



Master : Biotechnologie Microbienne

PROJET DE FIN D'ETUDES :

**Recherche de mutation V600E du gène
B-raf dans trois types de tumeurs
cancéreuses : colorectale, mélanome et
cérébrale.**

Stage effectué au : *laboratoire de génétique médicale et oncogénétique au CHU HASSAN II de Fès.*

Présenté par : Fatima Zahra BRIACHE.

Encadré par :

- Etablissement d'accueil : **Professeur Sanae BENNIS**
- FST- Fès : **professeur Sanae GUISSI.**

Soutenu le :26/06/2012.

Jury :

- **Professeur Sanae BENNIS.**
- **Professeur Sanae GUISSI.**
- **Professeur IRAQUI HSSAINI Mohamed.**
- **Professeur Karim OULDIM.**
- **Professeur TAZI Mohamed.**

Année universitaire : 2011-2012.



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 AMARJ AHAF RIFFE, 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.

Dédicaces

Je dédie cet humble travail à toutes les personnes qui me sont très chères, et avec 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 FRERE ABDELALI ET SA FEMME KAMAR :

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

A MES CHERS FRERES ET SCEURs :

MOHAMMED, HAMID, RACHID, MUSTAPHA, YOUSSEF, CHIHAD, SANAE, FADOUA et la petite IMANE ; 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 de ce travail et m'a inspiré les bons pas et les justes réflexes.

Au terme de ce travail, je remercie **Monsieur ABDELLATIF HAGGoud**, responsable du Master Biotechnologie Microbienne, pour son orientation, sa supervision. Vous me faites 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 encadrante, **MADAME LE PROFESSEUR GUISSI SANAE** 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 sa 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.** et à **MONSIEUR TAZI A.** 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.

Je remercie également le **biologiste TARHANINT SAID**, les **résidentes de l'anapathe EL HOUARI AZIZA** et **BENLEMLIH AMAL** et tous les **médecins, les techniciens** de l'UGMO et d'ANAPATHE, 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 **SARA, MERYEM, FATIMA ZAHRA, MOUNIA, LAILA ET LA BELLE RACHIDA** pour leur aide, leur compréhension, leur soutien et les agréables moments que nous avons passés ensemble.

Sommaire

Introduction	1
Chapitre I : Partie bibliographique.....	3
I. Généralité sur le mélanome.....	4
1. Définition du mélanome	4
2. Epidémiologie	5
3. Facteurs de risque	5
4. Physiopathologie du mélanome	6
5. Altérations génétiques dans le mélanome	7
II. Généralité sur le cancer du colon	7
1. Définition du cancer du colon.....	7
2. Epidémiologie du cancer du colon	8
3. Facteurs de risque	9
4. Physiopathologie du cancer du colon.....	10
5. Types du cancer du colon	11
6. Altérations génétiques liées au cancer du colon	12
III. Généralités sur les gliomes	13
1. Définition des gliomes.....	13
2. Epidémiologie des gliomes	14



3. Physiopathologie des gliomes	14
4. Classification des gliomes	15
5. Altérations génétiques liées au gliome	16
IV. Généralité sur B-raf	17
1. Gène B-raf ¹	17
2. Protéine B-raf (rapidly accelerated fibrosarcoma).....	18
3. Fonction de la protéine B-raf.....	19
4. Mutations dans le gène B-raf	20
5. Mutation du gène B-raf dans le mélanome	21
6. Effet de mutation de B-raf sur le développement de mélanome.....	23
7. Mutation de B-raf dans le cancer du colon	23
8. Gène K-ras	24
9. Altération de B-raf dans les astrocytomes pilocytiques.....	24
V. Méthodes de diagnostic	25
1. Immunohistochimie	25
2. Techniques moléculaires	26
CHAPITRE 2 : Matériel et méthode.....	32
I. Matériel utilisé	33
II. Méthode.....	33
1) Biopsie	33
2) Examen histologique sur tissu fixé.....	34
a) La fixation.....	34
b) L'inclusion	35
c) Réalisation des coupes ou microtomie	36
d) Coloration	37
e) Le montage	37



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

3) Immunohistochimie.....	38
a) Principe.....	38
b) Protocole expérimental de l'immunohistochimie manuelle	38
4) Etude moléculaire	39
a) Extraction d'ADN à partir de tissus tumoraux	39
b) Test qualité de l'ADN : dosage des acides nucléiques.....	42
c) Amplification de l'ADN extrait par PCR	43
d) Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	47
e) Séquençage des produits PCR des gènes BRAF	48
f) Lecture de la séquence	50
CHAPITRE 3 : Résultat.....	51
I. Etude statistique.....	52
1. Cancer du colon	55
2. Mélanome	57
3. Gliomes	58
II. Etude histologique	60
1. Cancer du colon	61
2. Mélanome	61
III. Etude immunohistochimique	62
IV. Etude moléculaire	63
1. Cancer du colon	64
1.1. Résultat de PCR	64
1.2. Séquençage	65
2. Mélanome	66
2.1. Résultat de PCR d'exon 15 du B-raf.....	66
2.2. Résultat de séquençage	68
CHAPITRE 4 : Discussion des résultats.....	71



I. Etude statistique	72
1. Cancer du Colon	72
2. Mélanomes	72
3. Gliomes	73
II. Etude histologique	74
1. Cancer du colon	74
2. Mélanome	74
III. Etude histochimique	75
IV. Etude moléculaire	75
Conclusion et perspectives	78
Références.....	80

Liste des figures :

Figure 1 : composition de l'épiderme

Figure 2 : différentes caractéristiques des tumeurs de mélanome en comparaison avec les *nævus* bénins

Figure 3 : les étapes de développement de mélanome

Figure 4 : l'anatomie du colon

Figure 5 : Tumeur du colon sigmoïde

Figure6 : les différentes étapes de développement de cancer colorectal.

Figure 7 : les localisations des tumeurs cancéreuses selon le type de cancer colorectal

Figure 8 : anatomie de cerveau

Figure 9 : localisation des différentes tumeurs cérébrales

Figure10 : les différentes altérations des gènes qui donnent les différents types des gliomes.

Figure 11 : localisation du gène B-raf sur le bras long q du chromosome 7.

Figure 12 : digramme du gène B-raf.

Figure 13 : diagramme de structure de protéine Braf.

Figure 14: Voie Ras-Raf-Mek-Erk.

Figure 15 : digramme représentant les mutations de B-raf retrouvées dans le mélanome.

Figure 16: digramme représentant les mutations de B-raf retrouvées dans le cancer colorectal

Figure 18: Localisation chromosomique du gène K-ras sur le chromosome 12

Figure19: Les différents types de sondes utilisées en FISH, et leur observation correspondantes au microscope après hybridation.

Figure20 : action de l'anti-EGFR sur la prolifération cellulaire.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Figure 21: les voies d'inhibition de la prolifération cellulaire.

Figure 22 : Biopsie sous forme de plusieurs fragments.

Figure 23 : inclusion des fragments dans les cassettes

Figure 24 : Histokinette

Figure 25: Enrobage dans la paraffine

Figure 26: Microtomie.

Figure 27 : Lames montées et colorées

Figure 28 : Les différents composants d'une immunoréaction

Figure 29 : Schéma général du fonctionnement du RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit

Figure 30 : schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne

Figure 31: image d'un résultat de séquençage

Figure 32 : répartition du nombre de cas du cancer au cours des années 2004-2010

Figure 33 : Répartition de l'ensemble des cancers selon le siège et l'année.

Figure 34 : répartition de cancer selon le sexe.

Figure 35 : répartition de cancer selon les tranches d'âge

Figure 36 : Répartition des tumeurs selon le type histologique

Figure 37: Répartition de l'ensemble des cancers digestifs selon le siège

Figure 38 : répartition du cancer du colon selon le sexe.

Figure 39 : répartition du cancer du colon selon de résidence.

Figure 40 : localisation de la tumeur dans le colon

Figure 41 : répartition des cancers cutanés selon le sexe.

Figure 42 : Répartition des cancers de la peau selon le type histologique

Figure 43: Répartition des cancers du système nerveux central par siège

Figure 44 : répartition des tumeurs du SNC selon le sexe

Figure 45: répartition des cas selon le type histologique

Figure 46 : adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation

Figure 47 : les trois aspects des tissus du mélanome retrouvés

Figure 48 : Immunomarquage des cellules tumorales par la PS 100.

Figure 49: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15.

Figure 50 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène K-ras, exon 2.

Figure 51 : profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du colon.

Figure 52 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR classique du gène B-raf, exon 15 des échantillons du mélanome.



Figure53 : profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui ne présente pas de mutation T en A.

Figure 54: profil d'une séquence F de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui présente la mutation T en A.

Figure 55: profil d'une séquence R de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui présente la mutation T en A.

Figure 56 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR allèle spécifique du gène B-raf, exon 15 des échantillons du mélanome.

Figure 57 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR du gène B-raf, exon 15 des échantillons des astrocytomes pylocitiques

Figure58: profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon des astrocytomes pylocitiques.

Figure 59 : Alignement entre le segment du gène BRAF amplifié par l'amorce BRAF-15R et le segment de référence dans les bases de données.

Liste des tableaux

Tableau 1: Facteurs de risque impliqués dans la cancérogenèse colorectale²³

Tableau 2: les gènes altérés dans les différents types de gliome.

Tableau 3 : les différentes mutations détectées dans le gène B-raf¹¹.

Tableau 4 : Volume du tampon de digestion selon la taille des échantillons FFPE

Tableau 5: Volume du mélange Isolation Additif/Ethanol selon le volume du tampon de digestion

Tableau 6: Volume de chaque constituant du mélange RNase

Tableau 7: les amorces utilisées dans la PCR de l'exon 15 du gène B-raf

Tableau 8 : les réactifs utilisés dans la PCR

Tableau 9: programme de thermocycleur

Tableau 10 : programme de thermocycleur pour la première purification de produit de PCR

Tableau 11: produit de réaction de séquence

Tableau 12 : programme de thermocycleur pour la réaction de séquence

Tableau 13 : produit de 2^{ème} purification

Tableau14: résultat d'immunohistochimie des mélanomes.



Liste des abréviations

ADN : Acide Désoxyribonucléique
APC: adenomatous polyps coli
ARNm : acide ribonucléique messenger
AS: segment d'activation
BET: Bromure d'Ethidium
CDKN2A: cyclin-dependent kinase inhibitor 2A.
CCR: Cancer colorectal
CHU: centre hospitalier universitaire
CR1, CR2, CR3 : conserved region
CRB: cystéine rich domain
CDK4: cyclin-dependent kinase 4
CEA : antigène carcino-embryonnaire
dATP : désoxy Adénine tri-phosphate
dCTP: désoxy Cytosine tri-phosphate
dGTP: désoxy Guanine tri-phosphate
dTTP: désoxy thymine tri-phosphate
DCC: detected in colorectal cancer
dNTP : desoxy-nucléotide tri-phosphate
E: acide glutamique
EDTA : Ethylène diamine tétra acétique
ERK: extracellular signal regulated kinase
EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor
GNAQ: Guanine nucleotide-binding protein G(q) subunit alpha
GBM : glioblastome multiforme
GTP: guanine tri-phosphate
GEF: guanine échange factor
GDP: guanine di-phosphate
HNPCC: hereditary non- polyposis colorectal cancer
HES : Hématoxyline Eosine Safran
IHC: Immunohistochimie
kD: kilo-dalton
MMR: mis-match repair
MAPK: Mitogen-activated protein kinases
MLH1 : human Mut L Homolog 1
MSH2 et MSH6 : human Mut S Homolog 2 et 6
MSI : Microsatellite Instability



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

MSS : Microsatellite Stable
min : minute
MRPS33 : mitochondrial ribosomal protein S33
NDUFB2 : NADH dehydrogenase 1 beta subcomplex subunit 2, mitochondrial
nM : nano molaire
ng : nanogramme
OMS : organisation mondiale de santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
Pb : Paire de base
PBS : Phosphate buffered saline
PTEN: Phosphatase and TENsin homolog
qlq : quelque.
RTK : Receptor tyrosine kinases
RBP: Ras binding domain
RT-PCR: Reverse transcription Polymerase Chain Reaction
Raf : Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
SNC : système nerveux central
SNP: single nucléotide polymorphism
sec : seconde
TNM: Tumor, Nodes, Metastasis
TP 53 : gène de protéine P53
UGMO : unité de génétique médicale et oncogénétique
UV: ultra violet
 μ l : microlitre
V: valine

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



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Notre stage s'est déroulé dans l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique UGMO au sein du laboratoire central d'analyses 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 Casablanca. 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 :

Chaque année dans le monde, près de 10 millions de nouveaux cas de cancer sont diagnostiqués. C'est alors ainsi, que le cancer est devenu l'une des maladies les plus dévastatrices pour l'humanité. Les causes et les types de cancer varient selon les régions, mais dans la plupart des pays, il n'existe guère une famille qui soit épargnée par ce fléau. Le fardeau que représente cette maladie est immense, non seulement pour les malades eux-mêmes, mais aussi pour leur famille et leurs amis. Au niveau des sociétés, le cancer pose des défis considérables pour les systèmes de soins de santé, dans les pays pauvres comme dans les pays riches.

Aujourd'hui dans les pays en voie de développement, plus de 25 millions de personnes vivent avec le cancer. 11 millions de nouveaux cas apparaissent par an dont 7 millions de décès (12.5% ou 1/8 de tous les décès dans le monde). Les nouveaux cas de cancer pourraient augmenter de 50% d'ici 2020

Le cancer est donc un problème de santé publique majeur qui affecte tous les pays. La situation de son traitement entre pays riches et pays en voie de développement est un modèle d'inégalité. **L'élaboration et la mise en œuvre d'un plan efficace de lutte contre le cancer constituent un enjeu national dans chaque pays. Ceci nécessite une étude très profonde de cette maladie à savoir les gènes intervenant dans son évolution, pour pouvoir développer des stratégies de traitement efficaces et sans effets indésirables. Une nouvelle discipline appelée l'oncogénétique a été créée.** Elle s'intéresse à étudier l'origine génétique des tumeurs solides ou bien les anomalies génétiques des cancers. Cette discipline est née durant ces vingt dernières années et est 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 intervenant 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 qui 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.

L'étude profonde et la détection des mutations dans ces gènes permettent de donner naissance à un type de traitement appelé la thérapie ciblée. Contrairement aux chimiothérapies qui agissent contre la multiplication des cellules, les thérapeutiques dites ciblées sont des médicaments dirigés contre des cibles moléculaires. Ces cibles peuvent être des récepteurs, des gènes ou des protéines qui jouent un rôle dans la transformation des cellules normales en



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

cellules cancéreuses. Le médicament cible peut être un anticorps contre un gène exprimé à la surface ou dans la cellule cancéreuse, une molécule capable de bloquer la transmission d'un signal de division cellulaire ou encore un anticorps dirigé contre les nouveaux vaisseaux fabriqués par la tumeur qui permettent de l'alimenter. Ils peuvent être administrés seuls, ou en association avec une chimiothérapie ou des rayons.

Ces thérapies ciblées, adaptées à chaque patient selon les caractéristiques génétiques de la tumeur, permettent d'obtenir dans certain cas des survies prolongées. Cependant, ces traitements ne sont pas efficaces dans toutes les maladies. De plus ils sont coûteux et potentiellement toxiques. Ce qui rend nécessaire la détermination des facteurs prédictifs de réponse dont découle l'étude de B-raf.

Vu l'intérêt des outils moléculaires en diagnostic des tumeurs, l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique (UGMO) du centre Hospitalier universitaire CHU Hassan II de Fès 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, d'où le but de notre projet.

En effet, dans ce rapport, sera présenté le travail effectué dans l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique (UGMO) du centre Hospitalier et universitaire CHU Hassan II qui a pour objectif la détection des mutations qui peuvent toucher le gène B-raf (code pour une sérine thréonine kinase jouant un rôle dans le métabolisme cellulaire) et qui provoquent par conséquent, le développement du cancer.

Cette étude est réalisée sur trois types de cancer : colorectal, cérébral et mélanome. Pour les tumeurs du cancer du colon une étude moléculaire a été réalisée sur le matériel génétique (extraction d'ADN à partir de tissu, PCR et séquençage des régions d'intérêt). Pour les tumeurs de mélanome et cérébrale, l'étude moléculaire a été précédée par une étude immunohistochimique.

Cette approche permet de connaître les patients pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée et de leur proposer la stratégie thérapeutique la plus adaptée.



Partie bibliographique

III. Généralité sur le mélanome :

1. Définition du mélanome :

Le mélanome est le cancer de la peau ou des muqueuses, développé aux dépens des mélanocytes. Son siège initial est la peau dans l'immense majorité des cas. Il existe des mélanomes de l'œil (mélanome choroïdien), des muqueuses (bouche, canal anal, vagin), et plus rarement, des organes internes. En dépit de ce que son nom suggère, un mélanome n'est pas toujours foncé. 5 % environ des mélanomes nodulaires sont « achromiques » de la couleur normale de la peau chez les personnes autres qu'à peau noire.

La peau est constituée de trois couches représentées par l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Le mélanome se forme dans environ 70 % des cas, sur une peau auparavant indemne, et dans environ 30 % des cas, sur un **grain de beauté** préexistant de type **naevus**. Il se développe à partir des mélanocytes. La **kératose** solaire favorise la survenue de ce cancer¹³. Ainsi, contrairement à une idée reçue, les naevus ne sont pas dans l'immense majorité des cas, des états précancéreux qui se transforment en cancer suite à des expositions solaires multiples. L'exérèse systématique des naevus dans le but d'éviter la survenue de mélanome est donc inutile. De plus, les naevus du tronc et de la face (zones habituellement plus exposées aux

UV) n'ont pas plus de risque de se transformer en mélanome que ceux d'autres zones de la peau, qui sont plus protégées¹⁴.

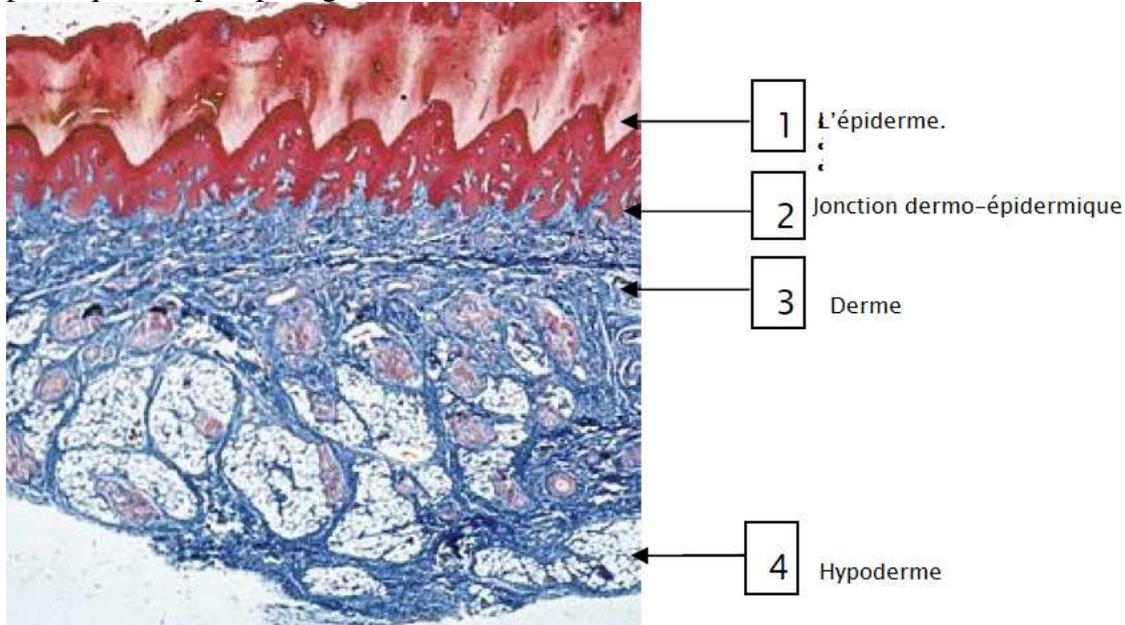


Figure 1 : composition de l'épiderme

Il est cependant reconnu que les grands naevus congénitaux ont un risque plus élevé de transformation cancéreuse, et qu'un nombre élevé de naevus sur le corps est un marqueur de risque de développer un mélanome, sans que ce dernier résulte de la transformation des dits naevus. Il se manifeste d'abord comme une simple tache pigmentée. La figure suivante montre les différentes caractéristiques histologiques des tumeurs de mélanome en comparaison avec les naevus bénins.

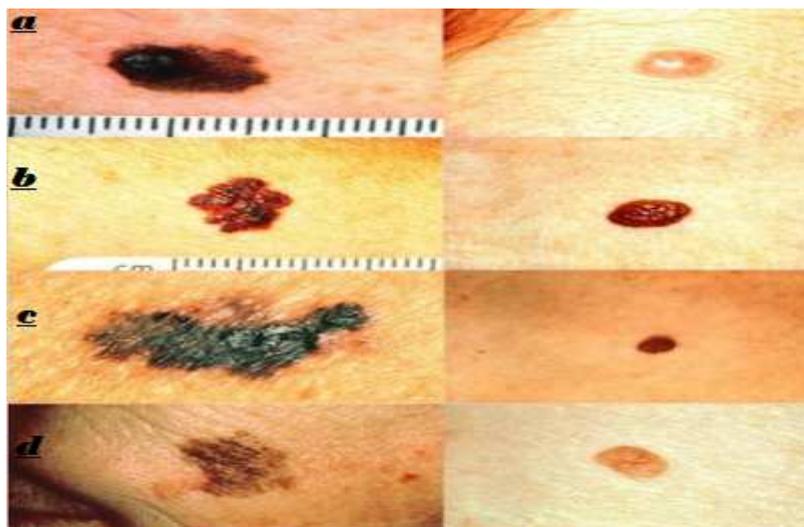


Figure 2 : différentes caractéristiques des tumeurs de mélanome en comparaison avec les *naevus* bénins : la règle ABCDE : a: Asymétrique, b : Bords irréguliers, c: Coloration non homogène d: Diamètre important (> 6 mm). e: Evolutif, dont l'aspect se modifie avec le temps.



2. Epidémiologie :

La fréquence du mélanome augmente plus que celle de tout autre cancer (elle a doublé ces dix dernières années).

Son incidence est très variable selon la latitude et la composition ethnique des populations. Il est de 5 à 15 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an en Europe. Ce taux est bien plus élevé en Australie et en Nouvelle- Zélande (40 à 50 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an), mais par contre nettement plus bas dans les pays à phototype V dominant (Asie, Amérique Latine) et plus bas encore en Afrique (rares cas de mélanomes palmo-plantaires). En Europe, l'incidence diminue du Nord vers le Sud avec 15 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an en Scandinavie et 5 à 7 nouveaux cas pour 100.000 habitants par an au pourtour de la Méditerranée.

Il est exceptionnel chez l'enfant, rare avant 20 ans. Au-delà, il survient à tous les âges. La sex-ratio en France (F/H) est de 1,4. Les femmes sont touchées en moyenne 3 à 5 ans plus tôt que les hommes. Il constitue le 1er cancer chez la femme entre 15 et 29 ans (25 % des cancers) et chez l'homme entre 30 et 44 ans.

3. Facteurs de risque :

La brûlure solaire, en particulier dans l'enfance¹⁵ et les antécédents familiaux¹⁶ sont les principaux facteurs de risque. L'exposition solaire régulière et modérée d'une peau susceptible de bronzer a un certain effet protecteur. Bien qu'il puisse apparaître partout, le mélanome a tendance à se former plus souvent sur les parties du corps qui sont couvertes dans la vie quotidienne mais exposées occasionnellement lors des baignades, comme le torse et les jambes. De même, l'utilisation d'ultraviolets artificiels dans un but de bronzage, augmente significativement le risque de mélanome avec une nette corrélation avec les doses prises. Il semble également exister une majoration modérée du risque de survenue d'un mélanome en cas d'antécédent d'endométriose ou de fibrome de l'utérus chez la femme¹⁷.

La couleur de la peau joue également un rôle important. Le risque est plus que doublé chez les roux et très sensiblement augmenté chez les personnes avec peau pâle¹⁸. Il est plus de dix fois moins important chez les personnes de couleur de peau non blanche.

4. Physiopathologie du mélanome :

Les mécanismes d'apparition des mélanomes ne sont pas complètement élucidés. Les études épidémiologiques ont montré une corrélation entre une exposition solaire brutale et intense (brûlure solaire) et l'apparition d'un mélanome. Ce dernier peut cependant survenir sur des zones cutanées non exposées au soleil.

Le développement de mélanome commence par une lésion bénigne dans les mélanocytes au niveau de la couche basale. Cette lésion se propage superficiellement suite à une série de division cellulaire incontrôlée. Il donne naissance à des cellules de forme irrégulière avec un noyau volumineux et un cytoplasme peut abondant. La propagation se poursuit radialement puis verticalement pour arriver finalement au stade le plus dangereux qui est le mélanome métastatique où les cellules cancéreuses se propagent par la circulation sanguine et lymphatique dans tout le corps vers les poumons, le foie et le cerveau.

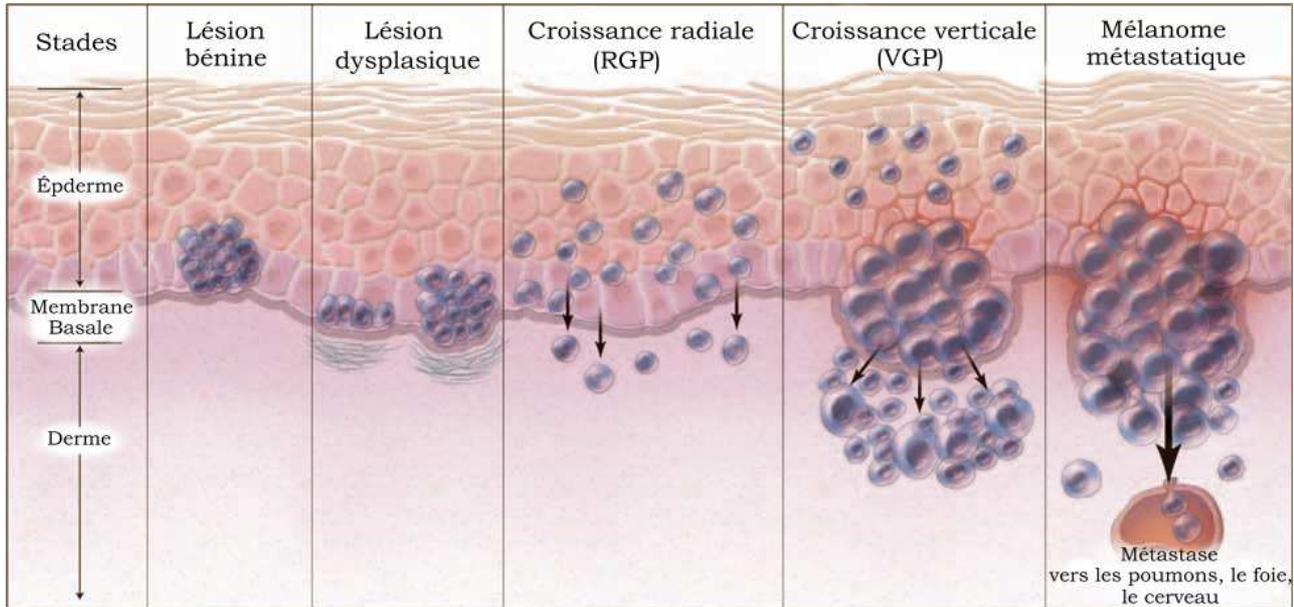


Figure 3 : les étapes de développement de mélanome

5. Altérations génétiques dans le mélanome :

5 à 10 % des patients ayant un mélanome ont un antécédent familial de cette maladie. Des mutations sur plusieurs gènes sont associées avec ce cancer. Comme la mutation de *CDKN2A* située sur le **chromosome 9**, des mutations dans les gènes *GNAQ/GNA11*, *N-ras*, *KIT*, *PTEN* ont été mise en évidence. La mutation la plus fréquente est celle trouvée dans le gène *BRAF*. Elle est présente dans plus d'un cas sur deux de mélanomes métastasés¹⁹.

Son incidence augmente de plus de 2 % par an, mais elle tend à se stabiliser dans certains pays, probablement du fait des changements d'habitude d'exposition au soleil. Cependant, sa mortalité diminue régulièrement, probablement du fait que la plupart des mélanomes détectés sont de petite taille, et donc, de meilleur pronostic.

IV. Généralité sur le cancer du colon :

1. Définition du cancer du colon:

Le cancer du côlon se développe à partir des cellules qui tapissent la paroi interne du côlon qui est un organe 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). 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 laquelle 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.

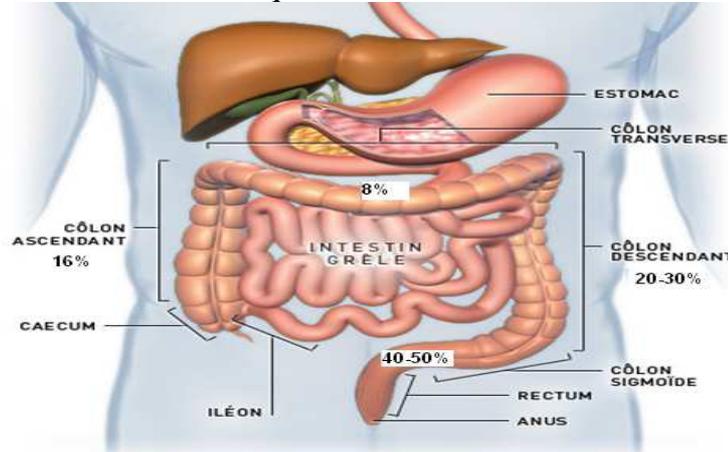


Figure 4 : l'anatomie du colon

Dans plus de 80 % des cas, le cancer du colon provient d'une **tumeur bénigne**, appelée **polype** adénomateux, qui évolue lentement et finit par devenir cancéreuse. La tumeur se développe dans le **sigmoïde** (boucle située dans la fosse iliaque gauche) dans 70 % des cas. Les **cancers** du côlon et du rectum étant assez semblables, on les regroupe sous le terme de cancer colorectal. Il s'agit du 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).



Figure 5 : Tumeur du colon sigmoïde

7. Epidémiologie du cancer du colon :

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. Dans l'année 2010 a été rapportée le 9 octobre à Casablanca par le 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 vue l'absence d'un registre national. Cependant, il y a des registres régionaux dont le registre des cancers de Rabat et le registre de cancer de Casablanca seront cités.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

D'après le registre des cancers de Rabat pour l'année 2005, le cancer du colon 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 comme le Japon ou la Chine (Registre des cancers de Rabat, 2005).

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 allant de 17-83 ans. La répartition par sexe du cancer colorectal est de 51% de femmes et 49% des hommes. (Registre des cancers de la région du grand Casablanca, 2007).

En France, il est au premier rang pour les deux sexes, avec 33 500 nouveaux cas par an³³. L'incidence la plus faible (<10 pour 10 000 habitants) est observée dans les continents en voie de développement comme l'Asie et l'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%³⁴. 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 72 ans chez la femme. L'augmentation de l'incidence du cancer colique pourrait être liée au vieillissement de la population³⁵.

8. Facteurs de risque :

Il existe plusieurs facteurs qui interviennent dans l'apparition et le développement d'un cancer du côlon. Les plus importants sont les maladies inflammatoires du colon, chrome et RFCH. Si la majorité des cancers du côlon se trouvent dans les pays développés, cela n'est pas anodin. Le mode de vie alimentaire a donc été mis en évidence comme facteur de risque principal du cancer du côlon.

Tableau 1: Facteurs de risque impliqués dans la cancérogenèse colorectale²³

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 le son de blé)
Viandes grasses : charcuterie, mouton, abats	Calcium et produits laitiers fermentés
Céréales raffinées	Vitamines antioxydantes
Fer	Folates
Alcool et tabac	Café



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 identifiés²⁴.

9. Physiopathologie du cancer du colon

Le cancer colorectal est souvent une maladie dite silencieuse, c'est-à-dire qu'elle peut se développer sans symptômes. Il existe cependant certains signes d'alerte comme des douleurs ou des saignements.

Lorsque des cellules cancéreuses apparaissent, elles sont d'abord localisées sur la surface interne de la paroi du côlon ou du **rectum** (la **muqueuse**). Ensuite, petit à petit, elles atteignent les couches plus profondes. Étudier la taille et surtout la profondeur de la tumeur donne donc une indication sur le degré d'évolution de la maladie. Plus la tumeur est localisée et « superficielle », plus elle sera facile à traiter.

Au cours de l'évolution, les cellules cancéreuses peuvent s'échapper du côlon ou du rectum et se disséminer ailleurs. Les **ganglions lymphatiques**, situés dans la graisse qui entoure le côlon ou le rectum, peuvent alors être touchés. Pour déterminer si des ganglions contiennent des cellules cancéreuses, il faut les analyser au microscope, après les avoir prélevés. Si aucun ganglion n'est atteint, cela signifie que le cancer est à un **stade** précoce et qu'il est resté localisé. Si au contraire des ganglions sont atteints, cela signifie que la maladie a commencé à se disséminer. Le nombre de ganglions envahis permet d'en savoir plus sur le degré de propagation du cancer. Moins il y a des ganglions envahis, meilleures sont les chances de guérison.

Les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres organes que les ganglions lymphatiques et y développer des **métastases**. Les organes les plus souvent touchés par des métastases lors d'un cancer colorectal sont le foie, les **poumons** et le **péritoine**. Les cancers colorectaux qui présentent des métastases (on parle de cancer **métastatique**) sont plus difficiles à soigner.

La taille et la profondeur de la tumeur, atteinte ou non des ganglions lymphatiques et nombre de ganglions atteints, présence ou non de métastases sont les trois critères permettant de définir le stade du cancer selon la **classification TNM**. (TNM = «Tumor, Nodes, Metastasis »).

L'évolution du cancer du colon passe par 5 étapes principales :

- **Stade 0** : la tumeur est in situ, ce qui signifie qu'elle est très superficielle et qu'elle n'envahit pas la sous-muqueuse. Les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance.

- **Stade I** : la tumeur envahit la deuxième couche (sous-muqueuse) ou la couche musculaire (muscleuse) de la paroi du côlon ou du rectum, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance.
- **Stade II** : les cellules cancéreuses ont traversé plusieurs couches de la paroi du côlon ou du rectum, mais aucun ganglion n'est atteint et il n'y a pas de métastase.
- **Stade III** : les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques proches de la tumeur.
- **Stade IV** : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, vers des emplacements ou des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons.

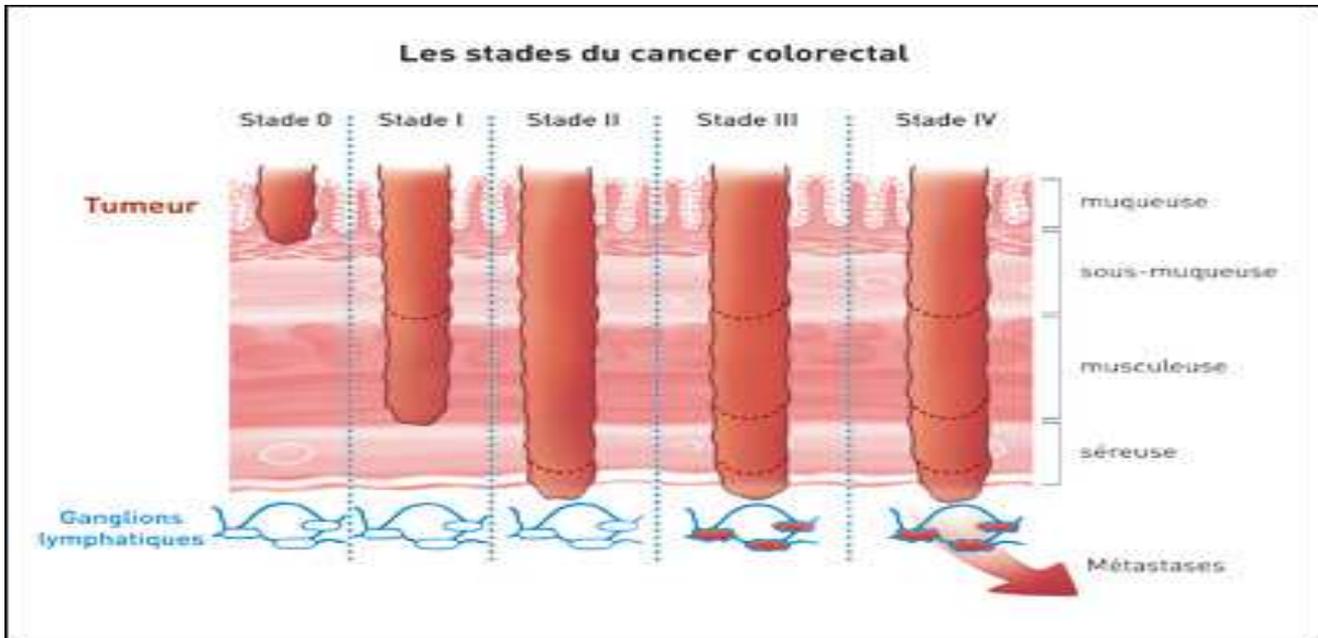


Figure 6 : les différentes étapes de développement de cancer colorectal.

10. Types du cancer du colon :

Le cancer du côlon peut se classer en 3 familles²² :

- **le cancer du côlon droit.** Ce type de cancer est latent et présente un faible risque d'occlusion. Douleurs abdominales et anémie sont ses signes. Ce type de cancer peut engendrer une infection locale ou générale, voire une péritonite mais cela reste exceptionnel.
- **le cancer du côlon transverse.** Ce type de cancer du côlon se caractérise par un développement lymphatique avec envahissement ganglionnaire, lequel va souvent engager le pronostic vital. Troubles coliques du transit et ballonnement sont les premiers signes du cancer du côlon transverse, ces signes sont souvent sous-estimés au départ.

- **le cancer du côlon gauche** reste le plus fréquent des cancers du côlon. Il se caractérise très souvent par une propagation lymphatique rétro-pancréatique. Occlusion aigüe, infection, fistule colo-vésicale et d'autres évolutions possibles sont les signes de ce cancer.

Macroscopiquement, le siège du cancer est variable. 30% sur le côlon droit, 20% sur le côlon transverse, 5% sur le côlon gauche et 45% sur le sigmoïde. Il est multiple dans 3% des cas et associé à des **polypes** dans 1/3 des cas.

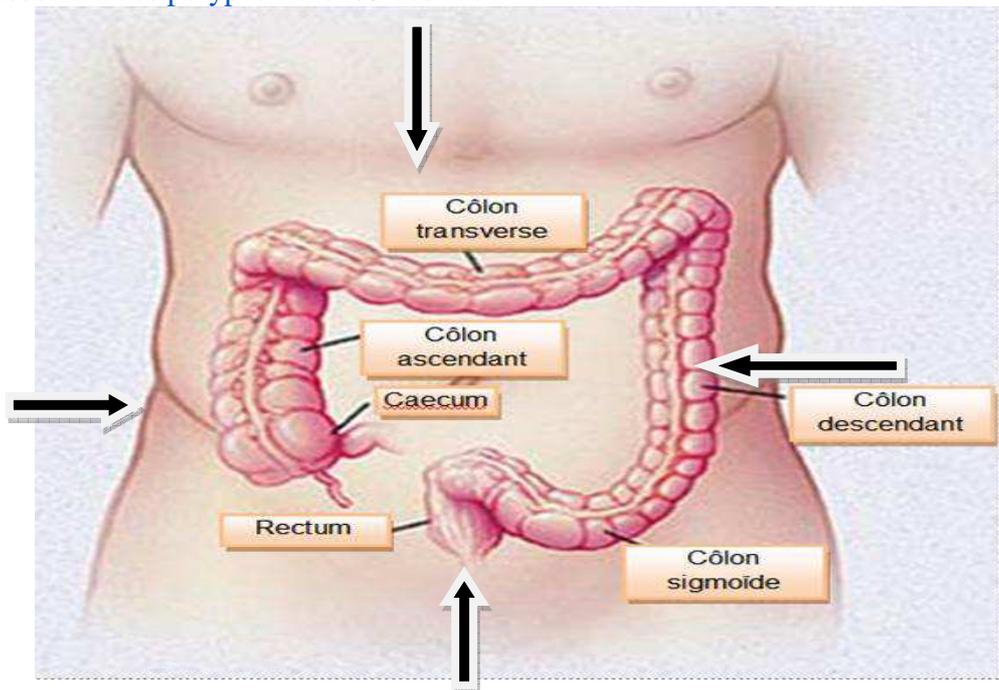


Figure 7 : les localisations des tumeurs cancéreuses selon le type de cancer colorectal

11. Altérations génétiques liées au cancer du colon :

Plus de 30% des cas de **cancer du côlon** (ou **cancer colorectal**) seraient liés à des mutations génétiques. Les gènes touchés sont :

- **Les proto-oncogènes** : ont une action positive sur la prolifération cellulaire. Leur version mutée, s'appelle oncogène. Le plus impliqué dans le CCR est le gène Kras.
- **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 sept gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements. On cite h MLH1 (human mutL, homolog = gène homologue au mutL isolé chez *Escherichia coli*), hMSH2 (human mutS homolog = gène homologue au mutS isolé chez *Escherichia coli*), h PMS1, h PMS2, h MSH6, h MSH3 et h MLH3²⁵.

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

III. Généralités sur les gliomes :

1. Définition des gliomes :

Les gliomes ou tumeurs gliales sont des tumeurs du système nerveux central (SNC). Ils sont localisés le plus souvent dans l'encéphale, parfois dans la moelle épinière. Ils proviennent des cellules qui entourent les neurones : astrocytes, oligodendrocytes et épendymocytes. Une théorie plus récente laisserait supposer que des cellules progénitrices (cellules non encore différenciées), voire des cellules souches, seraient à l'origine de ces tumeurs. Ce sont des tumeurs rares, dont le pronostic est extrêmement variable. Elles justifient toujours une prise en charge dans un service spécialisé afin d'adapter au mieux le traitement.

Le cerveau est constitué de plusieurs lobes (pariétal, frontal, occipital, temporal) et de différentes parties profondes, comme le thalamus. Il communique avec le reste du corps par des influx nerveux transportés par la moelle épinière, qui se poursuit à l'intérieur du crâne par le tronc cérébral. Le tronc cérébral, le cerveau et le cervelet forment ce que l'on appelle l'encéphale.

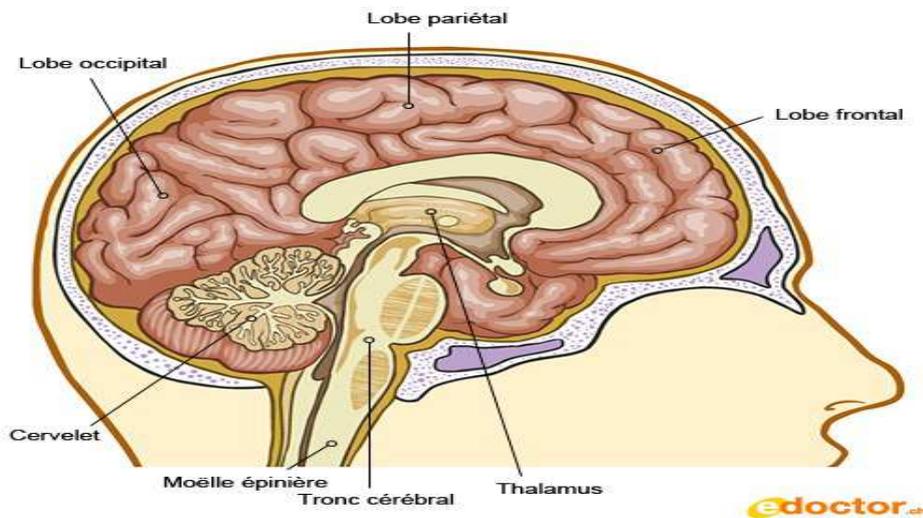


Figure 8 : anatomie de cerveau

2. Epidémiologie des gliomes :

Chaque année, approximativement 2 500 personnes au Canada et 3000 en France sont atteintes d'une tumeur au cerveau. La plus fréquente est un gliome. Il s'agit de la tumeur primitive cérébrale la plus fréquente, représentant 70% de gliomes²⁶. L'incidence annuelle est de 5 à 7 sur 100 000³⁶. Ces tumeurs sont la troisième cause de mortalité chez l'adulte jeune. Chez l'enfant, il s'agit du deuxième cancer le plus fréquent après la leucémie.

Les gliomes peuvent se manifester à tout âge avec une pointe d'incidence à la trentaine pour les gliomes de bas grade et une pointe à la cinquantaine pour la forme la plus agressive, les glioblastomes multiformes (GBM). L'incidence des GBM, très faible chez l'enfant, augmente de façon linéaire jusqu'à 75 ans pour diminuer ensuite.

Les GBM restent des tumeurs relativement rares ; en Europe et aux Etats-Unis, l'incidence des GBM est respectivement à 2 et 3 sur 100 000. Cette incidence a cependant augmenté au cours des 30 dernières années³⁷. Ceci s'explique par le vieillissement de la population avec un accroissement du nombre de cas au-delà de 70 ans. L'amélioration de l'accès à l'imagerie et des moyens diagnostiques (radiologiques, histologiques) peuvent aussi expliquer cette augmentation.

3. Physiopathologie des gliomes :

L'évolution des gliomes passe par plusieurs étapes se caractérisant par des mutations, délétions ou inactivation des protéines spécifiques. Le type des gliomes est différent selon les étapes. Le schéma suivant explique la progression des cellules souches vers des cellules cancéreuses.

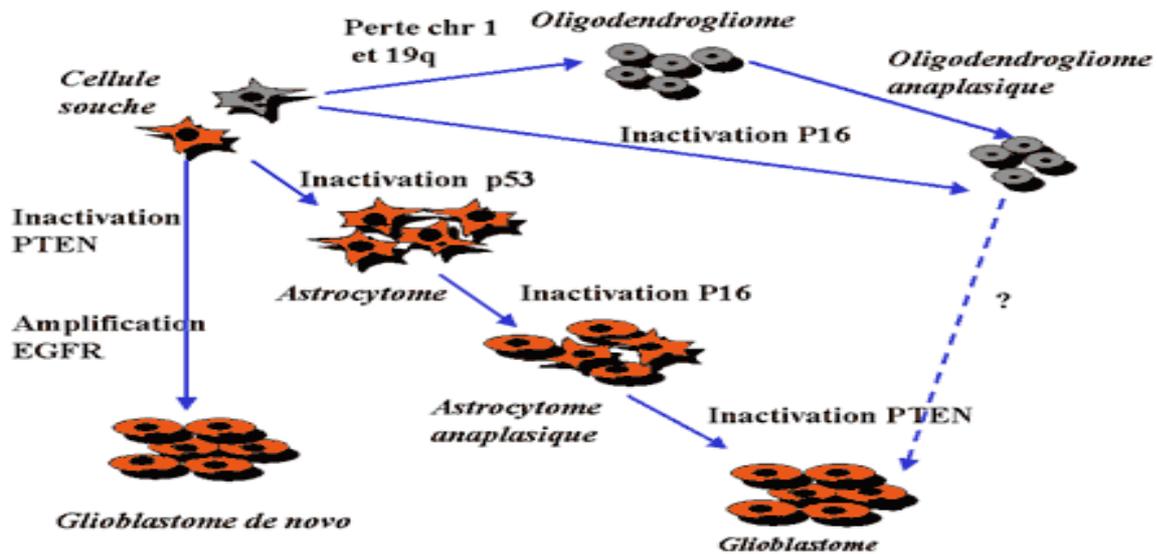


Figure 9: les différentes altérations des gènes qui donnent les différents types des gliomes.

4. Classification des gliomes :

La classification histologique de référence est celle de l’OMS révisée en 2007. Elle est basée sur le type cellulaire prédominant (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte). Un grade est attribué à chaque tumeur en fonction des critères suivants : la densité cellulaire, l’atypies nucléaires, les mitoses, la prolifération micro vasculaire et nécrose.

La classification de l’OMS pose différents types de problèmes. Elle n’est pas reproductible car elle repose sur des critères morphologiques qualitatifs qui laissent une grande part à l’interprétation et à la subjectivité. Ceci explique notamment un taux élevé de discordance selon l’observateur en terme de grade et de « lignage ». Elle ne tient pas compte de l’hétérogénéité tumorale et ne prend pas en considération des données de la clinique et de l’imagerie.

Les gliomes de grade I correspondent essentiellement à l’astrocytome pilocytique, circonscrit bénin. Les gliomes infiltrants sont de bas grade (II) ou de haut grade (III ou IV).

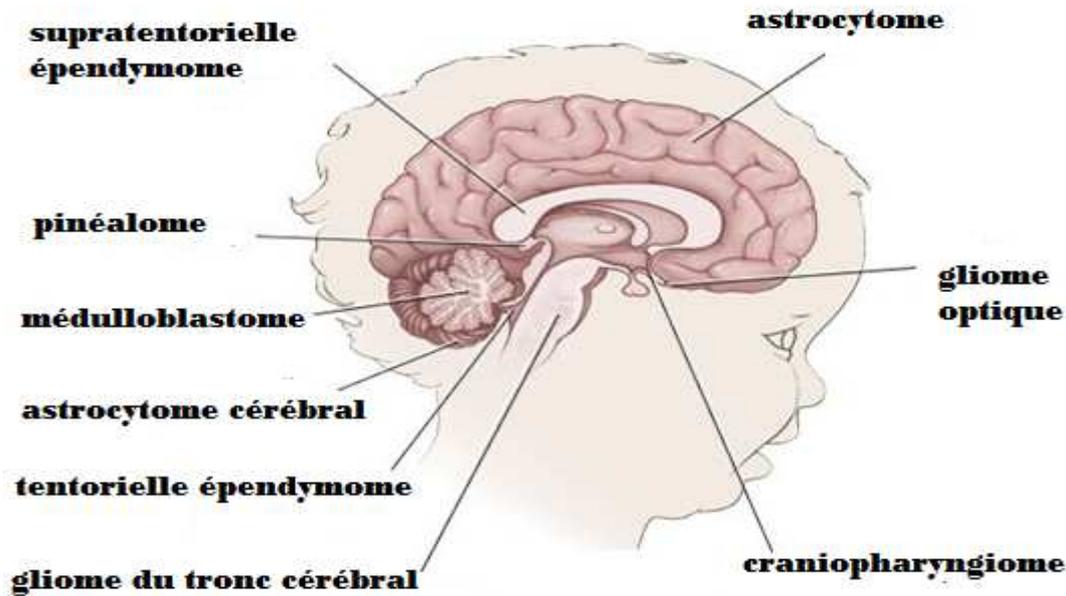


Figure 10 : localisation des différentes tumeurs cérébrales

5. Altérations génétiques liées au gliome :

Les études génétiques réalisées ces dernières années, ont permis de décrire les principales anomalies récurrentes caractéristiques des gliomes. Il s'agit d'une activation de certaines voies de transduction du signal avec amplification d'oncogènes, tels que EGFR, B-raf, dérégulation du cycle cellulaire avec délétion de gènes suppresseurs de tumeurs, tels que p16, p53.

Des modèles de progression tumorale ont été proposés. En revanche, ces anomalies ne sont pas spécifiques d'un type histologique donné et leur valeur pronostique est souvent controversée, à l'exception de la perte totale du chromosome 1p combinée à celle du 19q caractéristique des oligodendrogliomes, leur conférant un bon pronostic. Dans l'avenir, l'analyse du transcriptome ainsi que les travaux portant sur les cellules souches neurales fourniront des éléments clés pour la compréhension des mécanismes de gliomagenèse²⁷. La figure suivante résume l'ensemble des altérations génétiques en fonction des grades de gliome.

Tableau 2 : les gènes altérés dans les différents types de gliome.



	<i>A. Pilo</i>	<i>Oligo</i>	<i>Astro</i>	<i>GBM Haire</i>	<i>GBM de novo</i>
<i>MAPK/BRAF</i>	+++	-	-	-	-
<i>IDH1/IDH2 mut.</i>	-	+++	+++	+++	-
<i>Codel. 1p19q</i>	-	+++	-	-	-
<i>TP53 mut.</i>	-	-	+++	+/-	+/-
<i>EGFR amp.</i>	-	-	-	-	++
<i>Altération voie P53 + voie de RB + activation voie des RTK</i>	-	+/-	+/-	++	+++

IV. Généralité sur B-raf :

1. Gène B-raf^d :

Ce gène code pour une sérine-thréonine kinase. Le B-raf se localise au niveau du bras long q du chromosome 7 (7q34) entre deux gènes appelés NDUFB2 et MRPS33. Sa taille recouvre approximativement 199.622 bases et code pour une protéine (B-raf) de 766 acides aminés.

Localisation du gène Braf

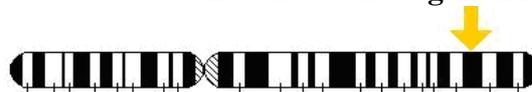


Figure 11 : localisation du gène B-raf sur le bras long q du chromosome 7.

Ce gène contient 18 exons séparés entre eux par des introns de taille différente. L'ARNm de ce gène contient en général 2478pb.

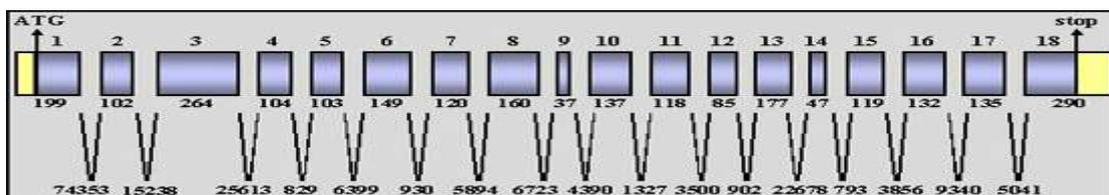


Figure 12 : digramme du gène B-raf. Les exons sont présentés en échelle gris. Les régions intermédiaires représentent les introns. La taille de chaque intron et exon est indiquée dans le diagramme.

2. Protéine B-raf (rapidly accelerated fibrosarcoma):

C'est un proto-oncogène qui appartient à la famille de sérine-thréonine kinase. Son poids moléculaire est 84436 daltons. BRAF est un 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. Ces protéines jouent un rôle clé dans divers procédés physiologiques:

- Le métabolisme cellulaire,
- La progression du cycle cellulaire et la mort cellulaire.

Elles participent à la voie de signalisation des MAP kinases par la transduction du signal mitotique de la membrane cellulaire vers le noyau. L'isoforme B-raf est à peine détectable dans les cellules par rapport aux autres isoformes (A-raf, raf-1). Son expression est prédominante dans les cellules hématopoïétiques, nerveuses, dans les testicules est aussi dans les cellules folliculaires au niveau de la thyroïde.²

Les exons à partir desquelles chaque partie de protéine est transcrite. CR1, CR2, CR3 sont les régions conservées de protéine avec celles de A-raf. Les bras en vert représentent (Ras binding Domain) pour RBD

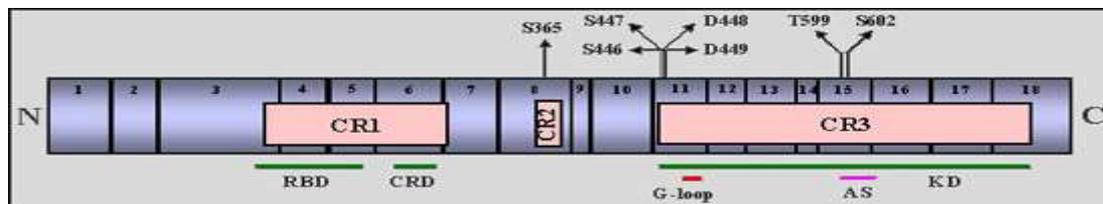


Figure 13 : diagramme de structure de protéine Braf. Les chiffres à côté des régions grises montrent, (Cystéine-rich domain) pour CRD et (Kinase Domain) pour KD. G-loop représente la glycine conservée dans l'exon 11. La région rose dans l'exon 15 est le segment d'activation (AS). Les flèches montrent les sites de phosphorylation de protéine.¹

Une équipe de recherche a démontré que le gène BRAF code pour de multiples isoformes présentant une expression tissu-spécifique et résultant, entre autres, de l'épissage alternatif de deux exons situés en amont de la région codant pour le domaine kinase de la protéine. Ils ont montré que la présence de ces séquences alternatives modulait les propriétés biochimiques et oncogéniques de la protéine B-Raf, et ils ont récemment caractérisé les mécanismes moléculaires responsables de ces différences d'activités.³

La conservation de ces exons alternatifs au cours de l'évolution, ainsi que l'expression tissu-spécifique des différents isoformes suggèrent que chaque isoforme possède des fonctions physiologiques spécifiques. Afin d'identifier ces fonctions, ils ont généré des souris knockout conditionnel permettant l'invalidation des exons alternatifs de B-Raf. Ils ont ainsi montré que les isoformes de B-Raf contenant l'exon alternatif 9 b étaient nécessaires aux processus d'apprentissage et de mémoire chez la souris⁴.

3. Fonction de la protéine B-raf:

La fonction de B-Raf est de relayer les signaux de la membrane cellulaire, ce processus se fait par toute une série de réaction d'activation par phosphorylation des agents intervenants dans la voie Ras-Raf-Mek-Erk. Ras-GTP.

La cascade de signalisation commence à la membrane plasmique où le facteur de croissance se lie au récepteur EGFR provoquant sa dimérisation. La phosphorylation du récepteur active des facteurs d'échange de guanine (GEF), comme SOS. Ces facteurs sont attachés au récepteur par des protéines adaptatrices shc et grb-2. Les protéines GEF, dont SOS, poussent RAS à relarguer le GDP et à l'échanger contre le GTP. En effet, SOS se fixe sur des régions particulières de Ras-GDP (Switch 1 et 2), ce qui déplace S1 du site de fixation de GDP-GTP. Le GDP diffuse laissant la place au GTP. Cela conduit à la forme active de Ras qui est Ras-GTP. Ras GTP active la protéine Raf par une phosphorylation. A son tour, Raf phosphoryle Mek qui active une kinase régulatrice extracellulaire Erk par une phosphorylation. Erk phosphoryle plusieurs cibles qui provoquent des modifications de l'expression des gènes et l'activité enzymatique.²

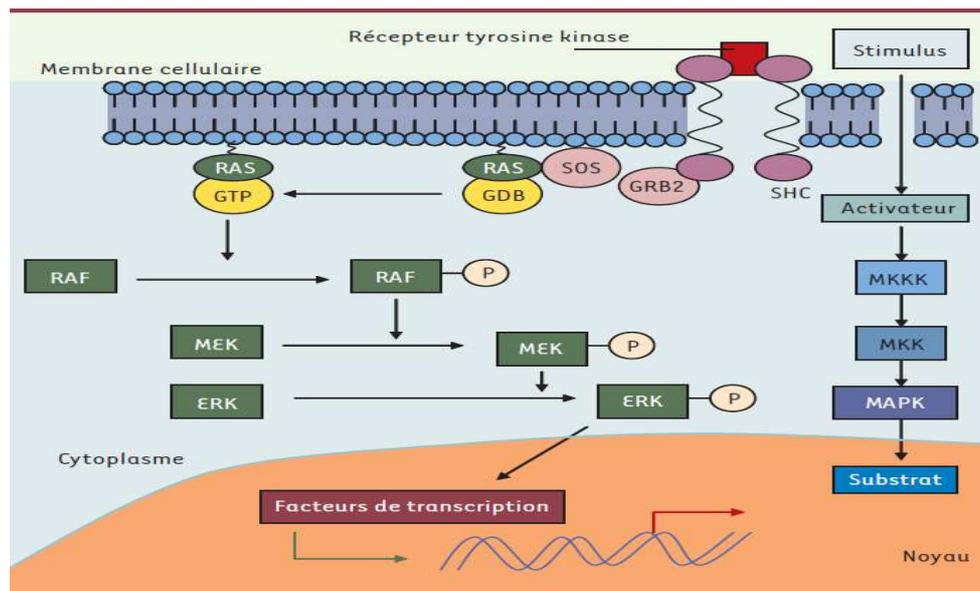


Figure 14: Voie Ras-Raf-Mek-Erk. Ras-GTP active une cascade de kinases par phosphorylation, ce qui a des effets sur la régulation de gènes cibles.

Bien que la relation entre signalisation Ras/B-Raf et oncogenèse soit bien établie, la régulation de l'activité de la protéine kinase B-Raf reste mal connue.

- **Mutations dans le gène B-raf :**

Le génome peut subir des altérations. Si ces dernières ne sont pas réparées, il y aura des modifications de l'expression des gènes. Ceci conduit à la synthèse d'une protéine anormale ou à sa surexpression, c'est ainsi que ces altérations peuvent être à l'origine de maladies, dont beaucoup de cancer.

Pour le gène B-raf, les recherches ont détecté plus de 30 mutations qui peuvent être associées avec le cancer humain. Elles causent la surexpression de ce gène et sa présence fréquente dans la cellule provoque une activation de la division cellulaire et par conséquent le



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

développement des tumeurs cancéreuses. La plupart de ces mutations sont somatiques. La fréquence de mutations de B-raf est différente selon les types du cancer. Le taux d'activation du BRAF kinase est différent selon la mutation et son activité augmente avec la mutation de HRAS¹¹. Des rapports récents montrent qu'elle est présente dans 80% des mélanomes et jusqu'à 18% du cancer colorectal. Dans 90% des cas⁵, la base thymine est substituée par une adénine au nucléotide 1799. Cette substitution conduit à la formation d'une protéine dont la valine est remplacée par un glutamate au codon 600⁶. Cette mutation est appelée V600E. Elle est associée à 8% des tumeurs humaines solides et est fréquemment trouvée dans le cancer de thyroïde, du colon, du poumon et le mélanome.^{7, 8,9} Une équipe de recherche en 2011 a identifié la mutation V600E comme une mutation pilote probable dans 100% des cas de leucémie à tricholeucocytes¹⁰. Les autres mutations 20% sont faux-sens. Elles résident dans les glycines de la G-boucle dans l'exon 11 ou dans le segment d'activation dans l'exon 15 près de la V600. Le tableau suivant résume les différents polymorphismes d'un seul nucléotide (single polymorphism nucleotide SNP) trouvés dans le gène¹¹ :

Tableau 3 : les différentes mutations détectées dans le gène B-raf¹¹.

<i>Substitution dans le gène</i>	<i>Substitution dans la protéine</i>
A1023G	P341P
A1227G	S409S
A1383G	Q461Q
A1797C	T599T
A1929G	G643G
G2272A	G758R
G1388A	G463E
G1388T	G463E
G1394C	G465A
G1394A	G465E
G1394T	G465V
G1403C	G468A
G1403A	G468E
G1753A	E585K
T1782G	F594L
G1783C	G595R



C1786G	L596V
T1787G	L596R
TG1796-97AT	V599D

A côté de ces SNP détectées, il existe d'autres altérations qui peuvent toucher ce gène. Ces altérations caractérisant spécifiquement le cancer cérébral sont : la duplication 7q34³² et la fusion entre KIAA 1549 et BRAF¹²

- Mutation du gène B-raf dans le mélanome :

Différents types d'anomalies chromosomiques ou de niveaux d'expression génique ont été mis en évidence sur des échantillons de tumeur primitive de mélanome. Les anomalies les plus fréquemment retrouvées sont les délétions de fragments chromosomiques au niveau des chromosomes 1, 6, 9 et 10, et des translocations réciproques ou complexes entre les chromosomes 6, 7 et 8, dans plus de 95 % des cas²¹.

Le mélanome acral, qui intéresse essentiellement les zones non photo-exposées, est fréquemment porteur d'un nombre supérieur de remaniements en gain, c'est-à-dire de trisomies, lorsqu'il est comparé au mélanome d'extension superficielle. Les mélanomes survenant en zones photo-exposées, quant à eux, présentent le plus souvent des aberrations sur les régions chromosomiques 13q et 17p. De leur côté, les mélanomes atteignant les muqueuses sont surtout porteurs de translocations concernant les gènes sur les régions chromosomiques 1q, 6p et 8q. Les régions chromosomiques amplifiées contiennent le plus souvent des oncogènes connus (*HRAS*, *CDK4*, *BRAF*, *cyclin D1*), mais également des gènes non identifiés. Plusieurs études concordantes ont donc démontré que la nature des aberrations chromosomiques et le niveau d'expression de ces oncogènes sont corrélés au type anatomoclinique de mélanome et à sa survenue en zone photo-exposée ou non²¹.

BRAF est une molécule agissant en aval de la voie de MAP kinase. Il a été démontré que ce gène intervient dans la pathogenèse de mélanome. BRAF est muté dans 40% à 80% d'échantillons de mélanome. Il constitue un élément précoce dans l'évolution du mélanome puisqu'on peut le trouver dans les tumeurs bénignes¹⁹. Dans la plupart des cas, les mutations de B-raf se localisent dans l'exon 15. La mutation la plus commune est au niveau du codon 600, entraînant la substitution de l'acide glutamique par la valine (mutation V600E)¹⁹. Parfois, des mutations ont été identifiées dans le domaine de la boucle (exon 11). La mutation de B-raf n'est pas associée au développement de mélanome uveal²⁰

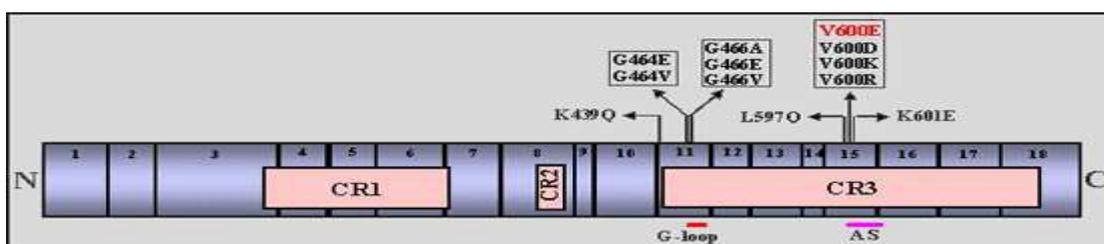


Figure 15 : digramme représentant les mutations de B-raf retrouvées dans le mélanome. Les flèches en noires indiquent les mutations. Les mutations encadrées sont dans le même acide aminé. La mutation la plus connue V600E est en rouge¹.

A côté de ces mutations, il y en a d'autres qui peuvent être rencontrées comme par exemple : la mutation TG1796-97AT qui donne V599D, la mutation G1394C qui donne G465A et la mutation G1394A qui se traduit par une substitution G465E.

- **Effet de mutation de B-raf sur le développement de mélanome :**

Les mutations du gène *BRAF* semblent constituer un élément précoce dans l'évolution du mélanome, la progression métastatique de la maladie et la prolifération vasculaire associée au développement tumoral. Elles sont détectables dès la phase de croissance horizontale de ce cancer. Le transfert *in vitro* du gène *BRAF* muté conduit à des modifications du phénotype des mélanocytes, avec augmentation de leur prolifération et formation de tumeurs²¹.

Associées à un mélanome, les mutations du gène *BRAF* sont plus fréquentes chez les sujets jeunes, lorsque le mélanome survient sur des zones d'exposition au soleil intense et intermittente (dos, jambes). En revanche, ces mutations sont rares sur les zones exposées de manière chronique aux radiations solaires (visage, extrémités des membres), et absentes au cours des mélanomes oculaire et desmoplastique. *In vitro*, la suppression des produits d'expression du gène *BRAF* limite la prolifération cellulaire. Les mutations du gène *BRAF* représente une cible thérapeutique²¹.

- **Mutation de B-raf dans le cancer du colon :**

La mutation de B-raf est présente dans 5 à 10 % des CCR. Presque 95% des mutations de *BRAF* rencontrées dans le cancer colorectal concerne une substitution T-A dans la position 1799 (la mutation V600E). Cette mutation est associée avec une instabilité microsatéllitaire (MSI) dans 40% des cas et avec une stabilité microsatéllitaire (MSS) dans 5% des cas. Les mutations les plus connues qui touchent le gène B-raf sont citées dans la figure suivante.

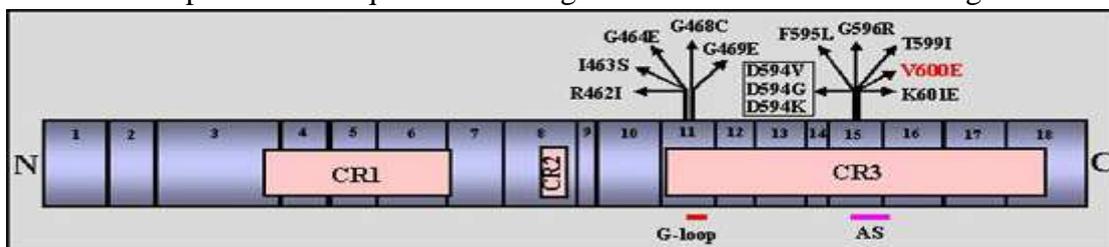


Figure 16 : digramme représentant les mutations de B-raf retrouvées dans le cancer colorectal. Les flèches en noires indiquent les mutations. Les mutations encadrées sont dans le même acide aminé). La mutation la plus connue V600E est en rouge¹.

A côté de ces mutations, des recherches ont mis en évidence d'autres mutations qui peuvent toucher le gène B-raf, comme par exemple la mutation G1783C qui donne G596R, et la mutation G1388T qui se traduit par une substitution G463V¹¹.

La détection de la présence de ces mutations et leur effet sur l'évolution du cancer colorectal, est utilisée seulement en termes de pronostic. Des mutations dans un autre gène sont souvent recherchées et leur détection oriente les oncologues à donner le médicament le plus efficace. Il s'agit du gène K-ras.

- **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 kb³⁸.

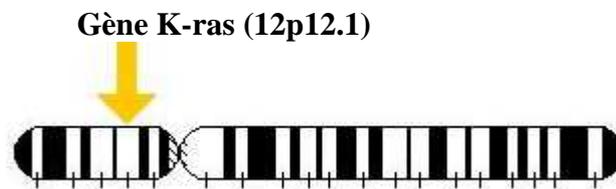


Figure 17 : Localisation chromosomique du gène K-ras sur le chromosome 12

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'adénome³⁹. 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 test *KRAS* est un test de génotypage innovant qui permet de cibler la population la plus susceptible de répondre à un traitement par une thérapie ciblée de type anticorps monoclonal anti-EGFR1. Ce type de test fait partie de la prise en charge personnalisée du patient car selon son résultat, le médecin saura si ce patient peut bénéficier ou non d'un traitement par anticorps anti-EGFR. Ce test contribue ainsi à l'accès de chacun à des traitements innovants et adaptés, accessibles sur tout le territoire, conformément aux mesures 21.1 et 21.2 du Plan Cancer 2009-2013.

- **Altération de B-raf dans les astrocytomes pilocytiques :**

Les astrocytomes pilocytiques se caractérisent spécifiquement par des altérations de gène *BRAF*. La mutation la plus fréquente est une transversion unique dans l'exon 15 (T1799A), qui représente 90% de mutations *BRAF* dans les cancers humains, et conduit à une substitution de valine par l'acide glutamique en position 600 (V600E). Une deuxième mutation a été trouvée dans l'exon 11, qui implique une substitution de la glycine



par une alanine au niveau du résidu 469 (G469A) et qui résulte d'une substitution de guanine par cytosine en position 1406 (G1406C). Ces mutations conduisent à une activité plus élevée de la protéine B-raf qui stimule ERK ([Extracellular signal-regulated kinases](#)) et donne en fin une division cellulaire incontrôlée²⁸.

Un deuxième type d'altération de B-raf rencontré dans les astrocytomes pilocytiques est la duplication 7q34 qui couvre 2,6 Mb de séquence génomique et contient environ 20 gènes. Parmi ces gènes deux sont tumoraux ; HIPK2 et BRAF. Cette duplication donne une expression intense de protéine B-raf et donc une division incontrôlée des cellules²⁹. La RT-PCR suivie par le séquençage a révélé un produit de fusion entre KIAA1549 et BRAF²⁹.

IV. Méthodes de diagnostic :

Les méthodes de diagnostic utilisées par les médecins pour identifier le cancer sont multiples et regroupent la biopsie, ou le prélèvement de cellules du tissu pour examen, l'endoscopie; les rayons X ou scanner, des tests sanguins et l'imagerie médicale nucléaire. Les tissus prélevés passent par un test immunohistochimique. Les résultats de ces tests peuvent révéler la présence et le type du cancer. Ensuite le diagnostic oncogénétique permet d'identifier le problème moléculaire responsable de la maladie et conduit à adapter un traitement selon le principe de la thérapie ciblée.

3. Immunohistochimie :

L'immunohistochimie (IHC) est une technique permettant la localisation de protéines dans les cellules d'une coupe de tissu. Elle consiste en la détection d'[antigènes](#) au moyen d'[anticorps](#). L'immunohistochimie exploite le fait qu'un [anticorps](#) se lie spécifiquement à des [antigènes](#) dans les tissus biologiques. Les anticorps peuvent être d'origine [polyclonale](#) ou [monoclonale](#), les anticorps monoclonaux étant plus spécifiques. Un couple anticorps-antigène peut être visualisé de plusieurs façons. Dans la plupart des cas, un anticorps est conjugué à une enzyme (ex : [peroxydase](#)) qui peut catalyser une réaction de production de couleur (ex: coloration immunoperoxydase). Alternativement, les anticorps peuvent aussi être marqués par un [fluorophore](#) (ex : [FITC](#), [Rhodamine](#), Texas Red ou Alexa Fluor).

L'immunohistochimie est largement utilisée pour le diagnostic et/ou le suivi de [cancers](#) par détection de cellules anormales telles que celles trouvées dans les tumeurs cancéreuses. Des [marqueurs](#) spécifiques sont ainsi aujourd'hui connus pour divers cancers :

- [Antigène carcino-embryonnaire](#) (CEA) : utilisé en cas de cancer du côlon.
- CD117 : utilisé en cas de [tumeur stromale gastro-intestinale](#) et de tumeur de mélanome.

4. Techniques moléculaires :

Les techniques de la biologie moléculaire ont permis, en moins de 30 ans d'établir la carte de 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.

❖ PCR et séquençage des gènes d'intérêt

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 qui permet des mesures quantitatives de molécules d'ADN. Cette technique suivie par le séquençage est utilisée spécifiquement pour la recherche des mutations d'une ou plusieurs bases.

La biologie moléculaire a pris une place importante en cancérologie, dans le cadre d'un diagnostic oncogénétique, orienté par une analyse immunohistochimique en amont. Dans le cas d'étude de B-raf, la PCR suivie par le séquençage sont utilisées spécifiquement pour la recherche des mutations d'une ou plusieurs bases au niveau de ce gène.

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 monocaténaux.
- **Etape 2 : L'hybridation** : fixation des amorces sur les séquences complémentaires. Un refroidissement de l'ADN en présence d'un large excès des deux amorces (oligonucléotides) permet leur hybridation spécifique avec les séquences d'ADN complémentaires.
- **Etape 3 : L'élongation** : synthèse des brins à partir des amorces hybridées par la Taq polymérase : le mélange hybridé 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 entre 20 et 30 cycles 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 dure environ 5 min.

Après la PCR, il faut analyser la séquence nucléotidique du gène amplifié pour vérifier la présence ou non de mutations.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des **nucléotides** pour un fragment d'ADN donné. Il a été inventé dans la deuxième moitié des années 1970.

Deux méthodes ont été développées indépendamment, l'une par l'équipe de **Walter Gilbert**, aux **États-Unis**, et l'autre par celle de **Frederick Sanger**, au **Royaume-Uni**. Ces deux méthodes sont fondées sur des principes diamétralement opposés. L'approche de Sanger est une méthode par synthèse enzymatique sélective, tandis que celle de Maxam et Gilbert est une méthode par dégradation chimique sélective.

Dans la méthode de Sanger, la polymérisation de l'ADN est initiée par un petit oligonucléotide (amorce) complémentaire et 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 triP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) sont ajoutés, ainsi qu'en faible concentration les quatre 2'-3'didésoynucléotides triP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) marqués par des fluorochromes différents. Ces didésoynucléosides, une fois incorporés à la nouvelle chaîne synthétisée, inhibent l'élongation.

Il en résulte de nouveaux fragments d'ADN de taille variable, qui sont ensuite séparés par **électrophorèse** sur un gel de **polyacrylamide**

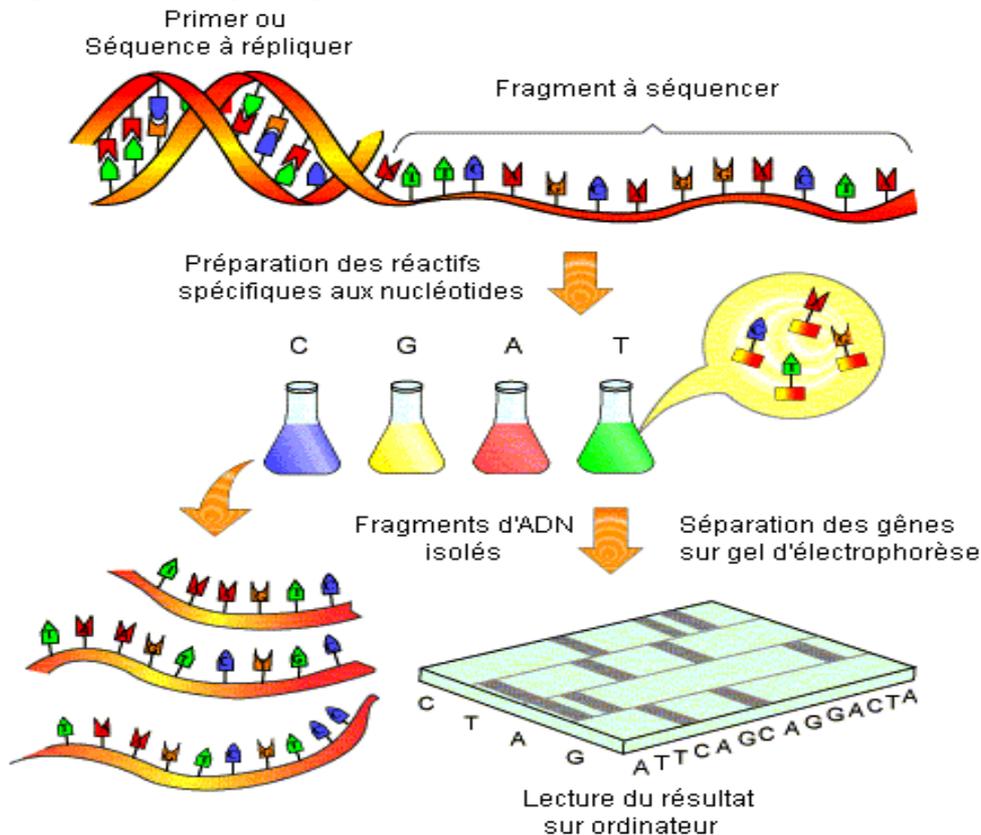
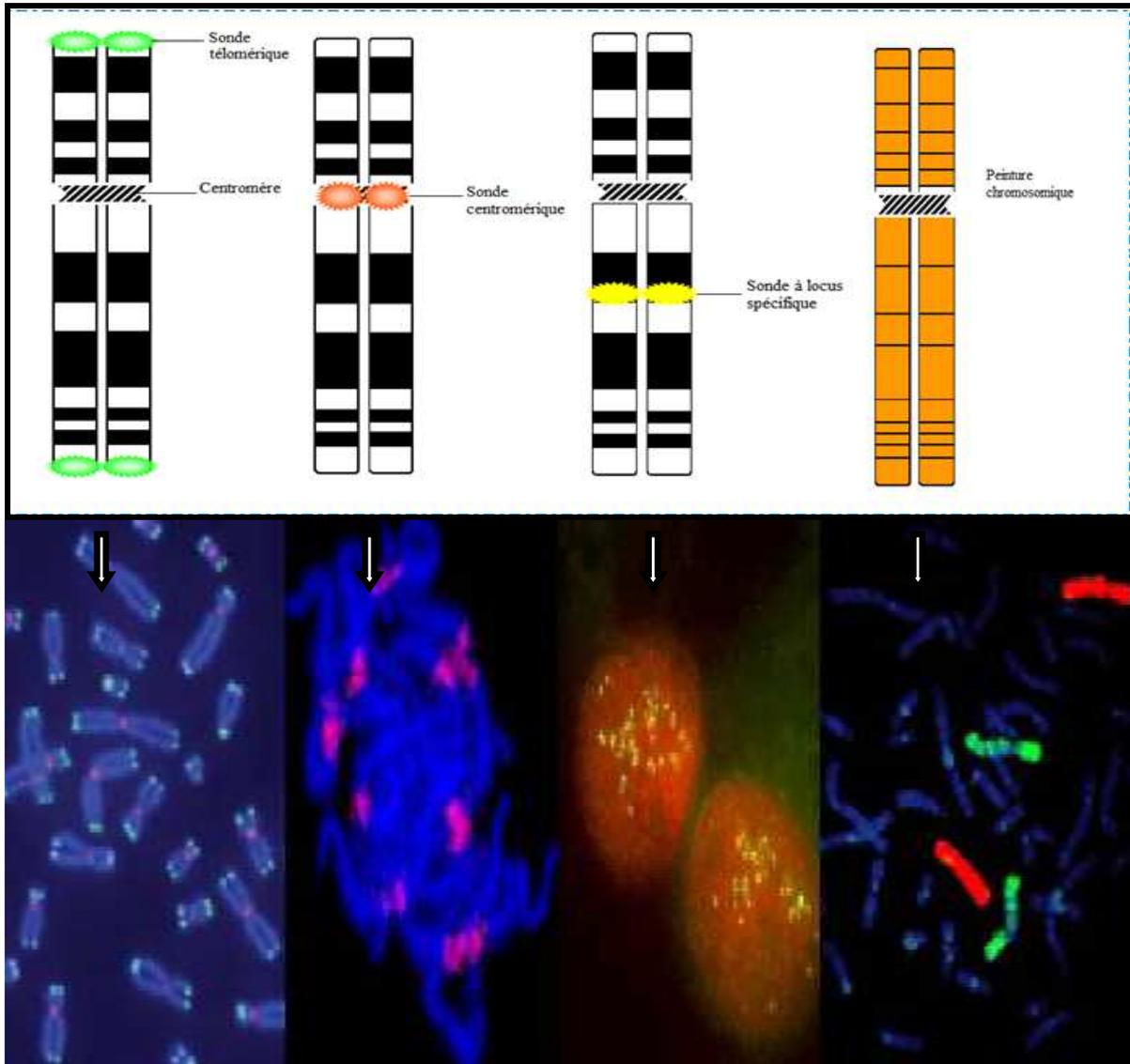


Figure 18 : schémas expliquant le principe du séquençage du génome. Après la PCR, son produit est purifié puis mélangé avec une amorce complémentaire à une partie du fragment amplifiés, les dNTP et les ddNTP fluorescents. Une fois un ddNTP est incorporé il émet un signal détecté par le PC et se traduit en pic coloré.

❖ Hybridation in situ : FISH

Cette technique est basée sur le principe d'hybridation. L'hybridation est un processus moléculaire qui joint deux molécules d'ADN simple brin complémentaires pour former une molécule d'ADN double brin. La FISH utilise ce processus pour localiser des sondes sur des chromosomes cibles. Les sondes sont des petites molécules d'ADN simple brin, marquées par une substance fluorescente. Elles s'hybrident sur les chromosomes cibles sous forme simple brin lorsque leurs séquences sont complémentaires. La fluorescence est ensuite capturée sur une image permettant de localiser les sondes sur les chromosomes cibles.



Figur19: Les différents types de sondes utilisées en FISH, et leur observation correspondantes au microscope après hybridation.

❖ **Northern blot :**

C'est une méthode de **biologie moléculaire** permettant l'analyse de l'**ARN**. Elle dérive du **Southern blot** (appelé ainsi par le biologiste **Edwin Southern** qui a aussi inspiré le nom **western blot** qui fait référence aux séquences en acides aminés des protéines), sauf qu'au lieu d'étudier l'**ADN**, on étudie l'**ARN**. Une **électrophorèse** permet de séparer les ARN en fonction de leur taille. Ces derniers sont ensuite détectés par une **sonde**. Comme dans le transfert de Southern, la sonde d'hybridation peut être faite soit d'**ADN** soit d'**ARN**.

Le northern blot permet d'apprécier la distribution des ARN dans les tissus et d'étudier leur abondance relative, et par conséquent de connaître l'expression plus ou moins importante de certains **gènes**. Enfin, cette technique sert à détecter les intermédiaires de maturation et les



différentes formes d'épissage des ARN, ainsi que les gènes de grande taille ou de fusion (exp : fusion entre KIAA1549 et BRAF).

- **Thérapie ciblée :**

Il existe classiquement trois armes contre le cancer représentées par la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie cytotoxique. Cette dernière permet incontestablement de sauver des vies mais au prix d'une toxicité importante. Une révolution est en marche grâce aux thérapies ciblées. Celle-ci est permise grâce aux progrès de la recherche notamment dans la compréhension des mécanismes de fonctionnement de la cellule cancéreuse. Ces médicaments ont une action ciblée en intervenant à un niveau précis du développement de la cellule tumorale. Ils interviennent principalement dans la transduction des signaux (signaux qui demandent à la cellule de se multiplier...). La voie des tyrosines kinases est la mieux connue à ce jour.

Cette voie peut être bloquée par des anticorps monoclonaux (MAB) ou des inhibiteurs enzymatiques (INIB):

En agissant sur des récepteurs spécifiques, ces médicaments peuvent :

- **Bloquer la croissance des cellules cancéreuses**, c'est le cas du TRASTUZUMAB/Herceptin®, et également du PERTUZUMAB/OMNITARG® ou du LAPATINIB/TYKERB® ;
- Affamer la tumeur en l'empêchant de détourner le système sanguin à ses fins en **s'opposant à la formation des nouveaux vaisseaux** formés en périphérie de la tumeur et qui contribuent à sa croissance en l'irriguant (**angiogénèse**). Parmi ces composés anti-angiogéniques, on peut citer le BEVACIZUMAB/Avastin® ou le SUNITINIB/SUTENT® ;
- **Diriger les réactions immunitaires** de l'organisme contre ces cellules cancéreuses. Ces thérapeutiques vaccinales sont développées dans les cancers du sein, de la prostate et du rein ;
- **Commander la mort de la cellule cancéreuse**, il s'agit de stimuler l'apoptose, la mort naturelle de la cellule. Ce phénomène n'est plus effectif chez la cellule tumorale qui cesse de se diviser. Quelques produits sont en développement pour les cancers des voies aéro-digestives supérieures (tête et cou).

Les médicaments largement utilisés de nos jours en thérapie ciblée et ayant significativement amélioré le traitement de certains cancers sont les suivants :

- **Le Cetuximab (Erbix)** est un anticorps monoclonal qui se lie à un facteur de croissance épidermique humain (EGFR) et sa liaison entraîne la non activation des signaux intracellulaires (KINASES) diminuant la croissance cellulaire et induisant la mort par apoptose³¹. Il est utilisé dans le cancer du colon en phase métastatique améliorant considérablement la réponse à la chimiothérapie. En plus il est utilisé dans le cancer de la sphère ORL et probablement bientôt pour le cancer du poumon. Son principal effet secondaire est de produire une poussée d'acné qui peut être sévère. La

liste des thérapies ciblées se développe considérablement. Aujourd'hui une dizaine de molécules sont prescrites en pratique quotidienne et plus de 150 sont en développement.

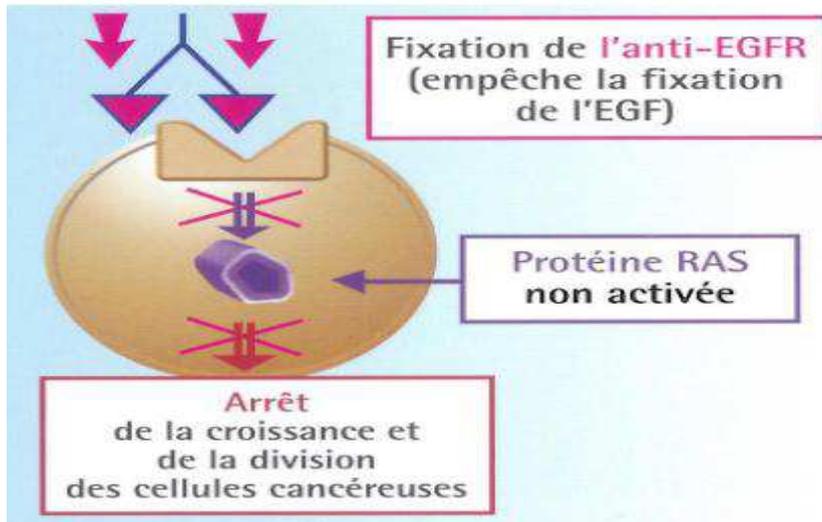


Figure20: action de l'anti-EGFR sur la prolifération cellulaire.

- *PLX4032 (Plexikon; RG7204)* est un inhibiteur de BRAF avec la mutation V600E dans le traitement de mélanome. Son utilisation doit être seulement en très faible concentration (qlq nM)³⁰.

Dans un premier temps ces molécules ne devraient pas directement supprimer les thérapeutiques classiques (chimiothérapie, radiothérapie) mais s'y associer pour en améliorer la réponse. Probablement dans l'avenir, elles seront l'unique traitement parfaitement adapté.

- **Les différentes stratégies d'inhibition de la prolifération tumorale**

La thérapie ciblée peut agir à différents niveaux :

- 1) L'anticorps se lie au ligand. Le ligand spécifique ne pourra pas se fixer au domaine de liaison du récepteur.
- 2) L'anticorps se lie au récepteur. Le ligand ne pourra pas se lier au récepteur car le site de liaison du récepteur n'est plus accessible.
- 3) Des inhibiteurs enzymatiques bloquent la transduction du signal générée par la liaison du ligand sur le récepteur.

Dans les trois cas, la prolifération tumorale est inhibée.

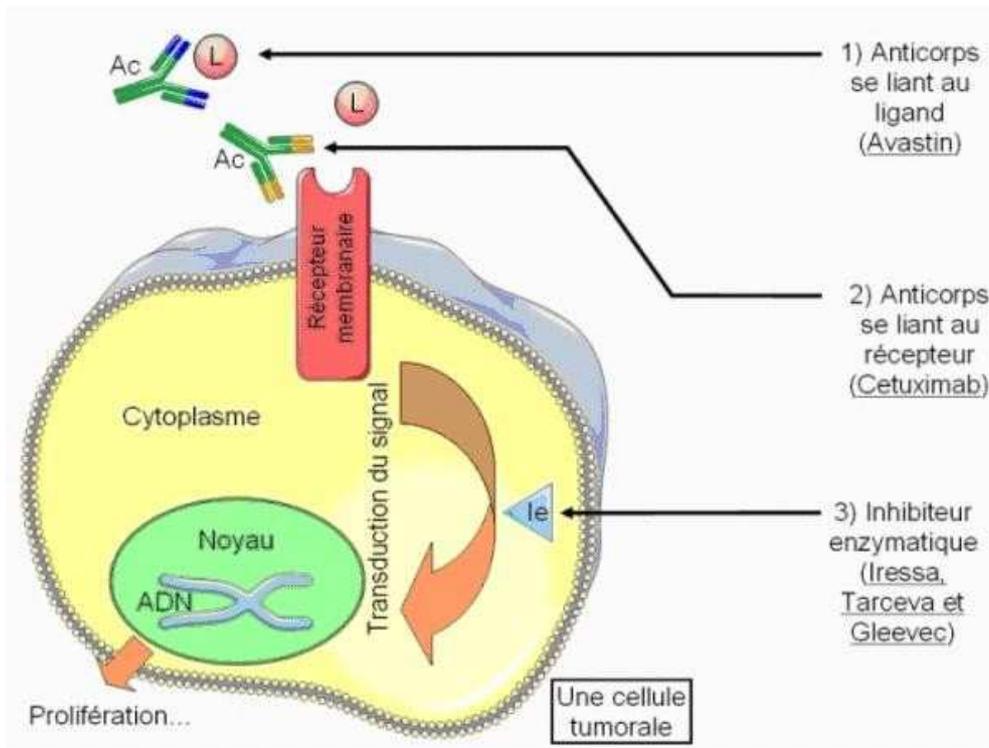


Figure 21: les voies d'inhibition de la prolifération cellulaire.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Matériel et méthodes

I. Matériel utilisé :

Il s'agit d'une étude prospective portée sur une série de 70 patients : 34 ayant un cancer colorectal, 26 ayant un mélanome issu des tumeurs primitives ou des métastases et 10 patients ayant un astrocytome pilocytique. Ces patients ont été colligés au sein du laboratoire d'oncologie et biologie moléculaire de CHU Hassan II de Fès, afin d'évaluer l'implication du gène B-raf comme facteur prédictif et pronostic dans le diagnostic et le traitement de ces cancers.

II. Méthode :

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

5) Biopsie :

Elle correspond au prélèvement d'un échantillon à partir de tissus de l'organisme, dans le but de réaliser un examen microscopique. 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 ne doivent pas être prélevés.
Fragment de biopsie



Figure 22 : Biopsie sous forme de plusieurs fragments.

6) Examen histologique sur tissu fixé :

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

La technique est réalisée en cinq étapes:

- ➔ La fixation.
- ➔ L'inclusion.
- ➔ La microtomie.
- ➔ La coloration.

→ Le montage.

f) La fixation :

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

Le but de cette étape est de s'opposer à l'autolyse tissulaire et à la putréfaction, pour 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 de l'échantillon. Le laboratoire d'anatomopathologie utilise le formol 10% dont la durée d'action et le volume sont proportionnels à la taille de la pièce.

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

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



Figure 23 : inclusion des fragments dans les cassettes

g) L'inclusion :

Elle a pour but d'enfermer le prélèvement dans une substance qui le pénètre et l'infiltre. 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. Vu qu'elle n'est pas non plus soluble dans l'alcool utilisé pour la déshydratation ; une double substitution doit être réalisée : l'eau est remplacée par de l'alcool (déshydratation) et l'alcool est remplacé par le toluène (substitution).

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



Figure 24 : Histokinette

L'étape qui consiste à faire séjourner les pièces dans une série de liquides intermédiaires s'appelle la circulation. Les étapes de la circulation sont :

- ✓ **Fixation dans 2 bains de Formol 10% (30 min x 2)**
- ✓ **Déshydratation dans 5 bains d'Alcool de degré croissant 75%, 80%, 90%, 95%, et absolu (1h x 3, 1h30 et 2h)**, pour 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 3 bains de Toluène (1h, 1h30 et 2h)** : Cette étape permet le remplacement de l'alcool par un solvant de la paraffine, qui est destiné à chasser l'alcool par trois bains successifs de toluène. En remplaçant l'agent déshydratant, le tissu devient transparent d'où le nom d'éclaircissement.
- ✓ **Enrobage dans 2 bains de Paraffine (2h et 3h).**

Il s'agit de 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 25 : Enrobage dans la paraffine

h) 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, et après réglage du rasoir de manière à dresser une face de coupe nette, ainsi qu'un réglage de l'épaisseur des coupes ($3-5\mu$) ; la réalisation des rubans est effectuée.



Figure 26: 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.

i) Coloration :

j) La coloration histologique 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.

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

• **Déparaffinage :**

Il 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 consiste à mettre tout d'abord les lames dans l'étuve à 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, le toluène est d'abord remplacé par l'alcool, puis les coupes sont passées dans un bain d'eau courante, et l'eau remplacera ainsi l'alcool du fait de leur miscibilité.

k) **Le montage :**

Cette opération consiste, une fois la coloration 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 27 : 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 immunohistochimie.

7) **Immunohistochimie:**

c) **Principe:**

Avant d'avoir recours aux outils moléculaires, la méthode d'immunohistochimie (IHC) permet d'étudier sur une coupe histologique l'expression tissulaire des antigènes, cellules, organites cellulaires, bactéries, virus, etc. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer. Des traceurs (molécules fluorescentes, enzymes etc.) fixés directement ou indirectement sur cet anticorps permettent de voir la réaction.

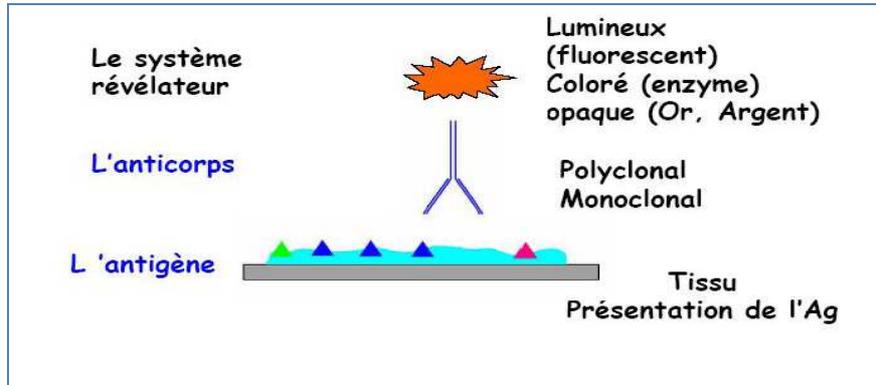


Figure 28 : Les différents composants d'une immunoréaction

- Pour les échantillons de mélanome, les anticorps utilisés sont : melan1 et PS100.

d) 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. Un rinçage à l'eau courante puis à l'eau distillée termine cette étape.

❖ Technique

Les lames sans égouttées puis passées dans H₂O₂ à 0,4% (H₂O 30%) pendant 10 min. Plusieurs tissus contiennent des peroxydases endogènes qui peuvent donner des réactions non spécifiques c'est pour cela que les tissus sont traités par H₂O₂ puis rincés avec le tampon PBS pendant 5 min.

Un Rinçage à l'eau courante puis à H₂O distillé pendant 10 min est ensuite réalisé, ainsi d'un Passage des lames dans le tampon citrate bouillant (cocotte) pendant 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. Après rinçage des lames avec l'eau distillée puis PBS (1 bain) pendant 5 min elles sont ensuite égouttées.

Les fragments sont entourés par le Pap-Pen. Le bloquant est mis sur le fragment (lait écrémé 0,4%) et les lames sont disposées dans une chambre humide pendant 10 min. le surplus du bloquant est éliminé en secouant la lame et l'anticorps primaire est appliqué. les lames sont cachées par un couvercle pour qu'elles ne sèchent pas pendant 1h puis rincées par 3 bains de PBS 5 min chacun et l'anticorps secondaire est ensuite appliqué (15 min). les lames sont couvertes pour qu'elles ne sèchent pas et rincées une autre fois dans 3 bains de PBS 5 min chacun. Une goutte de la peroxydase est appliquée sur chaque fragment. La réaction dure 15 min. Après ce temps, les lames sont rincées dans 3 bains de PBS et égouttées. Sur chaque lame le substrat chromogène fraîchement préparé (2 gouttes + 5 ml d'AEC) est appliqué 4-15 min. Pour la révélation du complexe Ag-Ac primaire, une technique basée sur l'utilisation de Streptavidine-Biotine est utilisée. Les lames sont rincées à l'eau courante 10 min, égouttées, puis l'hématoxyline est appliquée pendant 3 min. deux



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

rinçages à l'eau de robinet et à l'eau distillée sont réalisés et enfin les lames sont montées à l'eau.

8) Etude moléculaire :

g) Extraction d'ADN à partir de tissus tumoraux

❖ But :

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

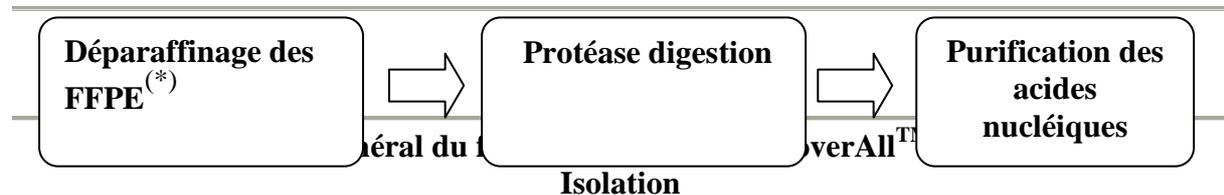
❖ Kit utilisé :

RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit.

❖ Principe général :

Les tumeurs identifiées incluses en paraffine sont incubées dans le xylène ou toluène à température élevée (afin d'enlever la paraffine des tissus), et ensuite lavées 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.



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

❖ Protocol experimental d'extraction:

• Préparation des solutions de lavage :

Deux solutions de lavage sont utilisées (wash 1 et wash2/3).

42 ml d'éthanol 100% sont ajoutés à la bouteille de concentré de lavage Wash 1.

48 ml d'éthanol 100% sont également ajoutés à la 2ème solution de lavage Wash 2/3.

• Déparaffinage

Dans un tube de 1,5 ml contenant 8 coupes de 10 µm ou 4 coupes de 20 µm, 1 ml de Xylène ou de toluène est ajouté. Le traitement au xylène est nécessaire pour éliminer le complément de paraffine.

Une centrifugation brève est réalisée, et les échantillons sont incubés 3 min à 50°C pour faire fondre la paraffine. Une centrifugation à vitesse maximale pendant 2 min à 140 rpm x 100 permet d'éliminer le xylène.

Le culot est lavé avec l'éthanol absolu 2 fois pour enlever l'excès de xylène (ajouter 1ml d'éthanol, vortexer, centrifuger 140 rpm 2 min) x 2.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Le surnagent est enlevé et le culot est séché dans l'étuve à 45°C pendant 30 min pour éliminer l'éthanol.

- **Digestion à la protéase :**

La digestion de la membrane cellulaire se fait par élution de l'échantillon dans un volume précis de tampon de digestion. Le volume utilisé dépend de la taille de l'échantillon.

Le tampon de digestion et 4 µl de la protéase K sont mélagés .

Tableau 4 : 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	104

104 ou 204 µl du mélange sont déposés dans chaque tube. Ces derniers sont mélangés légèrement du bout des doigts pour décoller les culots. Si nécessaire, il faut faire immerger le bout sortant avec un cône. Les échantillons sont incubés pendant 16H à 50°C au bain marie. Si au bout de 16 H, des culots très clairs sont obtenus, on arrête l'incubation, sinon le temps d'incubation sera augmenté.

- **Isolement des acides nucléiques**

L'isolement de l'ADN des débris protéiques et cellulaires se fait par un mélange isolation additif/ éthanol préparé au préalable. Après avoir Préparé le mélange « Isolation Additif/Ethanol », il sera ajouté à l'échantillon et mélagé.

Tableau 5: Volume du mélange Isolation Additif/Ethanol selon le volume du tampon de digestion

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

Le mélange est passé à travers un filtre à cartouche puis lavé avec 700 ml de la solution de lavage Wash 1. Une centrifugation pendant 30sec permet d'éliminer les débris restants sur le filtre qui sera remplacé sur le même tube de collecte x 2. Un Lavage avec 500 ml de la solution de lavage Wash 2/3 suivi d'une centrifugation 30 secondes à 10000 rpm sont réalisés. Les débris restants sur le filtre sont jetés et le filtre est placé sur le même tube.

- **Digestion à la nucléase et purification finale de l'ADN**

Afin de purifier l'ADN, il est nécessaire de dégrader les ARN contenus dans l'échantillon. Le mélange RNase est préparé au préalable.

Tableau 6: Volume de chaque constituant du mélange RNase



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Volume (par réaction)	Composant
10 μ l	RNase A
50 μ l	Eau sterile ultra pure

60 μ l du mix sont ajoutés au centre du filtre, puis incubé à température ambiante pendant 30min. 700 μ l de Wash 1 sont ajoutés, suivis d'une incubation 30 sec à température ambiante. Une centrifugation à vitesse maximale 100 rpm x 100 pendant 30 sec permet d'éliminer le liquide. Les échantillons sont ensuite lavés 2x avec 500 μ l de Wash 2/3, puis centrifugés pour éliminer le liquide résiduel. Le filtre est transféré dans un nouveau tube de collecte. 60 μ l de la solution d'éluion à 95°C sont ajoutés suivis d'une centrifugation pendant 1min à 140 rpm x 100. L'ADN est enfin récupéré et conservé à -20°C.

h) Test qualité de l'ADN : dosage des acides nucléiques:

❖ But :

Après extraction de l'ADN à partir d'un tissu tumoral, un test qualité de l'ADN est réalisé.

La concentration de l'ADN extrait est estimée par spectrophotométrie. 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.

❖ Principe :

En biologie moléculaire, ce test est utilisé après l'extraction de l'ADN, pour le quantifier et déterminer sa pureté. On utilise la longueur d'onde 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques dans l'ultraviolet. 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 $R = A(260)/A(280)$ permet d'évaluer la pureté de l'ADN. Il doit être compris entre 1,8 et 2. Si R est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. Si le rapport est supérieur à 2, cette valeur 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.

i) Amplification de l'ADN extrait par PCR :

❖ **Principe :**

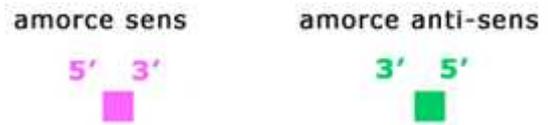
Le principe de la PCR consiste à utiliser, de manière répétitive, l'une des propriétés des ADN polymérase, celle de ne pouvoir synthétiser un brin complémentaire d'ADN qu'à partir d'une amorce.

❖ **Les acteurs de la PCR**

1. L'ADN : généralement sous forme de double-brin, il contient le fragment à amplifier. Il sera représenté de la façon suivante:



2. Deux amorces, sens et anti-sens. Ce sont de petits brins d'ADN d'environ 20 bases, (appelés oligonucléotides), capables de s'hybrider de façon spécifique, grâce à la complémentarité des bases, sur le brin d'ADN ou sur son brin complémentaire. Les amorces sont choisies de façon à encadrer la séquence d'ADN à amplifier.



3. Une enzyme : La Taq Polymerase (Taq Pol), une ADN polymérase thermorésistante extraite de la bactérie *Thermus aquaticus*. Sa température optimale d'action est de 72°C et elle est capable de résister à des passages successifs à 95°C, ce qui a rendu possible l'automatisation de la procédure.



4. Nucléotides : dGTP, dATP, dTTP, dCTP, appelés globalement dNTPs (DésoxyNucléotides-Tri-Phosphates), qui sont les éléments de base utilisés par la Taq Pol pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires.



❖ **La réaction**

Une réaction de PCR correspond à la succession d'une trentaine de cycles comportant chacun 3 étapes :

- Dénaturation
- Hybridation

- Elongation

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube qui sera soumis aux différentes températures correspondant à chaque étape. Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thermocycleur.

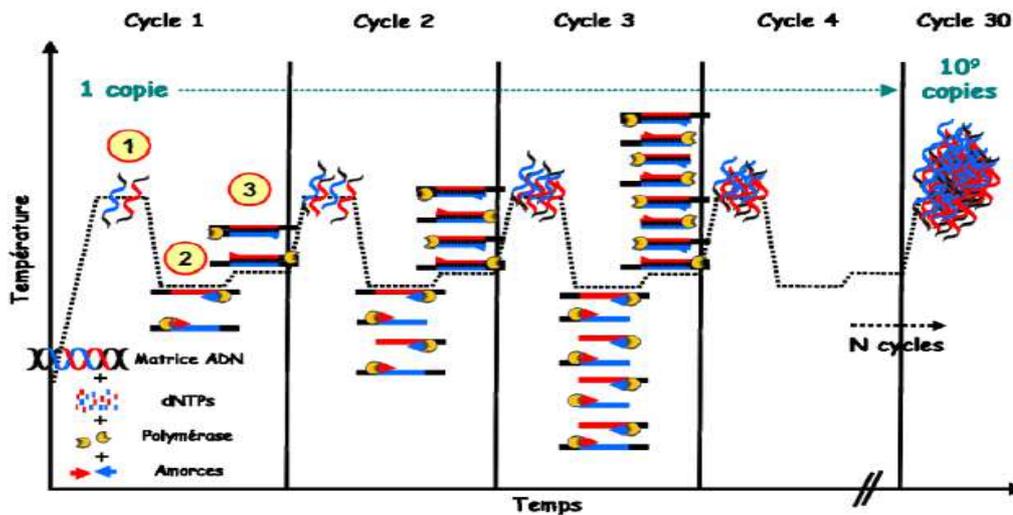


Figure 30 : schéma général d'une réaction de polymérisation en chaîne

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

❖ *protocole expérimental :*

Une dilution d'ADN dans l'eau stérile est réalisée pour avoir une concentration de 10 ng/μL pour les échantillons de colon et 20ng/μl pour les échantillons de mélanome et cérébral.

Les amorces utilisées pour l'amplification de l'exon 15 du gène B-raf sont :

Tableau 7 : les amorce utilisées dan la PCR de l'exon 15 du gène B-raf

NOM	référence	SEQUENCE 5' - 3'
Amorce sens: BRA _F _15F	Eurofins MWG operon	TGC-TTG-CTC-TGA-TAG- GAA-AAT-G
Amorce antisens: BRA _F _15R	Eurofins MWG operon	GTA-ACT-CAG-CAG-CAT- CTC-AGG-G

L
es
amor
ces
utilis
ées
pour

l'amplification du gène KRAS (l'exon 2 de 115pb) pour l'ADN extrait à partir des tumeurs du colon sont :



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

*KRAS 2 BIS +/- :

KRAS 2BIS+/ AGGCCTGCTGAAAATGACTG (20nt)

KRAS 2BIS - / TGGATCATATTCGTCCACAAAA (22nt)

- le mix PCR est préparé selon les indications du tableau 7 :

Tableau 8: les réactifs utilisés dans la PCR

MIX PCR	Concentration initiale	Volume pour 1 réaction
Eau stérile		30.6 µl
Amorce sens F	10 µM	2 µl
Amorce anti-sens R	10 µM	2 µl
dNTPs	10 µM	1 µl
MgCl ₂	25µM	4 µl
Tampon PCR	10X	5 µl
Taq polymérase	5U/µl	0,4 µl
Volume total		
45 µl		

Le mix préparé est aliquoté à raison de 45 µl par tube. Ensuite, 5µl d'ADN sont ajoutés dans chaque tube pour avoir un volume total de 50 µl. Les tubes sont placés dans le thermocycleur et le programme suivant est lancé :

Tableau 9: programme de thermocycleur

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	∞

j) Détection et analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose :

❖ **Principe :**

L'électrophorèse est l'une des principales techniques utilisées en biochimie ou biologie moléculaire pour la séparation des protéines ou des acides nucléiques. Dans un milieu donné, la séparation des particules se fait en fonction de leur charge électrique (déplacement d'ions sous effet d'un champ électrique) et pour des charges identiques, en fonction de leur taille. Les molécules anioniques (-) migrent vers l'anode (+) et les molécules cationiques (+) se déplacent vers la cathode (-).



La molécule d'ADN est un polynucleotide chargé négativement. Les charges sont portées par les groupements phosphate du squelette. La molécule d'ADN placée dans le tampon (TAE 1X, pH 8) va migrer vers l'anode (+).

La migration de l'ADN sous l'effet du champ électrique va se réaliser dans l'épaisseur du gel poreux d'agarose dans lequel l'ADN a été déposé. Les pores de ce gel vont se comporter comme un tamis qui freine le déplacement des fragments d'ADN.

La vitesse de migration des fragments sera déterminée par :

- la résistance du gel à la migration des fragments proportionnelle à leur taille,
- la charge des fragments proportionnelle à leur taille,
- la concentration du gel en agarose

Les fragments d'ADN vont donc se séparer en fonction de leur taille. Si le facteur le plus important est la résistance du gel à la migration de l'ADN, ce sont les plus petits fragments qui migreront le plus loin.

❖ **Préparation du gel d'agarose 2% :**

A la fin de la PCR, un gel d'agarose de 2% est préparé. Pour ce, 1g d'agarose est solubilisé dans 50 ml de TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA). Le mélange est chauffé au micro-onde, puis 2 μ L de BET sont ajoutés. Pour chaque échantillon, 5 μ l de produit PCR est mélangé avec 2 μ l de tampon de charge. La migration à 100V est lancée. Les bandes sont visualisées à l'aide des ultraviolets.

k) **Séquençage des produits PCR des gènes BRAF :**

❖ **But :**

- ❖ A la fin de la PCR, un gel d'agarose de 2% est préparé. Pour ce, 1g d'agarose est solubilisé dans 50 ml de TAE 1X (Tris-Acétate-EDTA). Le mélange est chauffé au micro-onde, puis 2 μ L de BET sont ajoutés. Pour chaque échantillon, 5 μ l de produit PCR est mélangé avec 2 μ l de tampon de charge. La migration à 100V est lancée. Les bandes sont visualisées à l'aide des ultraviolets.

• **Purification par l'exosap :**

2 μ l de l'enzyme ExoSAP sont ajoutés à 5 μ l du produit PCR. Ce kit est conçu pour une purification rapide et efficace des produits PCR. Il comporte deux enzymes hydrolytiques ; l'exo I qui dégrade les ADN simples brins et la phosphatase alcaline des crevettes (SAP) qui hydrolyse les dNTP libres en excès. L'enzyme est active à 37°C et inactive à 80°C. Les fragments simples brins inférieurs à 100 Pb sont ainsi dégradés. Le mélange est placé dans le thermocycleur selon le programme suivant:

Tableau 10 : programme de thermocycleur pour la première purification de produit de PCR

Température	Durée



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

37°C	15 min
90 °C	15 min

- **Reaction de séquence par Big Dye^R. terminator :**

La réaction de sanger repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase (Big Day) de ddNTP. Ces derniers sont présents dans le milieu réactionnel et chacun est marqué par un fluorophore spécifique, dont le spectre d'émission est spécifique.

Une analyse spectrale va différencier les différents fluorochromes associés à la base correspondante et donc, définir la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial. Les fragments d'ADN synthétisés portent ce fluorophore terminal, on les appelle des terminateurs d'élongation ou Big dye terminator.

Le mix PCR est préparé selon les indications du tableau suivant:

Tableau 11: produit de réaction de séquence

<i>produit</i>	<i>Volume utilisé en μL</i>
Big dye 1.1	2
Amorce F ou R (6 μ M)	1
Produit de purification	4
Eau stérile	3
Volume totale	10

Le mix est centrifugé rapidement puis placé dans le thermocycleur selon le programme suivant :

Tableau 12 : programme de thermocycleur pour la réaction de séquence

96°C	10s
50°C	5s
60°C	4min
25 cycles	

- **2^{ème} Purification de produit de PCR :**

Le kit big dye terminator permet la purification des produits de réaction de séquence en capturant les dyes non incorporés dans la réaction et d'autre molécules chargées qui pourraient interférer lors de la détection de bases par électrophorèse capillaire.

Le mix suivant est préparé :

Tableau 13 : produit de 2^{ème} purification

produit	Volume en μL
SAM	45
x-terminator	10
Produit de séquence	10

Volume final 65

Le mélange est vortexé pendant 30 min puis centrifugé à vitesse maximale pendant 2 min. les échantillons sont finalement lancés dans le séquenceur.

- **Détermination de séquence :**

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

Séquenceur capillaire 3500Dx.

- 1) **Lecture de la séquence :**

Une fois la réaction de séquençage terminée, la taille des fragments obtenus est déterminée par une chromatographie. Le séquenceur détecte la fluorescence sortant des colonnes de chromatographie repérant ainsi les fragments d'ADN et leur taille précise. Le résultat est présenté dans l'appareil sous forme de courbes présentant la fluorescence détectée et l'interprétation qui en est faite en termes de nucléotides.

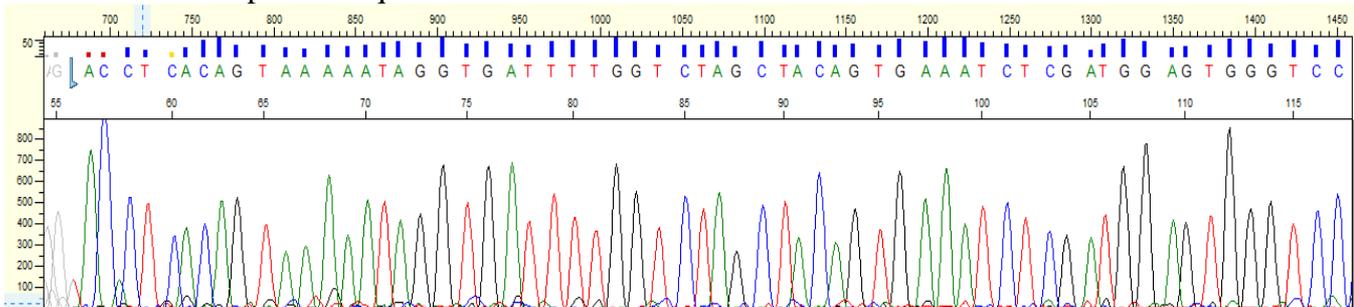


Figure 31: image d'un résultat de séquençage. Pic en bleu :C. pic en rouge : T. pic en vert : A. pic en noir : G

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 + ddGTP fluorescent rouge



Résultats

I. Etude statistique

Pour évaluer les caractéristiques épidémiologiques des différentes tumeurs étudiées, une étude statistique rétrospective a été réalisée. Les cas étudiés ont été recrutés et recensés au sein du service d'anatomie pathologique du CHU Hassan II de Fès par l'unité de génétique médicale et d'oncogénétique.

Au cours des ces deux dernières années, une augmentation du nombre de patients souffrant d'un cancer donné a été remarquée. Cette augmentation peut être en partie expliquée, par l'inauguration du nouveau CHU Hassan II de Fès et par conséquent, le



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

recrutement de plus de malades, provenant des différentes localités autour de Fès pour la prise en charge. La présence d'un CHU, implique l'augmentation de la capacité litière et la mise en place de nouvelles techniques d'exploration et de biopsie (biopsie écho-guidée pour le cancer de prostate, biopsie scanno-guidée...).

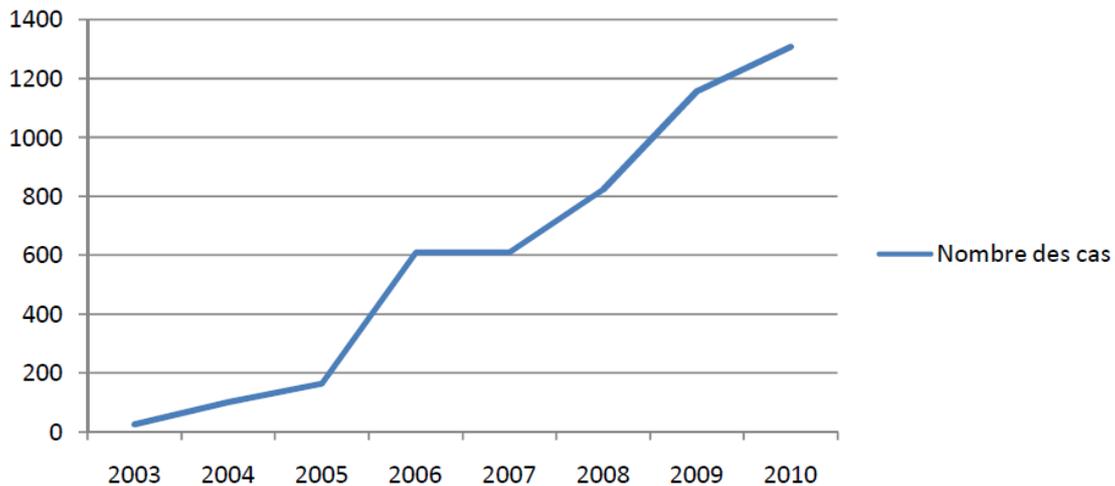


Figure 32 : répartition du nombre de cas du cancer au cours des années 2004-2010

Le CHU Hassan II de Fès a enregistré entre 2004 et 2008, 3070 cas de cancers, représentant 55,48% de l'ensemble des cas. Entre 2009 et 2010, il a colligé seulement 2462 cas, représentant 44,52% de l'ensemble des cas. Par conséquent, le CHU a réalisé une étude statistique incluant uniquement les cas recensés entre 2009 et 2010, afin de réduire au maximum le biais de recrutement dans sa série et de mettre le point sur les changements épidémiologiques observés avant et après l'inauguration du CHU. La comparaison des résultats statistiques réalisés entre 2004 et 2008 ainsi que celle enregistrée entre 2009 et 2010 sont présentées dans le graphe suivant :

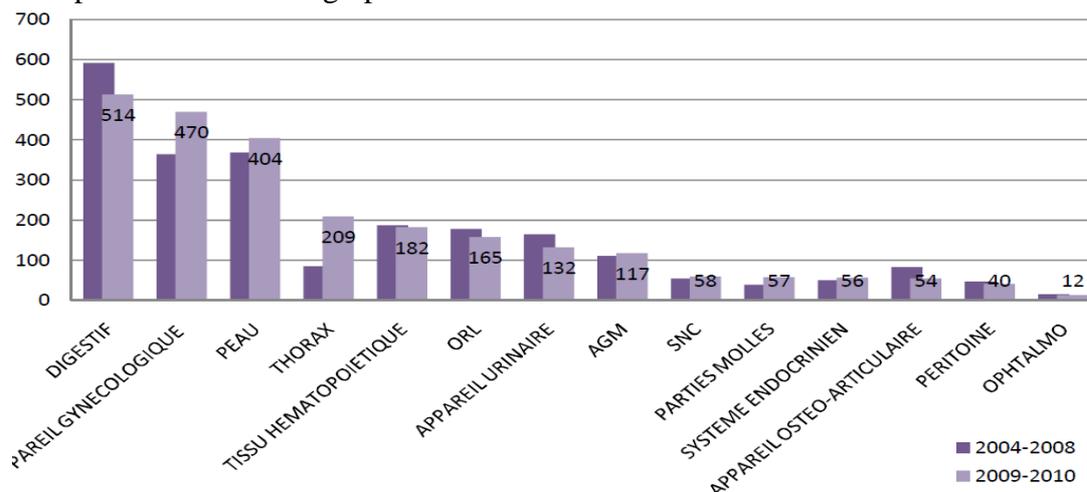


Figure 33 : Répartition de l'ensemble des cancers selon le siège et l'année

Le graphe montre une répartition différente de l'ensemble des cancers étudiés, selon l'année et la localisation. Les cancers de l'appareil digestif, représentant 20,88% de l'ensemble des cas, occupent le premier rang, suivis des cancers de l'appareil gynécologique

qui représentent 19,09% des cas. Au quatrième rang, sont classés les cancers thoraciques qui représentent 8,49% de l'ensemble des cas. Par ailleurs, même si les cancers cutanés sont surpassés par les cancers gynécologiques, leur fréquence reste en évolution.

L'étude au niveau du CHU, révèle la présence d'une légère prédominance masculine avec 52,56 % des hommes et 47,44 % des femmes (figure 34).

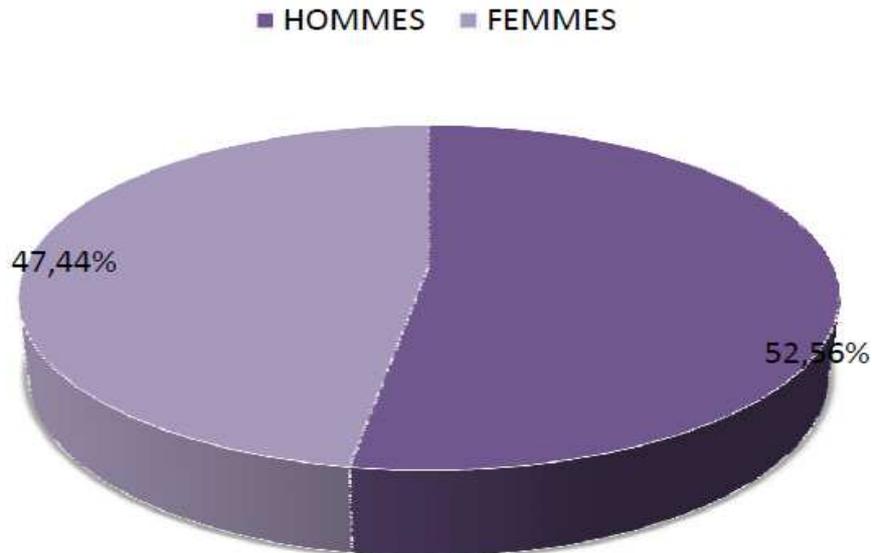


Figure 34 : répartition de cancer selon le sexe.

La moyenne d'âge des patients porteurs des cancers, est d'environ 60 ans avec des extrêmes d'âge de 31 et de 70 ans.

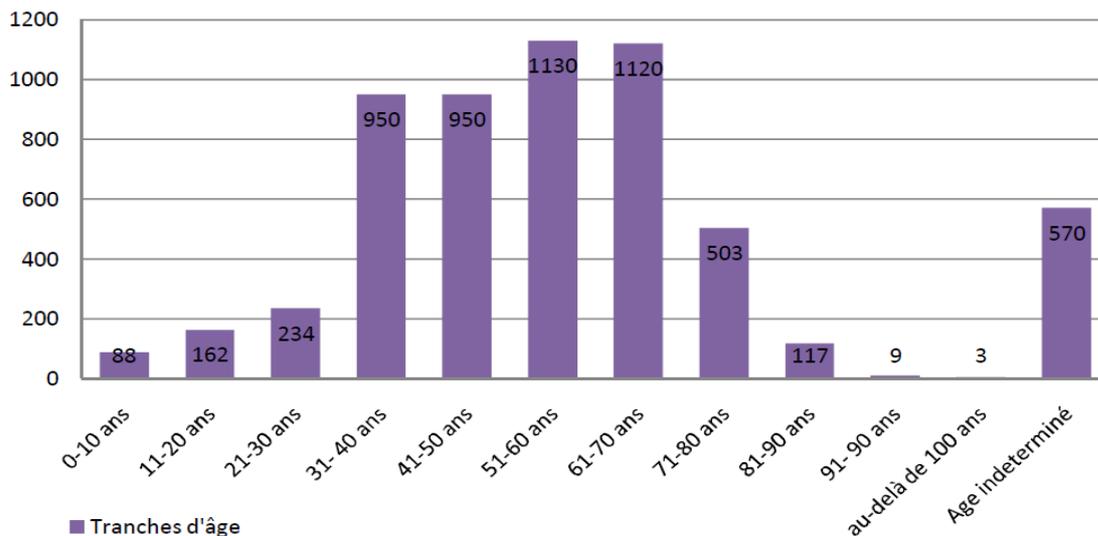


Figure 35 : répartition de cancer selon les tranches d'âge

Par ailleurs, en corrélant l'âge avec le sexe, la plupart des tranches d'âge examinées présente une prédominance masculine. Cependant, chez les patients âgés entre 31 et 50 ans, le nombre de cas est plus élevé chez les femmes que chez les hommes. Il est important de signaler que plus de 50% des malades recensés ont moins de 50 ans. Ceci peut être expliqué par la population jeune de la ville de Fès.

Enfin, la répartition des tumeurs selon le type histologique donne le résultat suivant :

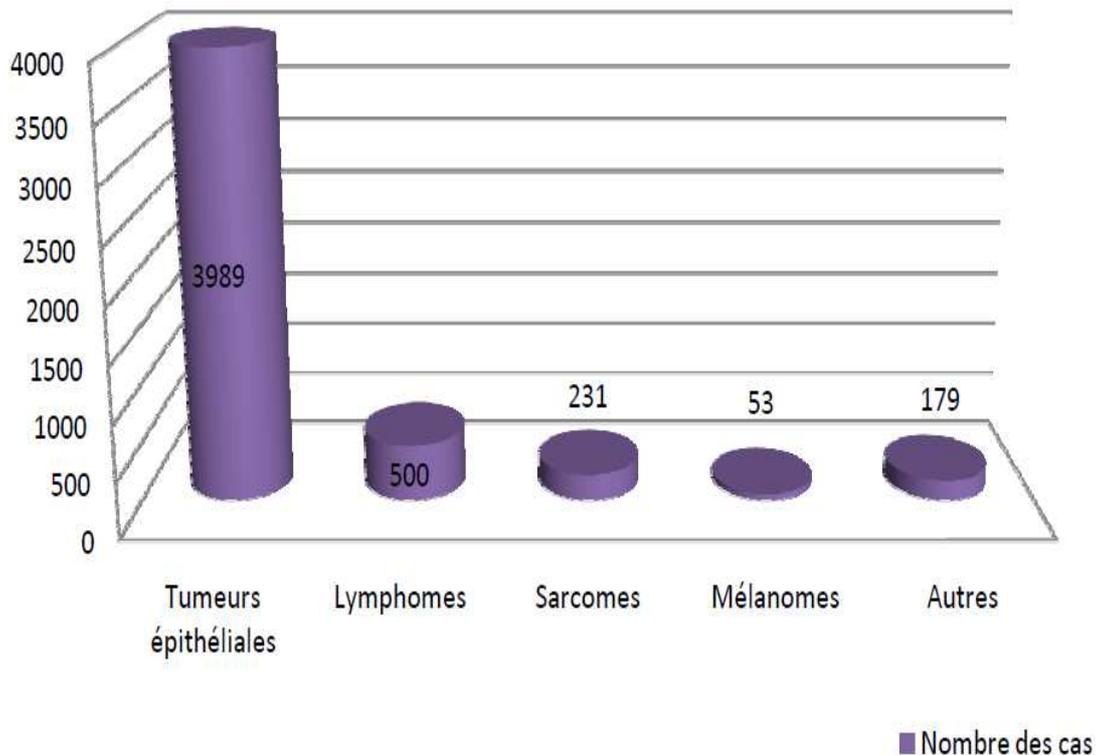


Figure 36 : Répartition des tumeurs selon le type histologique

Les tumeurs épithéliales représentent le type histologique le plus fréquent avec une incidence de 80,55% de l'ensemble des cas étudiés, suivies des lymphomes avec un pourcentage beaucoup plus faible (10,09% des cas). Les sarcomes, occupent le troisième rang (4,66% des cas) suivis des mélanomes (1,07%) et des autres types histologiques qui restent relativement rares (3,61% de l'ensemble des cas).

4. Cancer du colon :

Le cancer du colon occupe le troisième rang des cancers en termes de fréquence. Il représente le troisième cancer masculin (8%), et le quatrième chez la femme (7,79%). Ce cancer est classé le premier cancer digestif (38,82%) et il est plus fréquent chez l'homme que chez la femme.

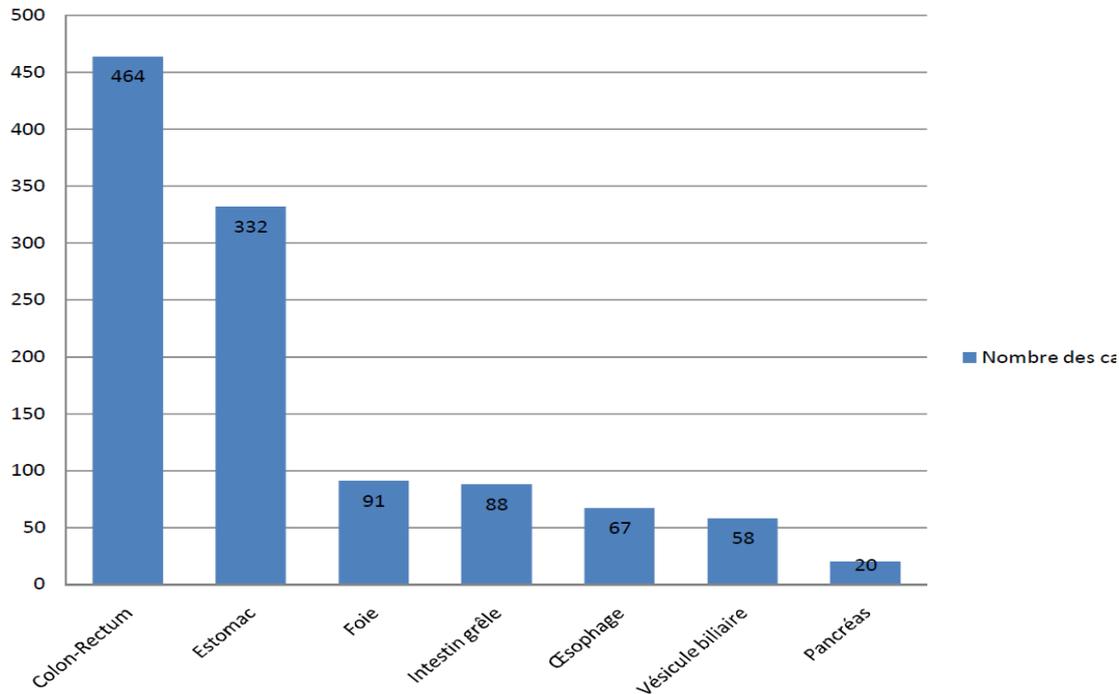


Figure 37: Répartition de l'ensemble des cancers digestifs selon le siège

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.

a) Répartition du cancer colorectal en fonction de l'âge

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.

b) Répartition du cancer colorectal en fonction du sexe

Pour la répartition de cette tumeur en fonction du sexe, notre étude montre une légère prédominance masculine avec 53,33% des hommes et 46,67% de femmes.

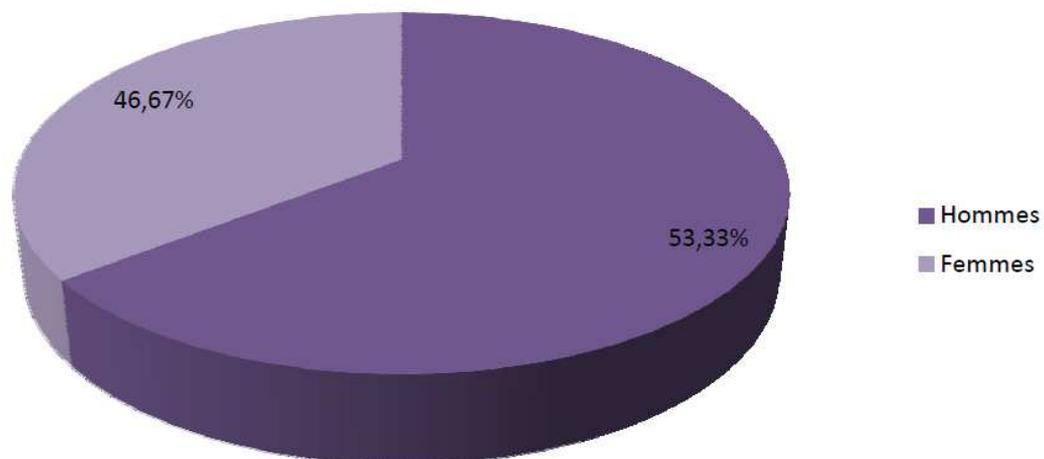


Figure 38 : répartition du cancer du colon selon le sexe.

e) Répartition du cancer colorectal selon le milieu de résidence

L'étude montre une légère différence d'incidence entre le milieu urbain (57 %) et le milieu rural (43%).

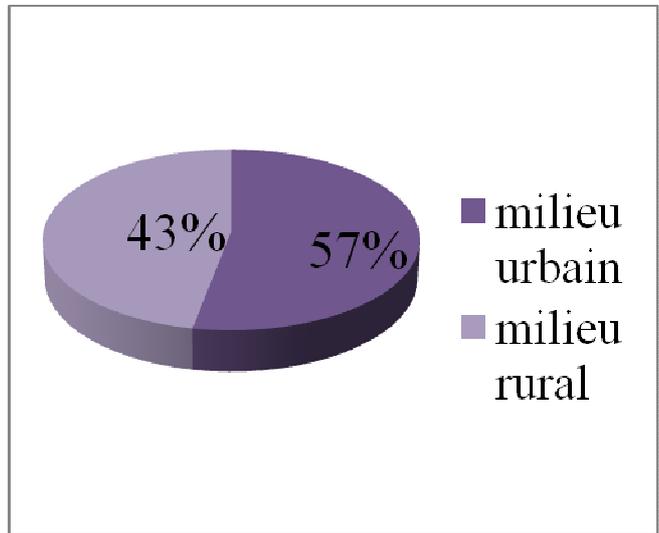


Figure 39 : répartition du cancer du colon selon de résidence.

La localisation de la tumeur colorectale a été déterminée pour 8 patients (figure 40).

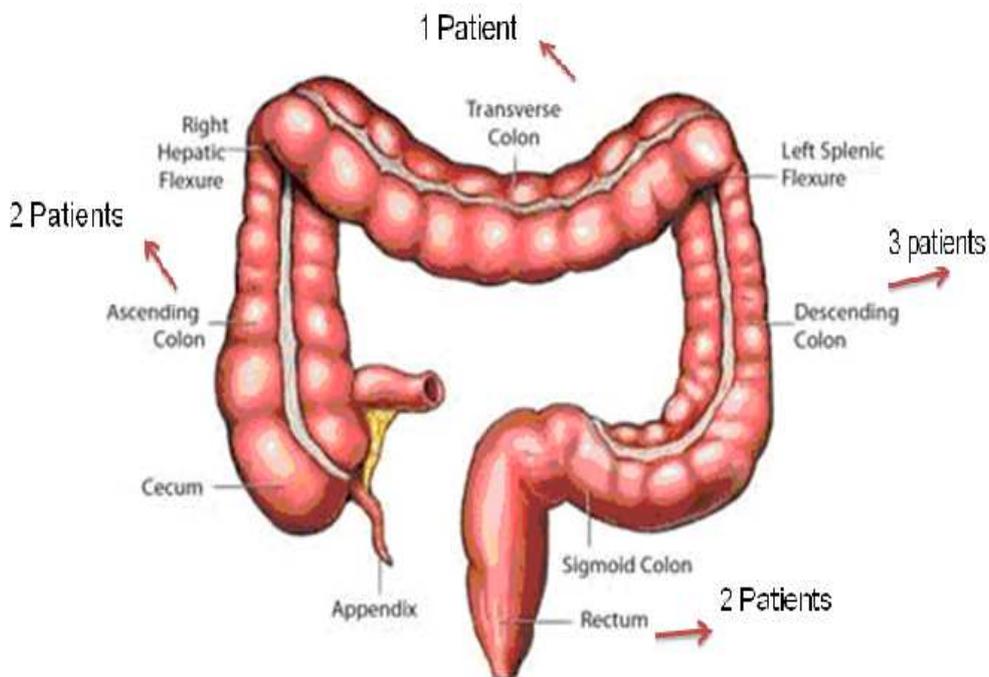


Figure 40 : localisation de la tumeur dans le colon

Donc il s'agit d'un pourcentage de 75% de cancer colorectal au niveau du colon et de 25% au niveau du rectum.

5. Mélanome :

Les cancers cutanés, qui incluent le mélanome, représentent le deuxième cancer le plus fréquent après les cancers digestifs. Ils sont presque 2 fois plus fréquents chez l'homme (62%) que chez la femme (38%), avec un sexe ratio H/F de 1,65.

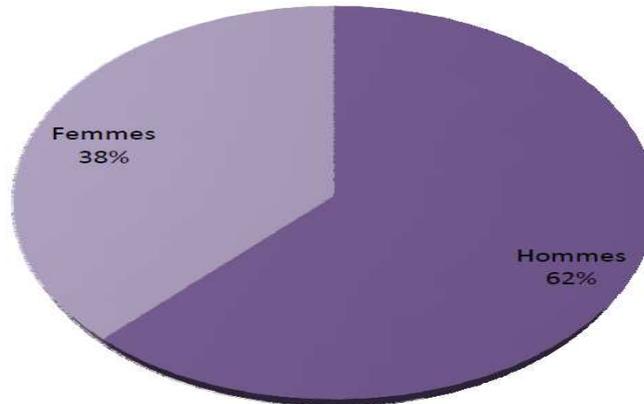


Figure41 : répartition des cancers cutanés selon le sexe.

Le mélanome occupe le troisième rang parmi les cancers cutanés.

Pour notre étude, représentée par 38 cas colligés durant les 4 dernières années au sein du CHU, le mélanome représente 3,89% de l'ensemble des cancers cutanés.

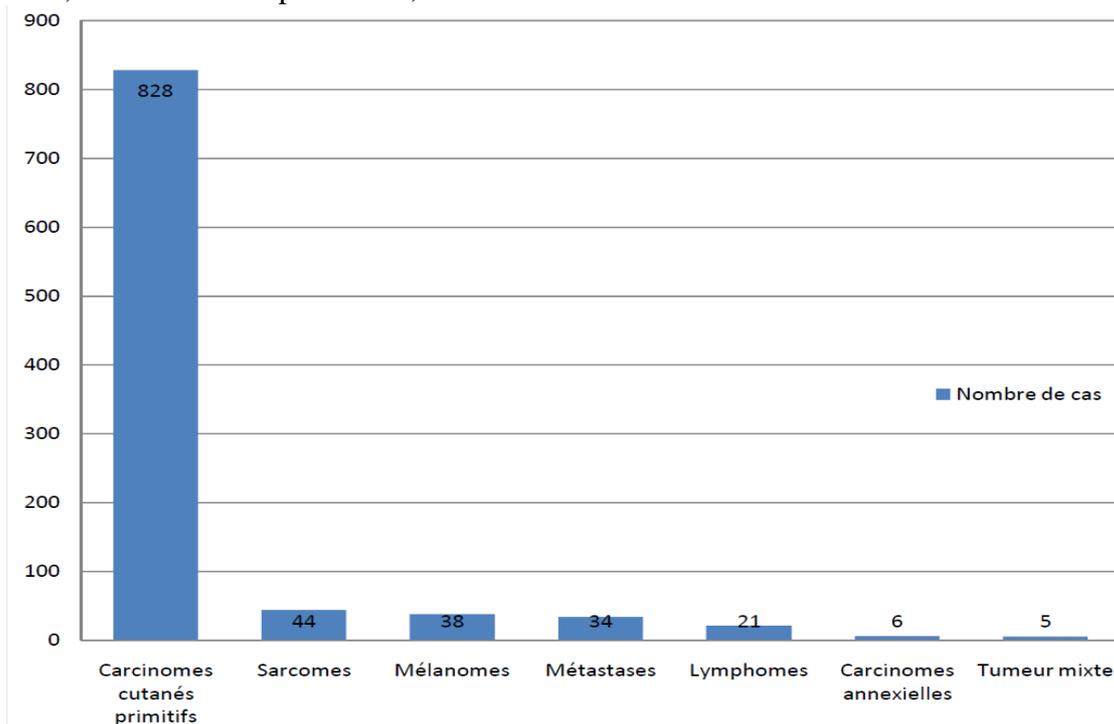


Figure 42 : Répartition des cancers de la peau selon le type histologique

Aucune prédominance de l'un ou l'autre des deux sexes n'a été notée. L'âge moyen de survenue est de 56,3 ans. Aucun cas de mélanome n'a été enregistré chez l'enfant, l'âge le plus jeune étant de 18 ans. 75% des cas ont un âge entre 47 et 70,5 ans.

6. Gliomes :

L'étude statistique faite sur 129 cas de tumeurs malignes du système nerveux central montre que la localisation hémisphérique était la plus fréquente (68,22%), suivie par la fosse cérébrale postérieure (24,80%) et enfin la moelle épinière (6,98%).

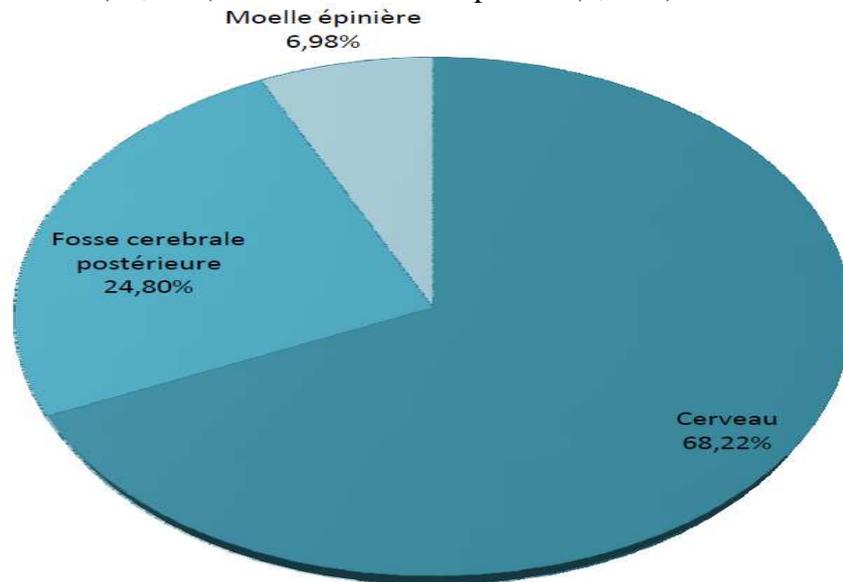


Figure 43: Répartition des cancers du système nerveux central par siège

a. Répartition des cancers du SNC en fonction du sexe

La fréquence des tumeurs du système nerveux central est presque similaire chez les hommes (67 cas = 51,94%) et chez les femmes (62 cas = 48,06%), avec un sexe ratio de 1,08.

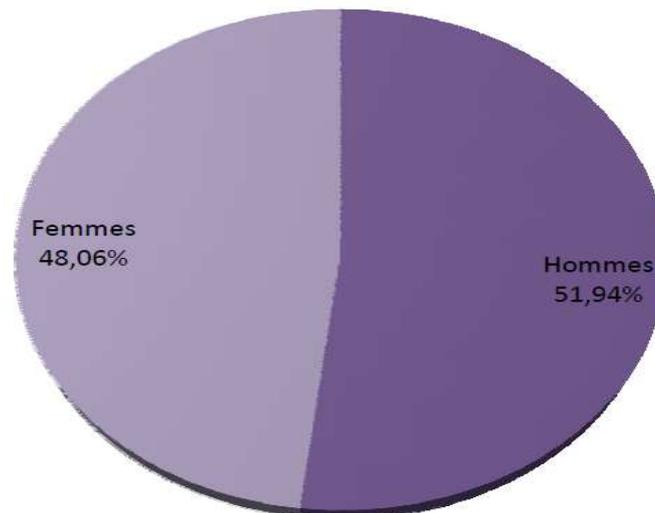


Figure 44 : répartition des tumeurs du SNC selon le sexe

b. Répartition des cancers du SNC en fonction de l'âge



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

25% des malades ont moins de 43,5 ans et 75% ont un âge entre 43,5 et 61 ans. Les extrêmes d'âge vont de un an à 91 ans. Le pic de fréquence, 49% des cas environ, a été enregistré entre 50 et 60 ans.

Dans notre série d'étude, les tumeurs malignes du système nerveux central touchent 4 fois plus l'adulte que l'enfant. De plus, l'âge est significativement lié au type histologique.

Les tumeurs astrocytaires constituent le type histologique le plus fréquent dans la série, elles représentent 47,52% de l'ensemble des tumeurs malignes primitives du système nerveux central.

Les tumeurs épendymaires, à savoir le médulloblastome, occupent le deuxième rang des tumeurs primitives malignes du système nerveux central et représentent 25,74%. Les tumeurs oligodendrogiales et oligo-astrocytaires sont moins fréquentes et représentent 16,83% de ces tumeurs.

Les métastases représentent le deuxième type histologique le plus fréquent et sont rencontrées dans 21,71% des cas.

Aucune relation significative entre le type histologique et le sexe n'a été trouvée dans cette série.

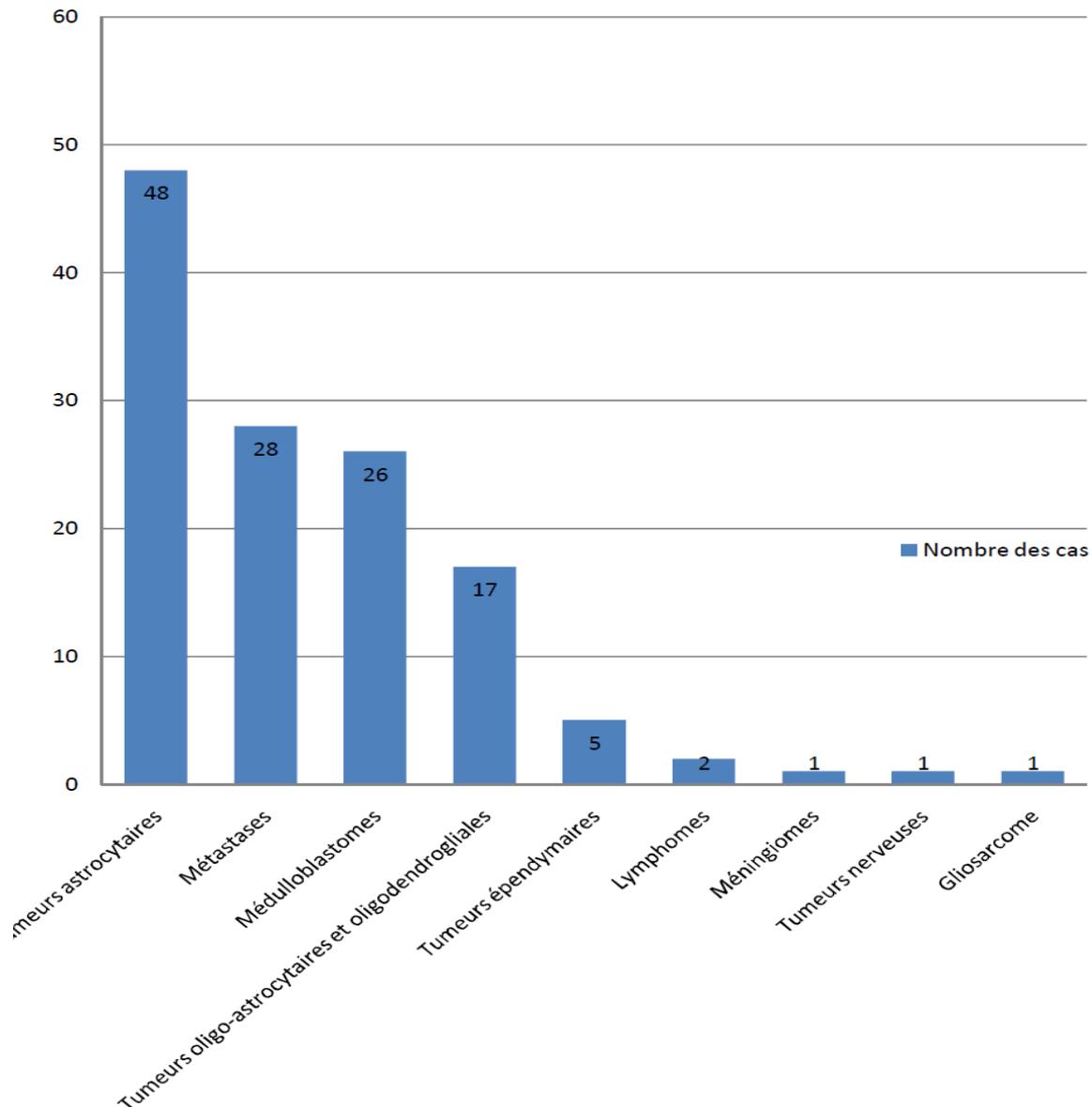


Figure 45: répartition des cas selon le type histologique

II. Etude histologique :

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

3. Cancer du colon :

A partir des résultats obtenus, 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'envahissement locorégional, que de la dissémination métastatique. 4 types de tumeurs sont définis:

- A) Tumeurs bien différenciées: prolifération tumorale disposée en tubes bien différencié avec mucosécrétion abondante
- B) Tumeurs moyennement différenciées : présence d'amas cribriforme avec cellules tumorales pluristratifiée et basophilie et diminution de la mucosécrétion
- C) Tumeurs peu ou indifférenciées : la prolifération tumorale disposée en nappe diffuse avec des cellules atypiques
- D) Adénocarcinome colloïde ou mucineux. : présence de cellules en bague à chaton avec un cytoplasme clair abondant et un noyau excentré

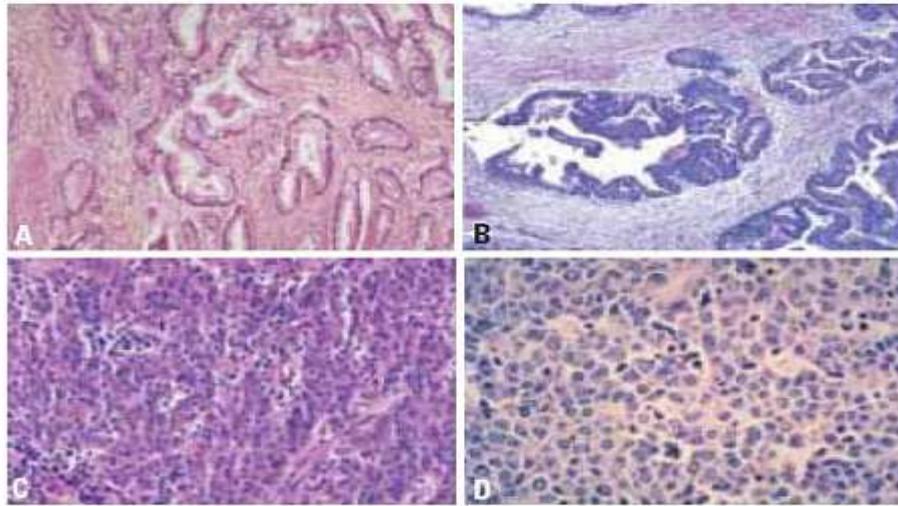


Figure 46 : adénocarcinomes colorectaux à leurs différents stades de différenciation

Enfin, le stade de la tumeur colorectale est déterminé par le pathologiste par microscopie, pour le bon choix de traitement ainsi que pour l'étude moléculaire.

4. Mélanome :

Dans notre série, tous les échantillons sont des mélanomes cutanés acraux ou acro-longitudinaux qui se caractérisent par des proliférations cellulaires d'architecture différente. La plupart des cas ont un cytoplasme qui renferme parfois une pigmentation mélanique:

1. 60% des cas présentent une prolifération nodulaire ave des cellules de grande taille, au cytoplasme large éosinophile et au noyau de grande taille avec une chromatine granuleuse présentant des figures de mitoses.
2. 20% présentent une prolifération en nappe de cellules et de thèques. Les cellules nucléées montrent la présence des atypies cyto-nucléaires.
3. 20% présentent une infiltration tumorale maligne horizontale ou verticale d'architecture lentiginéuse.

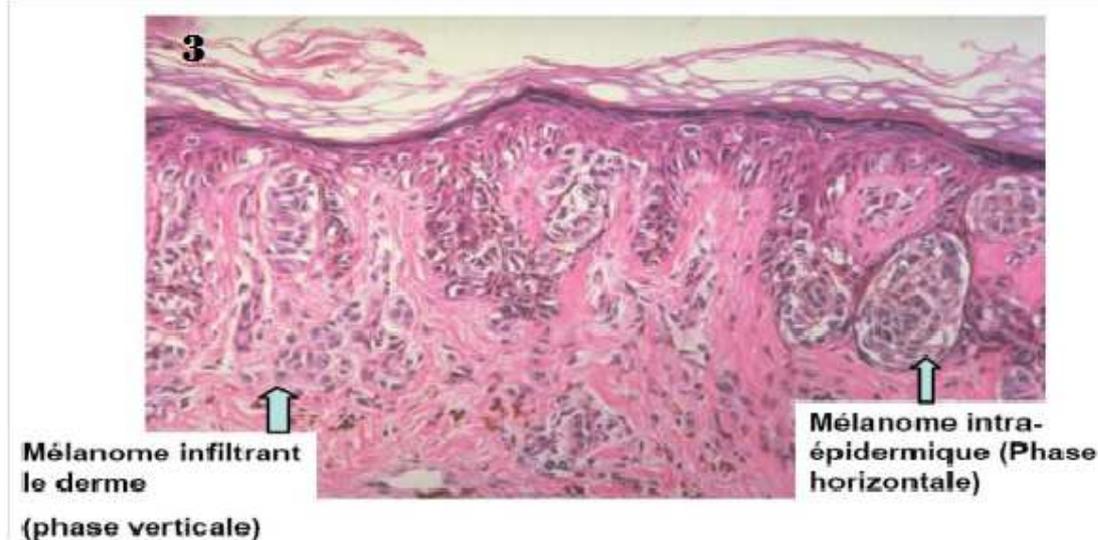
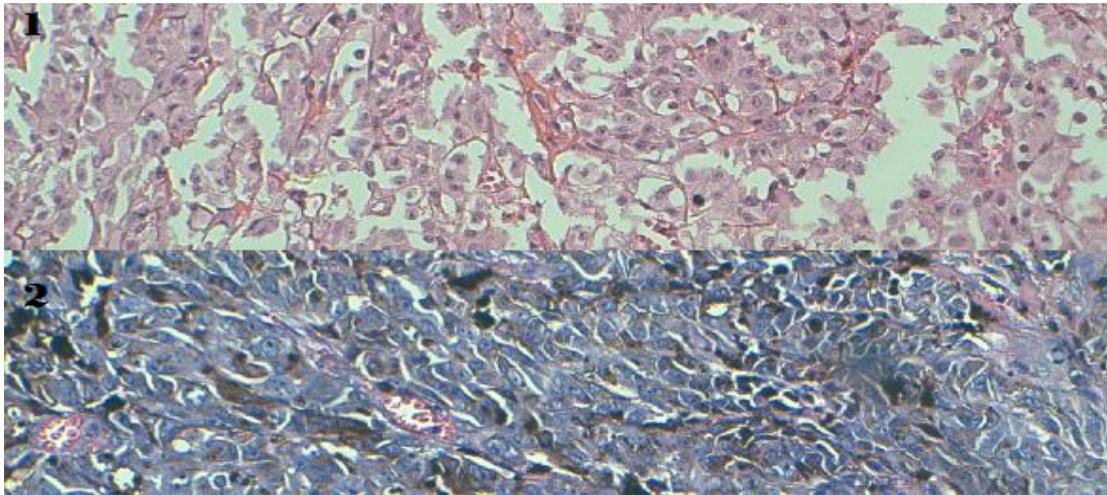


Figure47 : les trois aspects des tissus du mélanome retrouvés

Une étude immunohistochimique est indispensable pour déterminer le stade du cancer.

III. Etude immunohistochimique :

L'étude immunohistochimique a été réalisée seulement pour les tumeurs du mélanome pour confirmer la présence de ce cancer. Pour cela, les antigènes exprimés par les cellules du mélanome sont identifiés en utilisant deux anticorps spécifiques : anti PS100 et anti mélanA. Les résultats sont présentés dans le tableau suivant :

<i>Anticorps utilisé</i>	<i>Nombre des cas positifs</i>	<i>Nombre des cas négatifs</i>
Anti PS100	14	3
Anti melan A	16	0

Sur un total de 17 patients, 14 ont donné une réaction immunologique positive avec l'anticorps anti PS100. Avec l'anticorps anti melan A, tous les patients testés ont réagi positivement.

L'aspect des tumeurs présentant une expression de l'anticorps anti PS100 et anti melan A sont les suivants :

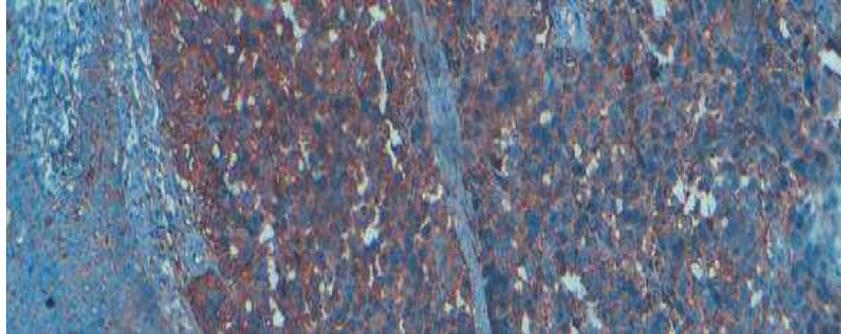


Figure48 : Immunomarquage des cellules tumorales par la PS 100.

IV. Etude moléculaire :

L'étude moléculaire a été réalisée sur une série de 60 patients dont 34 présentent le cancer de colon, 16 présentent le mélanome et 10 présentent l'astrocytome pilocytique. L'étude moléculaire consiste en une amplification du gène B-raf et du gène K-ras pour le cancer colorectal, et du gène B-raf pour le mélanome et l'astrocytome pilocytique.

Le dosage d'ADN par mesure de la densité optique, montre une concentration d'ADN plus élevée dans les tumeurs du colon par rapport aux tumeurs du mélanome et cérébrale.

La concentration d'ADN extrait à partir des tumeurs du colon est de 760ng/μl. Celle de l'ADN extrait à partir du mélanome est 400 ng/μl, alors que la concentration d'ADN extrait à partir des astrocytomes est de 200 ng/μl.

- **Cancer du colon :**

2.3. Résultat de PCR :

- Résultat de PCR du gène BRAF exon 15 :

La série des 34 patients présentant le cancer de colon a fait l'objet d'une analyse moléculaire visant à amplifier le gène B- Raf par PCR, et ensuite de le séquencer dans le but de rechercher la présence ou non de la mutation ponctuelle du gène BRAF dans l'exon 15.

20 patients parmi les 34, ont donné une bonne amplification de l'exon 15. Cet exon comprend le codon 600 du gène BRAF, où se produit fréquemment la mutation recherchée.

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 profils électrophorétiques des produits d'amplification par PCR du gène B- Raf des différents patients montrent l'apparition d'une bande de taille approximativement 145pb. Ils sont présentés dans la figure ci- dessous :

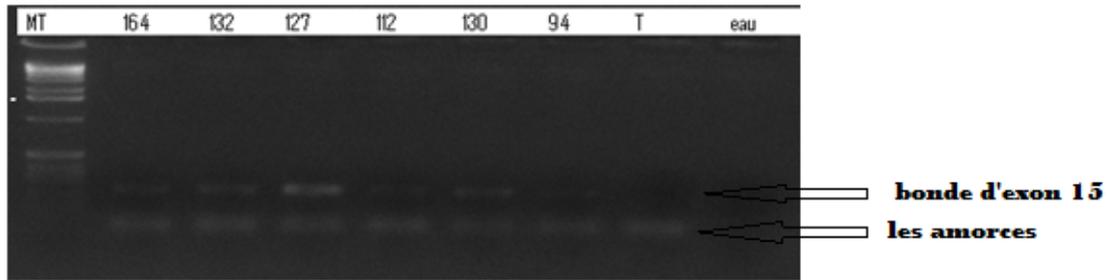


Figure 49: Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène BRAF exon 15. Sa taille est approximativement 147 pb. MT : marqueur de taille ; 1Kb. T: témoin négatif. Eau: eau pure en migration.

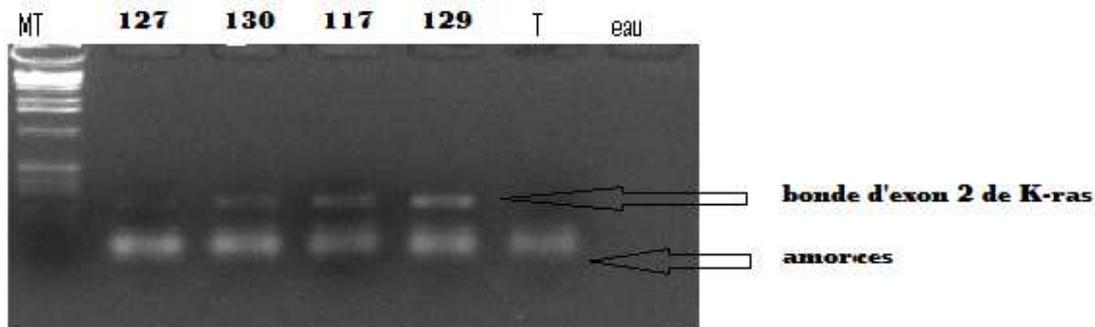
Le résultat d'amplification par PCR du gène B- Raf exon 15, montre pour tous les patients une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 15 du gène B- Raf d'une taille approximative de 147pb.

- Résultat de PCR du gène K-ras exon 2:

Dans le but de révéler la présence ou non de la mutation dans l'exon 2 du gène k-ras, 14 échantillons de cancer de colon ont été étudiés.

Les produits d'amplification de 10 échantillons parmi les 14, ont donné un bon résultat et 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 profils électrophorétiques des produits d'amplification par PCR du gène K-Ras exon 2, des différents patients sont présentés dans la figure ci-dessous :



Figure

50 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène K-ras, exon 2, la taille est 260 pb. bMT : marqueur de taille ; 1Kb. T: témoin négatif. Eau: eau pure en migration.

Le résultat d'amplification par PCR du gène K- Ras exon 2, montre pour tous les patients une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 2 du gène K- Ras d'une taille approximative de 260 pb.

2.4. Séquençage :

Pour le gène B-raf, le séquençage a été réalisé pour 16 patients, mais il n'a été réussi que pour 6 échantillons.

L'alignement entre la séquence étudiée et celle disponible dans la banque de données montre qu'il n'y a aucune mutation sur l'exon étudié. La séquence établie ne contient pas la substitution T en A qui aboutit à une mutation V600E.

Les patients étudiés ont donc le gène B- Raf sauvage.

Un exemple de séquence de l'un des échantillons analysés, est présenté dans la figure suivante:

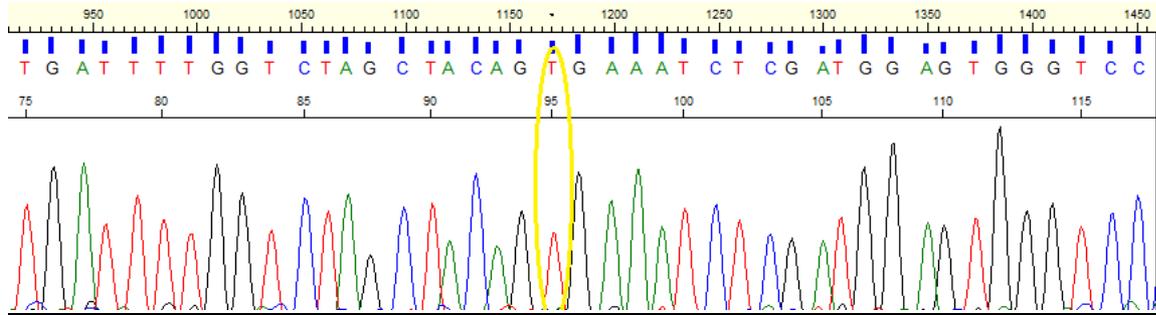


Figure 51 : profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du colon qui ne présente pas de mutation T en A.

Pour le séquençage des produits PCR de l'exon 2 du gène K-ras, l'alignement des séquences n'a pas pu être réalisé à cause de la mauvaise qualité des pics obtenus.

3. Mélanome :

3.1. Résultat de PCR d'exon 15 du B-raf:

Dans le but de rechercher la mutation ponctuelle du gène BRAF dans l'exon 15, l'ADN de 16 patients présentant un mélanome a été amplifié.

Une bonne amplification a été obtenue pour 11 échantillons.

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification par PCR du gène B- Raf exon 15, des différents patients sont présentés dans la figure ci-dessous :

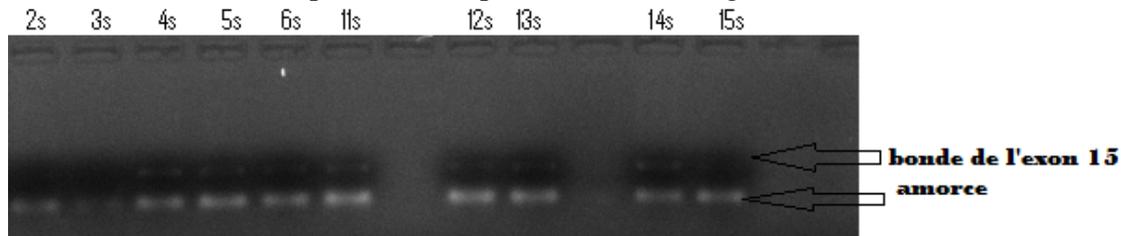


Figure 52 : profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR du gène B-raf, exon 15, (taille est 147 pb), des échantillons du mélanome.

Le résultat d'amplification par PCR du gène B- Raf exon 15, montre pour tous les patients une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 15 du gène B- Raf d'une taille approximative de 147 pb.

3.2. Résultat de séquençage :

Parmi les 11 cas séquencés, 5 seulement ont été analysables.

L'alignement entre la séquence étudiée et celle disponible dans la banque de données montre la présence de mutation V600E au niveau de 3 séquences. La mutation n'a pas été mise en évidence au niveau des autres échantillons.

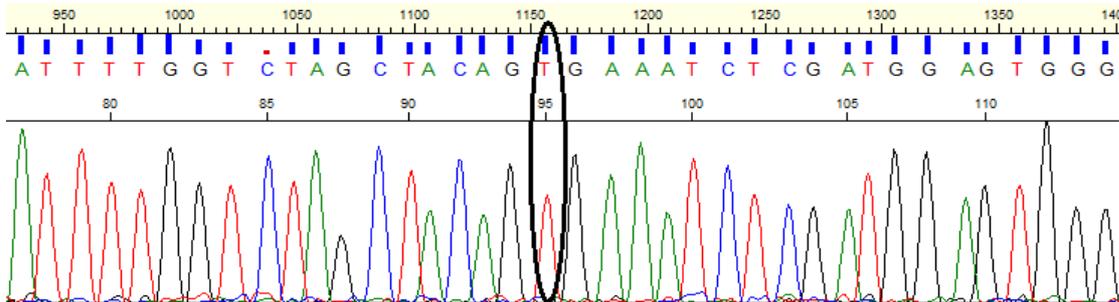


Figure 53 : profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui ne présente pas de mutation T en A.

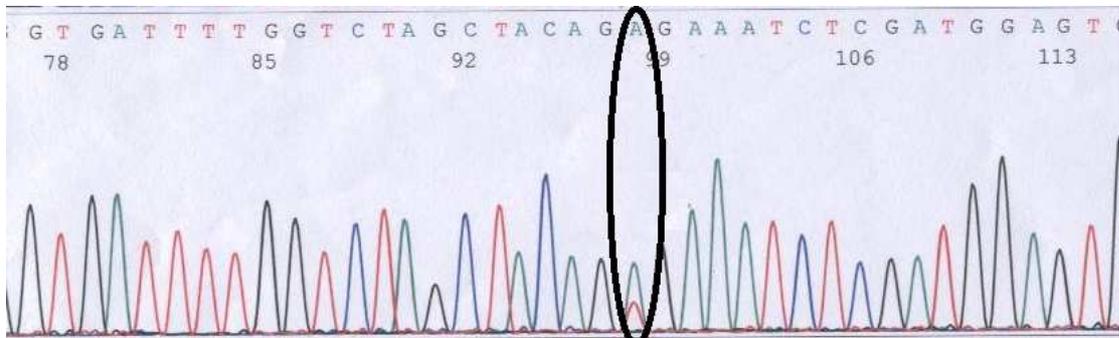


Figure 54: profil d'une séquence F de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui présente la mutation T en A.

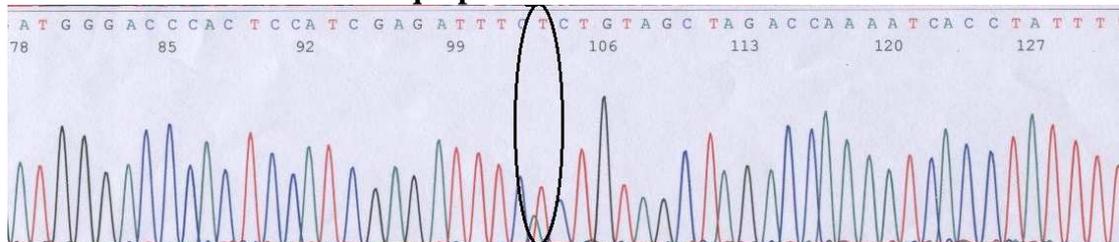


Figure 55 : profil d'une séquence R de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon du mélanome qui présente la mutation T en A.

Pour confirmer l'utilité de la technique PCR allèle spécifique dans la détection des mutations, 11 cas de mélanome ont été testés.

Cette technique a permis de confirmer les résultats de séquençage par l'apparition de 3 bandes qui correspondent à l'exon 15 du gène B-raf de taille approximativement 120pb pour 3 échantillons. Ces bandes témoignent de la présence de mutation dans l'ADN de ces tumeurs.

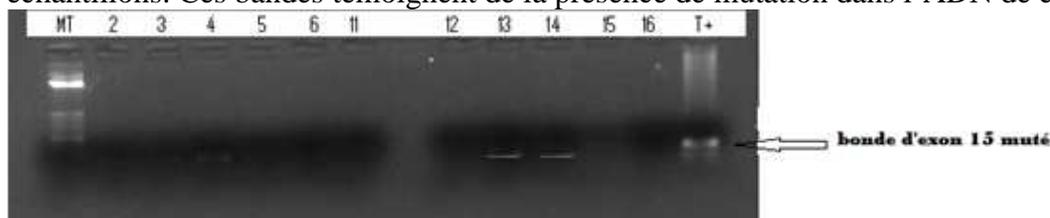


Figure 56 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits PCR allèle spécifique du gène

B-raf, exon 15 des échantillons du mélanome. Taille est environ 120 pb MT : marqueur de taille ; 1Kb. T: témoin positif. L'échantillon 4, 13, 14 contiennent la mutation.

4. Astrocytome pylocitique :

4.1. Résultat de PCR

L'ADN de 10 patients présentant des astrocytomes pylocitiques a été amplifié puis séquencé pour révéler la présence ou non de mutation V600E.

Les profils électrophorétiques des produits d'amplification par PCR du gène B- Raf exon 15, des différents patients sont présentés dans la figure ci- dessous :

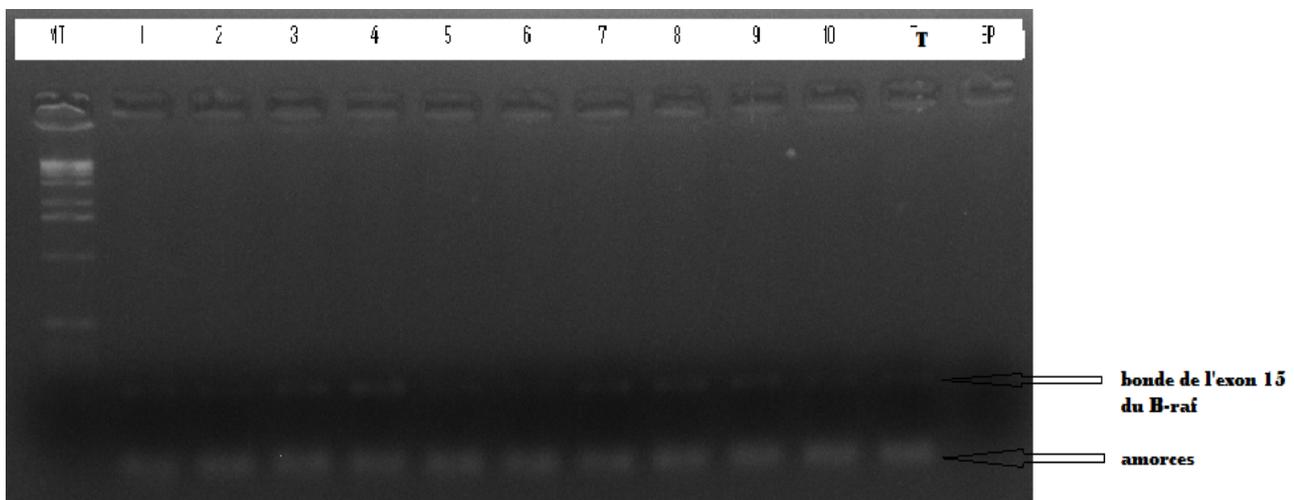


Figure 57: profil d'électrophorèse sur gel d'agarose à 2% des produits de PCR du gène B-raf, exon 15 (taille est 147 pb) des échantillons des astrocytomes pylocitiques. MT : marqueur de taille de 1 Kb. T : témoin négatif.

Le résultat d'amplification par PCR du gène B- Raf exon 15, montre pour tous les patients, une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 15 du gène B- Raf d'une taille approximative de 147 pb.

3-2 Résultat de séquençage :

L'alignement entre la séquence étudiée et celle disponible dans la banque de données montre qu'il n'y a aucune mutation sur l'exon étudié. La séquence établie ne contient pas la substitution T en A qui aboutit à une mutation V600E

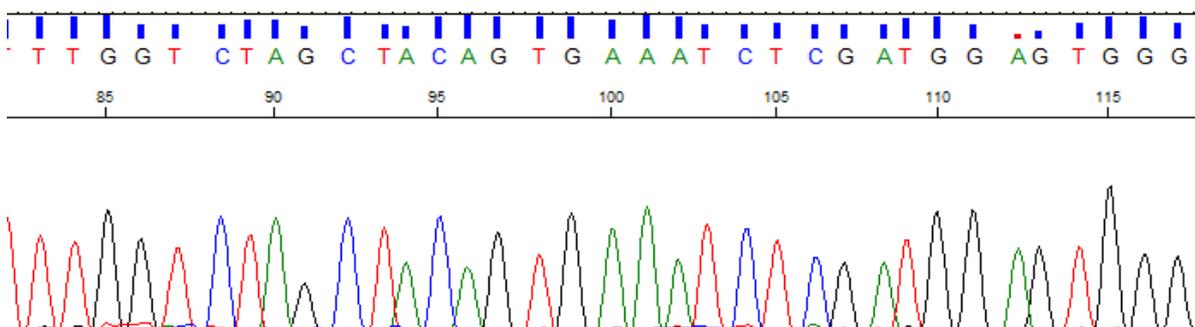


Figure 58 : profil d'une séquence de l'exon 15 du B-raf d'un échantillon des astrocytomes pylocitiques.



❖ Alignement des séquences de B-raf :

Pour l'ensemble des cas du cancer analysés et qui ne présentent pas de mutation 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.

B-raf :

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

Query 1

ACAACACTGTTCAAACACTGATGGGACCCACTCCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGACCAAAT
60

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ACAACACTGTTCAAACACTGATGGGACCCACTCCATCGAGATTTCACTGTAGCTAGACCAAAT
1048777

Query 61

CACCTATTTTTACTGTGAGGTCTTCATGAAGAAATATATCTGAGGTGTAGTAAGTAAAGG
120

||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CACCTATTTTTACTGTGAGGTCTTCATGAAGAAATATATCTGAGGTGTAGTAAGTAAAGG
1048837

Query 121 AAAACAGTAGATCTCATTTCCTATCA 147

||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 1048838 AAAACAGTAGATCTCATTTCCTATCA 1048864

Figure 59 : Alignement entre le segment du gène BRAF amplifié par l'amorce BRAF-15R et le segment de référence dans les bases de données.



Discussion des résultats

I. Etude statistique :

La comparaison des résultats obtenus à partir des études rétrospectives réalisées au CHU de Fès avec les autres registres nationaux, maghrébins et internationaux montre certaines divergences. Les résultats des valeurs statistiques obtenus sont nettement inférieurs



aux données occidentales, proches des données arabes et maghrébines et supérieurs aux données africaines.

Cette différence des résultats statistiques ne peut s'expliquer que par la taille de notre échantillon qui n'est pas représentative. Des résultats plus concluants pourraient être obtenus après utilisation d'un échantillon plus large.

- **Cancer du Colon**

Les études réalisées sur le cancer de colon montrent que les hommes sont plus susceptibles de développer le cancer colorectal que les femmes. Ces résultats sont différents de ceux obtenus en Tunisie, car selon le registre du sud de la Tunisie, les cancers colorectaux sont plus fréquents chez la femme⁴¹.

Cependant, nos résultats sont proches de ceux des pays à taux élevé d'incidence⁴⁰ ainsi que des statistiques réalisées par les centres d'oncologie de Rabat et de Casablanca⁴².

Des études statistiques similaires ont été réalisées en France et montrent que le pourcentage de cancers digestifs chez l'homme (53,8 %) est plus faible que celui chez la femme (68,5 %), avec un taux d'incidence voisin dans les deux sexes jusqu'à l'âge de 50 ans. Les taux bruts d'incidence augmentent régulièrement après 50 ans, plus rapidement chez les hommes que chez les femmes⁴⁰.

Cette différence d'incidence entre les deux sexes pourrait être due à certains facteurs tels que par exemple, les variations hormonales présentes entre les deux sexes, l'activité physique, les habitudes alimentaires, etc.....

La légère différence d'incidence selon le milieu de résidence suggère le rôle des facteurs environnementaux, surtout alimentaires.

- **Mélanomes :**

Les études réalisées sur le mélanome montrent que ce type de cancer occupe le 3^{ème} rang parmi l'ensemble des cancers cutanés. Ce dernier est prédominant chez les hommes que chez les femmes.

Les études statistiques réalisées sur le mélanome au sein du CHU montrent que les gens dont la couleur de la peau est blanche sont plus susceptibles de développer un mélanome. Ce résultat est conforme à la totalité des statistiques réalisées dans le monde et peut être expliqué par la sensibilité élevée des peaux blanches aux rayons ultraviolets.

L'étude ne montre aucune prédominance de l'un ou l'autre des 2 sexes.

En France, en 2000, le nombre estimé de nouveaux cas de mélanomes cutanés était de 7231, avec 58% de femmes et 42% d'hommes. La même situation a été signalée dans le Queensland, et l'Australie⁴³.

L'âge médian de survenue de mélanome dans la série du CHU est de 53.6 ans. Ce résultat n'est pas compatible avec celui retrouvé dans certains pays comme les Etats Unis où l'âge moyen varie de 52 ans à 63 ans selon les races⁴⁴.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

Ces données montrent que la survenue du mélanome reste rare dans notre série d'étude du CHU par rapport aux données occidentales.

Des études épidémiologiques ont confirmé l'hypothèse que la majorité des cas de mélanome sont dues, au moins en partie, à une exposition excessive aux rayons du soleil. Contrairement à un carcinome épidermoïde, le risque de mélanome ne semble pas être associé à l'exposition cumulative, mais intermittente à la lumière du soleil. Par conséquent des campagnes de prévention et de détection précoce sont nécessaires⁴⁵.

- **Gliomes :**

L'étude rétrospective réalisée sur 129 cas de tumeurs de système nerveux central montre que la localisation hémisphérique était la plus fréquente suivie par les tumeurs de la fosse cérébrale postérieure et enfin la moelle épinière, avec une fréquence presque similaire chez les hommes et les femmes.

Les tumeurs des astrocytomes constituent le type histologique le plus fréquent dans notre série. Aucune relation significative entre le type histologique et le sexe n'a été trouvée dans cette série.

Le glioblastome représente la tumeur maligne primitive la plus fréquente dans la littérature. Aux états unis, il représente entre 17 et 27,7% de l'ensemble des tumeurs primitives du système nerveux central.

En Europe, il constitue 25% de l'ensemble des tumeurs malignes du système nerveux central^{46, 47}.

Selon la littérature, environ 60% des patients ont un âge entre 55 et 74 ans. Dans notre série, 44% des patients ont entre 50 et 70 ans.

Ce cancer est plus fréquent chez les hommes (1,5 fois) que chez les femmes, mais dans notre série, une nette prédominance féminine, représentant 41,94% de l'ensemble des cas⁴⁷ a été notée.

Ces données occidentales montrent une grande divergence avec les résultats de notre série du CHU. Ceci peut être dû au faible effectif des patients sur lequel l'étude a été réalisée. Un nombre plus important de malades pourrait donner des résultats plus exacts.

Cependant, ces données sont un peu proches des données nationales fournies par les registres du cancer de Rabat et du Grand Casablanca. En effet, à Casablanca, 76 cas ont été enregistrés en 2004, représentant 2,27% de l'ensemble des cancers, 55,26% étaient des hommes et 44,74% étaient des femmes.

Le registre de la ville de Rabat, quant à lui, a objectivé, en 2005, 19 nouveaux cas, (52,63% de sexe masculin), représentant respectivement 2,60% et 2,37% de l'ensemble des cancers masculins et féminins⁴².

Ces différences sont dues à plusieurs facteurs. L'exposition à de fortes doses de radiations ionisantes est le facteur le plus important. De façon générale, l'incidence des tumeurs augmente avec l'âge. Elles sont également un peu plus fréquemment observées chez les sujets d'origine caucasienne par rapport aux sujets afro-américains aux États-Unis.



II. Etude histologique :

- Cancer du colon

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

Nos résultats révèlent que les adénocarcinomes représentent 94% des cancers colorectaux. Ils démontrent un aspect de glande (tubes glandulaires) ou la présence de sécrétions mucineuses (muco-sécrétions). Ces résultats coïncident avec ceux cités dans la littérature et qui permettent de confirmer la malignité de la tumeur colorectale.

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

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

- Mélanome :

L'histologie affirme la nature mélanocytaire ainsi que la malignité d'une lésion cutanée pigmentée.

En se basant sur les critères qui permettent de confirmer l'état de la tumeur, l'étude histologique réalisée sur notre série, a révélé que nos échantillons sont des mélanomes cutanés acraux ou acro-longitudinaux se caractérisant par des proliférations d'architecture différente. La plupart des cas ont un cytoplasme qui renferme parfois une pigmentation mélanique.

III. Etude histo chimique :

L'étude histo chimique réalisée sur les échantillons du mélanome a confirmé que les cas analysés en examen histologique sont de vrais mélanomes de type malin. Le résultat a été confirmé en utilisant des anticorps qui révèlent l'expression des antigènes spécifiques.

Les anticorps utilisés ne sont pas tous spécifiques; seul l'anti-Melan A, s'il donne un marquage positif, permet de confirmer que la tumeur examinée est maligne et est de type mélanome. Cet anticorps qui est monoclonal marque 80 à 90 % des mélanomes. Son



marquage est cytoplasmique et souvent très homogène. Il est responsable de la coloration bleue qui apparaît dans les lames au cours de leur observation.

Il existe un autre anticorps très spécifique appelé HMB45, mais qui n'a pas été utilisé pour notre étude. Par contre, l'anti PS100 qui est le plus sensible des marqueurs cytoplasmique et nucléaire est non spécifique des tumeurs mélanocytaires. Il ne permet pas la distinction entre tumeurs bénignes et malignes. Il est utilisé juste pour voir le taux d'expression de l'antigène ciblé.

IV. Etude moléculaire :

Le dosage d'ADN extrait à partir des tumeurs de colon présente la concentration d'ADN la plus élevée. Ce résultat peut être dû à la taille du fragment analysé qui est plus grande (plus de cellules cancéreuses) que les fragments de mélanome et cérébral. La concentration d'ADN est évidemment proportionnelle à la quantité de cellules tumorales à partir desquelles l'extraction est réalisée.

Pour les échantillons du mélanome, bien que la taille du fragment était assez grande, la concentration de l'ADN extrait était moins élevée par rapport à l'ADN des tumeurs du colon. Ce résultat peut être expliqué de deux façons:

- la première est la durée de fixation des fragments dans le formol qui est normalement différente selon la taille du fragment. Dans ce cas les fragments pourraient être incubés pendant un temps plus long et en utilisant un type de formol qui peut altérer les cellules et par conséquent diminuer la concentration finale de l'ADN.
- Un autre argument qui est plus sûr est l'effet de la mélanine qui se trouve dans les cellules mélanocytaires. Une équipe de recherche a montré que ce pigment altère le dosage d'ADN⁴⁸. Pour cette raison, un de nos échantillons qui était destiné à l'analyse a été exclu parce qu'on n'a pas pu le doser.

Pour les échantillons de tumeur cérébrale, la petite taille des fragments analysés (seulement des biopsies) est certainement la cause principale de ce faible résultat de dosage.

Au cours de la PCR, seulement 20 cas parmi 34 cas du colon, et 11 cas parmi 16 cas du mélanome ont donné une bonne amplification. L'analyse de la courbe d'absorbance des échantillons non amplifiés montre qu'ils sont de mauvaise qualité. L'ADN est dégradé, et pour cette raison, l'amplification a échoué.

Le résultat PCR montre une bande correspondant à la séquence amplifiée de l'exon 15 du gène BRAF d'une taille approximative de (143pb). Cette bande est visible pour 20 patients atteints du cancer colorectal, pour 11 patients atteints du mélanome et pour 10 patients atteints de l'astrocytome pilocytique. La taille de la bande est presque la même que celle obtenue dans une étude qui vise à détecter la mutation de B-raf dans différents type de cancer¹¹.

Les résultats montrent aussi qu'après le séquençage, la mutation est plus fréquente dans le mélanome.

Puisque le gène B-raf et K-ras entrent dans la même voie de signalisation qui active la division cellulaire, donc forcément la mutation de l'un ou de l'autre gène peut agir sur l'efficacité du traitement ciblé donné. Pour cela il faut détecter la mutation dans les deux gènes.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

L'exon 2 du K-ras de quelques échantillons du colon a été amplifié par PCR puis séquencé pour vérifier la présence ou non de mutation. Malheureusement, aucun des échantillons n'a donné un bon résultat. Probablement il s'agit d'un problème technique.

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.

Jusqu'aujourd'hui, seulement la mutation de gène K-ras est demandée dans le diagnostic. Celle de B-raf est demandée juste pour le pronostic.

On peut donc 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 K- Ras. L'analyse combinée des mutations de KRAS et BRAF devrait être utilisée pour sélectionner prospectivement les patients atteints de CCR, éligibles pour un traitement par les anti-EGFR, d'où la nécessité de l'étude moléculaire de la mutation du gène KRAS.

Pour confirmer l'utilité de la technique PCR allèle spécifique dans la détection des mutations, cette dernière a été réalisée pour les 11 cas de mélanome. Cette technique a permis de confirmer les résultats de séquençage par l'apparition de 3 bandes pour 3 échantillons, montrant la présence de mutation dans l'ADN de ces tumeurs.

Des études similaires sur d'autres maladies génétiques comme la maladie, JAK 2, ont été réalisées par l'utilisation de la technique de PCR allèle spécifique. Ces études ont montré que cette technique est plus sensible dans la détection de mutations en cas d'hétérozygote que le séquençage⁴⁹.



Conclusion et perspectives

L'utilisation de la biologie moléculaire et la génétique est devenue désormais un outil clé dans le diagnostic des différents types du cancer. Elles permettent à la fois la détermination des facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées comme par exemple 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 couteux, non dénué d'effets toxiques potentiels.

Vu l'importance de ce sujet certes très vaste, et qui demande un travail laborieux, toutes les études et techniques permettant la détection d'autres types de mutations comme la duplication de la région contenant le gène B-raf n'ont pas pu être cernées. Pour cela, il sera très important d'appliquer toutes les techniques permettant la révélation de ces altérations pour améliorer le dépistage et cibler le traitement le plus efficace.

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

L'intégration de biomarqueurs aux pratiques cliniques courantes permettra sans doute, d'obtenir davantage de résultats positifs, notamment, en évitant aux patients de subir les effets toxiques inutiles découlant d'un traitement inefficace, ou en étant en mesure, de choisir un traitement qui pourrait se révéler plus efficace pour combattre leur maladie.

Références

- 1 : gène atlas. <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/BRAFID828.html>
- 2 : Gaëlle COMBEAUX et al., 2006. thérapie anticancereuse ciblée. Thèse de doctorat.
- 3 : Hmitou et al., *MOL. CELL. BIOL.*, 2007. Differential Regulation of B-Raf Isoforms by Phosphorylation and Autoinhibitory Mechanisms. *Molecular and cellular biology.*, 34,75-79.
- 4: Valluet A., Hmitou I., Davis S., Druillennec S., Larcher M., et al., 2010. B-RAF Alternative Splicing Is Dispensable for Development but Required for Learning and



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- Memory Associated with the Hippocampus in the Adult Mouse. PLoS ONE, journal. PLoS ONE 5(12): e15272. doi:10.1371/journal.pone.0015272
- 5 : Namba H., Nakashima M., Hayashi T., Hayashida N., Maeda S., Rogounovitch TL, Ohtsuru A., Saenko VA., Kanematsu T., Yamashita S., (September 2004). "[Clinical implication of hot spot BRAF mutation, V599E, in papillary thyroid cancers](#)". The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism., 89, 94264-4266.
- 6: Tan YH., Liu Y., Eu KW., Ang PW., Li WQ., Salto-Tellez M., Iacopetta B., Soong R., April 2008. Detection of BRAF V600E mutation by pyrosequencing. Pathology., 40,295–298.
- 7: Deng G., Bell I., Crawley S., Gum J., Terdiman JP., Allen BA., Truta B., Sleisenger MH., Kim YS., January 2004. BRAF mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated hMLH1, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Clin. Cancer Res., 10,191–195.
- 8: Maldonado JL., Fridlyand J., Patel H., Jain AN., Busam K., Kageshita T., Ono T., Albertson DG., Pinkel D., Bastian BC., December 2003. Determinants of BRAF mutations in primary melanoma. J. Natl. Cancer Inst., 95,1878–1890.
- 9: Elisei R., Ugolini C., Viola D., Lupi C., Biagini A., Giannini R., Romei C., Miccoli P., Pinchera A., Basolo F., October 2008. BRAF(V600E) mutation and outcome of patients with papillary thyroid carcinoma: a 15-year median follow-up study. J. Clin. Endocrinol. Metab., 93,3943–3949.
- 10: Tiacci E., Trifonov V., Schiavoni G., Holmes A., Kern W., Martelli MP., Pucciarini A., Bigerna B., Pacini R., Wells VA., Sportoletti P., Pettirossi V., Mannucci R., Elliott O., Liso A., Ambrosetti A., Pulsoni A., Forconi F., Trentin L., Semenzato G., Inghirami G., Capponi M., Di Raimondo F., Patti C., Arcaini L., Musto P., Pileri S., Haferlach C., Schnittger S., Pizzolo G., Foà R., Farinelli L., Haferlach T., Pasqualucci L., Rabadan R., Falini B., June 2011. BRAF mutations in hairy-cell leukemia. N. Engl. J. Med., 364, 512-519.
- 11: Helen Davies.,Graham R. Bignell., Charles Cox., Philip Stephens., Sarah Edkins., Sheila Clegg., Jon Teague., Hayley Woffendin., Mathew J. Garnett.,et al. 27 JUNE 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. NATURE ., 417, 949-954.
- 12.: Joshua D., Schiffman J.,Graeme Hodgson., Scott R., VandenBerg., et al. January 12, 2010. Oncogenic BRAF Mutation with CDKN2A Inactivation Is Characteristic of a Subset of Pediatric Malignant Astrocytomas. Cancer.Res .,70, 512-519.
- 13: Bataille V., de Vries E.,2008. [Melanoma—Part 1: epidemiology, risk factors, and prevention](#). BMJ.,337, 234-237.
- 14: Collège français des enseignants de dermatologie, Masson, 2009. <http://www.fascicules.fr/polycopies-accueil-0.html>
- 15 : Khlat M., Vail A., Parkin M., Green A., 1992.Mortality from melanoma in migrants to Australia: variation by age at arrival and duration of stay. Am J Epidemiol, 135, 1103-1113.
- 16:: Miller A., Mihm M .,2006. gènes CDKN2A et CDK4 in Melanoma. N Engl J Med., 355, 51-65.
- 17: Flaherty KT., Puzanov I., Kim KB., 2010. [Inhibition of mutated, activated BRAF in metastatic melanoma](#). N Engl J Med., 363, 809-819.
- 18: Bliss JM., Ford D., Swerdlow AJ., Armstrong BK., Cristofolini M., Elwood JM.,1995. [Risk of cutaneous melanoma associated with pigmentation characteristics and freckling: systematic overview of 10 case-control studies](#). International Melanoma Analysis Group. Int J Cancer., 62, 367-76.
- 19: Melissa Ann Wilson., and Katherine., L. Nathanson.,2012. Molecular Testing in Melanoma. The Cancer Journal.,18, 2.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- 20: Scott E., Woodman.,2012. Metastatic Uveal Melanoma. Biology and Emerging Treatments. The Cancer Journal.,18, 234-238
- 21: Stéphane Dalle., Tanguy Martin-Denavit., Luc Thomas.,2006. Hypervariabilité Génotypique des mélanomes Un défi thérapeutique. MEDECINE/SCIENCES., 22 , 178-82.
- 24 : Ponz de LeonM., Sassatelli R., Benatti P., Roncucci L.,1993. Identification of hereditary non-polyposis colorectal cancer in the general population. Cancer; 71, 3493-3501 .
- 25: Philippe T., Marie-Odile J.,2002. « Pathologie moléculaire du cancer du colon : vers la mise en place de stratégies diagnostiques intégrées ». Ann Pathol., 253-7.
- 26 : Ricard D., Idbaih A., Ducray F., Lahutte M., Hoang-Xuan K., Delattre JH., [Primary brain tumours in adults](#), Lancet., 212,1984-1996.
- 27: A. Idbaih, K., Hoang-Xuan., D. Psimaras., M. Sanson., J.-Y. Delattre. Encycl Med Chir 17, 001-10.
- 29: Stefan PFISTER., wibke G et al.,2008. B-raf gene duplication constitutes a mechanism of MAPK pathway activation in low-grade astrocytomas. the journal of clinical investigation., 118. 5.
- 30: Keith T., Flaherty, M.D. Igor Puzanov., M.D.Kevin., B. Kim., M.D. Antoni Ribas., M.D. Grant ., A. McArthur., Jeffrey., A. Sosman, M.D. Peter J., O'Dwyer, M.D., Richard J. Lee., Joseph F., Grippo., Keith Nolop., M.D., and Paul B., 2012. Inhibition of Mutated, Activated BRAF in Metastatic Melanoma. N Engl J Med. 363,809-819.
- 31: Docteur Olivier BLEICHNER. THERAPIE CIBLEE : UNE RÉVOLUTION MÉDICALE ?. 09/05/2008. http://www.ligue-cancer.net/cd95/article/1774_therapie-ciblee-une-revolution-medicale-
- 32: Angela J. Sievert., Eric M. Jackso., Xiaowu Gai., Hakon Hakonarson., Alexander R. Judkins., Adam C., Resnick., Leslie N. Sutton., Phillip B. Storm., Tamim H. Shaikh., Jaclyn A. Biege.; 22 July 2008. Duplication of 7q34 in Pediatric Low-Grade Astrocytomas Detected by High Density Single-Nucleotide Polymorphism-Based Genotype Arrays Results in a Novel BRAF Fusion Gene. Brain pathology., 19, 449-458.
- 33 : J.F. BOSSET., P. ROUANET ., Décembre 2005. Cancer colorectal.Université Médicale Virtuelle Francophone, Polycopié national de cancérologie.
- 34 : Menegoz F., Black RJ., Arveux P., Magne V., Ferlay J., Buemi A et al.,1997 Cancer incidence and mortality in France in 1975-1995. Eur J Cancer Prev.,6, 442-466.
- 35: Benhamiche AM., 1998. Cancer du côlon: épidémiologie descriptive et groupes à risque élevé. Gastroentérol Clin Biol., 22, S3-S11.
- 36: STUPP, R et al.,200. Un guide pratique au traitement des gliomes. Bull Cancer., 94, 817-22.
- 37: BALDI. I., et al., 2010. Epidémiologie des glioblastomes. Neurochirurgie. 56, 433-440.
- 38 : Lamoril J., Deybach J.-C., Bouizegarenea P. ,2006. Microsatellites instability in colon cancer. Immuno-analyse et biologie spécialisée.,211-222.
- 39: Span M., Moerkerk PT., de Goeij AF.,Arends JW.A .,1996. detailed analysis of K-ras point mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. Int J Cancer ; 69,241-5.
- 40: A.M. Bouvier., C. Lepage., J. Faivre., 2009. Épidémiologie des cancers du tube digestif. EMC (Elsevier Masson SAS), Gastro-entérologie, 9-000-E-12.
- 41: Registre Des Cancers Nord Tunisie, Données 1999-2003, Evolution 1994-2003, Projections à l'horizon 2024.
- 42: M.A. Tazi., N. Benjaafar., A. Er-raki ., 2009. Registre des cancers de Rabat, incidence des cancers à rabat année 2005.



UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH
FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES DE FES
Département de Biologie

- 43 : F. Grange .,2005. Épidémiologie du mélanome cutané : données descriptives en France et en Europe, *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*; 132,975–982.
- 44 : Wu XC., Eide MJ., King J., Saraiya M., Huang Y., Wiggins C., Barnholtz-Sloan JS., Martin N., Cokkinides V., Miller J., Patel P., Ekwueme DU., Kim., 2010. Racial and ethnic variations in incidence and survival of cutaneous melanoma in the United States,1999-2006, *J Am Acad Dermatol*; 65,26-37.
- 45: U. Leiter and C. Garbe., 2008. Epidemiology of Melanoma and Non melanoma Skin Cancer.The Role of Sunlight, *Advances in Experimental Medicine and Biology.*, 624, 89-103.
- 46: Central Brain Tumor Registry of the United States. 2009-2010 Eighteen States Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in Eighteen States in 2002-2006, <http://www.cbtrus.org/2007-2008/2007-2008.html>
- 47: Alba A.,Brandes et al.,2008 Glioblastoma in adults, *Critical Reviews. Oncology/Hematology*, 67,139–152.
- 48 : Davis Bignell. GR., Longo.NC et al., 2002. B-raf V600 mutation test. *Nature.*, 417, 949-945.
- 49 : Jean-François Lambert., Michel A., Duchosal., 2007. Hématologie: Syndromes myéloprolifératifs –une kinase après l’autre. *Med Suisse*;7, 11–13.