol : 2,5 mg ([C₁₉ H₁₀ Br₄ O₅ S] ; M= 669,97 g/mol)
- Glycérol : 300 µl

- EDS : 700 µl

Glossaire

BRAF V600E : la mutation V600E est la mutation oncogénique la plus fréquente de BRAF dans le cancer. Le changement d'acide aminé de V600E provoque l'activation constitutive de la BRAF kinase et favorise la transformation cellulaire.

Voie PI3K-PTEN-AKT : voies de transduction du signal impliquant différentes molécules de signalisation : phosphatidylinositol-3 Kinase (PI3K), PTEN et AKT. PI3K génère au niveau de la membrane cellulaire des inositides phosphorylés qui sont nécessaires au recrutement et à l'activation de la sérine kinase AKT. PTEN est une phosphatase lipidique qui s'oppose à l'effet de PI3K. en conséquence, PI3K et AKT mutées se comportent comme des oncogènes dominants, tandis que PTEN est un gène suppresseur de tumeur.

Cétuximab : Egalement appelé Erbitux ou C225, le cétuximab est un anticorps monoclonal conçu pour viser l'EGFR et inhiber son activité de transmission de signal en initiant l'activation du récepteur.

Panitumumab : Egalement appelé ABX-EGF, le panitumumab est un anticorps monoclonal totalement humain de type immunoglobuline G₂, dirigé contre l'EGFR et qui inhibe l'activation de l'EGFR induite par le ligand. Cet anticorps est produit par des souches de souris génétiquement modifiées pour être déficientes en anticorps de souris et produire des anticorps totalement humains.

KRAS : Gène codant pour K-ras, une protéine appartenant à la superfamille des petites GTPases, dans lequel la substitution d'un seul acide aminé entraîne l'apparition d'une mutation activante. L'épissage alternatif donne naissance à des variants codant pour deux isoformes qui diffèrent par leur région C terminale.

BRAF : BRAF est isoforme de RAF. Les protéines Raf (Raf-1, A-Raf, B-Raf) sont des substances intermédiaires de Ras et MAPK dans la voie de prolifération cellulaire. Les protéines raf sont classiquement activées par Ras via une phosphorylation et les protéines raf activées activent à leur tour MAPK via sa phosphorylation. Les protéines Raf peuvent cependant être également activées indépendamment par d'autres kinases.

MAPK (mitogen-activated protein kinase): les MAPK sont une famille d'enzymes formant un réseau intégré agissant sur certaines fonctions de la cellule, telles que la différenciation, la prolifération et la mort cellulaire. Ces protéines cytoplasmiques modulent les activités d'autres protéines intracellulaires en ajoutant des groupements phosphate aux acides aminés sérine/thréonine.

Statut MSI (instabilité microsatellitaire) : les microsatellites sont des séquences qui se répètent de 1-4 paires de bases d'ADN qui se distribuent un peu partout dans le génome et dont la longueur peut varier considérablement dans la population. Leur longueur reste stable avec la division cellulaire et la transmission héréditaire, de sorte qu'ils peuvent être utilisés comme des marqueurs moléculaires de la lignée cellulaire dans les études de génétique des populations ou les tests de paternité. Les anomalies des gènes impliqués dans la réparation des erreurs d'appariement de l'ADN entraînent une instabilité microsatellitaire, une altération de la longueur des microsatellites d'une cellule à l'autre.