



**République Algérienne Démocratique et Populaire**  
**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique**

**Université Saad Dahlab de Blida**  
**Faculté des Sciences Agro-vétérinaires**  
**Département Biologie**

Mémoire de projet de fin d'étude en vue de l'obtention du Diplôme de Master

**Domaine** : Sciences de la Nature et de la Vie

**Spécialité** : Génétique et Physiologie

**THEME**

**Etude des marqueurs moléculaires ACE,  $\beta$  –caténine et P53 dans  
la Polypose Adénomateuse Familiale**

**Présenté par** : Mlle **BOUZAR Fatiha**

**Soutenu le 25/09/2013 devant le jury composé de :**

**Président** : Mr **BESSAAD A.**

Maitre assistant FSB, USDB.

**Examinatrice** : Mme **HERKAT S.**

Maitre assistante FSB, USDB.

**Examinatrice** : Mme **BENAZOUZ F.**

Maitre assistante FSB, USDB.

**Promotrice** : Mme **AIT YOUNES S.**

Professeur CHU Mustapha, UV d'Alger.

**Co-promoteur**: Mr **BESSAAD A.**

Maitre assistant FSB, USDB.

**Promotion 2012-2013**

## *Dédicace*

*Je dédie cette mémoire*

*A Mon très chère Père Lakhdar*

*Aucune dédicace ne saurait exprimer l'amour, l'estime, le dévouement et le respect que j'ai toujours eu pour vous. Rien au monde ne vaut les efforts fournis jour et nuit pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes sacrifices que tu as consentis pour mon éducation et ma formation.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A Ma très chère mère Mahdjouba*

*Affable, honorable, aimable : Tu représentes pour moi le symbole de la bonté par excellence, la source de tendresse et l'exemple du dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager et de prier pour moi.*

*Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'un grand secours pour mener à bien mes études.*

*Aucune dédicace ne saurait être assez éloquente pour exprimer ce que tu mérites pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Je te dédie ce travail en témoignage de mon profond amour. Puisse Dieu, le tout puissant, te préserver et t'accorder santé, longue vie et bonheur.*

*A mon très cher frère Farid et leur petite fille Imen Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité. Je t'exprime à travers ce travail mes sentiments de fraternité et d'amour.*

*A ma très chère sœur Kheira, son mari Ahmed et leurs enfants Ahlam, Hadjer, Fadhila, Seif et Nardjessa.*

*A ma très chère sœur Leila, son mari Ahmed et leur enfants Ikram, Fichem et Nour.*

*A Mon cher frère Kouider les mots ne suffisent guère pour exprimer l'attachement, l'amour et l'affection que je porte pour vous. Mon ange gardien et mon fidèle compagnant dans les moments les plus délicats de cette vie mystérieuse. Je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.*

*A mon beau frère Houcin Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A Mon cher petit frère Toufik Je te souhaite un avenir plein de joie, de bonheur, de réussite et de sérénité.*

*A tous les membres de ma famille, petits et grands*

*A mes chères ami(e)s : Amina, Amel, Soumia, Nacira, Karima, Fichem, Sabrina, Yasmine, Abdo et Denise.*

## Conclusion

---

Les analyses anatomocliniques, histologiques et immunohistochimiques de 11 patients atteints de PAF ont permis de dégager les faits suivants :

- .La Polypose Adénomateuse Familiale touche aussi bien l'homme que la femme, les femmes plus que les hommes.
- .Les patients appartiennent âgés de 18 ans à 66 ans.
- .Selon le pronostic histologique, les ADK bien différenciés représentent le type histologique le plus fréquent 60%.
- .Une surexpression de la protéine P53 est trouvée dans le cas de l'adénome avec dysplasie de haut grade.

Les paramètres actuellement pris en compte pour le diagnostic et la thérapeutique de la PAF sont essentiellement des paramètres cliniques, ou encore des données histopathologiques.

L'enquête familiale est indispensable afin de déceler la PAF au stade de bénignité et donc de pratiquer une véritable chirurgie préventive.

Les techniques immunohistochimiques ont l'avantage d'être applicables à n'importe quel type de prélèvement, incluant les prélèvements congelés et les prélèvements fixés, IHC oriente vers la protéine responsable et les techniques de séquençages permettent d'identifier la mutation en cause.

Notre étude immunohistochimique consiste à visualiser l'expression de la protéine  $\beta$ -caténine, ACE (antigène carcinome embryonnaire) et P53 chez les malades atteints de la polypose adénomateuse familiale. Malgré l'application de l'immunohistochimie comme méthode de routine en anatomie pathologique grâce à sa sensibilité, sa spécificité et son avantage d'être rapide et facile; elle reste non fiable à donner des valeurs pronostiques et diagnostiques.

La combinaison entre les méthodes de la biologie moléculaire et la mise en évidence de la surexpression de ces protéines par l'immunohistochimie pour confirmer la gravité des altérations génétiques de ces molécules dans le développement des polypes jusqu'à la malignité, donc l'importance de la mise en place dans les hôpitaux d'un service d'oncogénétique qui s'associe à un service de génétique complèterait la clinique des cancers héréditaires. De plus si la mutation est mise en évidence, un geste prophylactique précoce permettra aux patients atteints de PAF d'avoir une espérance de vie plus longue.

# **Remerciements**

**A Dieu**

**Tout puissant pour m'avoir donnée la santé et la force de mener ce travail jusqu'à son terme.**

**A Madame le Professeur AIT YOUNES S.**

*Je tiens à remercier chaleureusement et infiniment en premier lieu Mme AIT YOUNES Professeur et maître de conférences de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire, de m'avoir introduit dans le monde de l'anatomopathologie mais également de m'avoir ouvert les portes de la recherche et de m'avoir laissé travailler sur ce sujet. J'ai pu profiter au cours de ma recherche de votre enseignement, de vos conseils mais également de votre soutien aussi bien sur un plan professionnel que personnel. Je suis reconnaissante que vous ayez accepté de diriger ce travail. Veuillez trouver ici, l'expression de ma profonde admiration et de mon respect.*

**A Monsieur BESSAD Amine**

*Je vous remercie chaleureusement Mr BESSAAD A, maître assistant enseignant à la FSB USDB pour toute l'aide que vous m'avez apportée. Votre soutien, vos conseils et votre gentillesse le partage de vos connaissances et son expérience scientifique en toutes circonstances m'ont permis de mener à bien ce travail et de surmonter toutes les difficultés qui se sont présentées. C'est pour moi un honneur et une joie que vous ayez accepté de co-diriger ce travail*

**A Monsieur BESSAD Amine**

*Je vous remercie d'accepter de juger ce travail et de présider ce Jury.*

**Aux membres du jury**

**Madame HARKAT S.**

*Je remercie Mme HARKAT S, maître assistante enseignante à la FSB USDB d'avoir accepté de juger ce travail. Vous avez toujours pris le temps de discuter, des questions que je me posais sur la recherche. Soyez assuré de mon profond respect.*

*Je remercie Madame d'avoir accepté de juger ce travail.*

**Madame BENAZOUZ F.**

*Je remercie Mme BENAZOUZ F, maître assistante enseignante à la FSB USDB pour son soutien et sa bonne humeur durant cette année de Master II. Je suis reconnaissante de l'honneur que vous me faites en acceptant de faire partie de mon jury.*

*Je remercie Madame d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Je tiens à remercier très particulièrement Mme ELFARTAS R, maître de conférences enseignant-chercheur à la FSB, USDB, pour sa précieuse aide qu'il m'a apporté, en lui présentant tout mes sincères respects*

*Je remercie toute l'équipe du service de l'anatomie pathologie du CHU Mustapha Pacha.*

*Particulièrement Pr AMIR, Mr CHOUAKI Mohamed Toufik, pour leurs précieux conseils et instructions, à tous les résidents et les techniciens pour leur sympathie, grâce à eux notre stage s'est déroulé dans de bonnes conditions.*

*A toute personne ayant participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.*

# Sommaire :

<b>Introduction</b> .....	1
<b>Chapitre I : synthèse bibliographique</b> .....	2
<b>1. Rappel</b> .....	2
1.1. Anatomie du colon.....	2
1.2. Structure de la paroi colique.....	2
1.3. Histologie des polypes néoplasique.....	3
<b>2. la Polypose Adénomateuse Familiale</b> .....	5
2.1. Historique.....	5
2.2. Polypose Adénomateuse Familiale Classique.....	5
2.3. Diagnostique de la PAF.....	6
2.4. PAF atténuée ou AFAP.....	6
2.5. Polypose MYH associée ou MAP.....	7
<b>3. Les cancers colorectaux</b> .....	7
3.1. Carcinogenèse colique.....	8
3.2. Voie de signalisation Wnt.....	9
3.3. Structure du gène APC.....	10
3.4. Protéine APC.....	11
3.5. Structure du gène P53.....	12
3.6. Protéine P53.....	12
3.7. Structure de $\beta$ -caténine.....	12
3.8. Structure du gène ACE.....	13
3.9. La protéine ACE.....	14
3.10. Mutation du gène APC.....	15

3.10.1. Mutation germinales.....	15
3.10.2. Mutation somatique.....	15
3.11. Corrélations génotype-phénotype.....	16
3.12. Dépistage.....	16
<b>4. Thérapeutique de la PAF.....</b>	<b>17</b>
4.1. Chirurgie prophylactique.....	17
4.2. Chimio-prévention.....	18
4.3. Stratégies immunologique et génétiques.....	19
<b>Chapitre II : Matériel et Méthodes.....</b>	<b>20</b>
<b>1. Matériel.....</b>	<b>20</b>
1.1. Patients.....	20
1.2. Matériel biologique.....	20
1.3. Matériel non biologique.....	20
<b>2. Méthodes :.....</b>	<b>20</b>
2.1. Pedigrees.....	20
2.2. Etude anatomoclinique.....	20
2.3. Etude histopathologique .....	21
2.4. Etude immunohistochimique.....	22
<b>Chapitre III : Résultats et Discussion.....</b>	<b>24</b>
<b>1. Résultats.....</b>	<b>25</b>
1.1. Analyse des pedigrees.....	25
1.2. Etude anatomoclinique.....	28
1.3. Etude histopathologique.....	31
1.4. Etude immunohistochimique.....	35

**2. Discussion**.....39

**Conclusion**.....44

**Références bibliographiques**

**Annexe 1**

**Annexe 2**

**Annexe 3**

### Index des tableaux :

<b>Tableau I :</b> Caractéristiques des patients.....	29
<b>Tableau II :</b> Moyen d'âge des patients.....	30
<b>Tableau III :</b> Répartition des cas selon la forme de PAF .....	30
<b>Tableau IV :</b> Répartition des adénomes (polype) selon le type histologique et degré de dysplasie .....	31
<b>Tableau V :</b> Répartition des ADK selon le degré de différenciation. ....	33



### **Index des abréviations :**

**ACE :** Antigène Carcino-embryonnaire

**ACF :** Foyers de Cryptes Aberrantes

**ADK :** Adénocarcinome

**APAF:** Polypose Adénomateuse Familiale Atténuée

**APC:** Adenomatous Polyposis Coli

**ARD:** Armadillo Repeat Domain

**Asef:** APC stimulated guanine nucléotide exchange factor.

**CCR:** Cancer Colorectal.

**CHRPE :** hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire de la rétine

**CIN:** Instabilité Chromosomique

**CK:** Casein Kinase

**c-MYC:** V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog

**DAB:** diaminobenzidine

**DCC:** deleted in colorectal cancer

**Dsh :** dishevelled

**dx:** Age du patient au diagnostic

**EB1:** End-Binding Protein 1

**Fz :** Frizzled

**GSK3:** Glycogen synthase Kinase

**HDLG:** Homologue of Drosophila Discs large

**HGMD:** Human Gene Mutation Database

**HNPCC:** Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer.

**IHC:** Immunohistochimie.

**Kb:** Kilobase

**KDa:** Kilo Dalton

## Liste des abréviations

---

**K-Ras:** Kirsten rat sarcoma oncogene

**Lef:** lymphoid enhancer factor

**LOH:** Loss Of Heterozygosity

**LRP5/6:** LDL-receptor-related proteins 5 and 6

**MAP:** Polypose MYH Associée

**MCR :** Mutation Cluster Region

**MSI :** Instabilité Microsatellitaire

**MYH:** Gène MUTY

**NES:** Nuclear export signal

**PAF:** Polypose Adénomateuse Familiale.

**pb:** paire de base

**PP2A:** Protéine Phosphatase 2A

**PTB-BL:** tyrosine-protein phosphatase

**SMAD:** Human homologs of Drosophila Mad

**Tcf:** T Cell Factor

**TNM:** Tumeur primitive Envahissement ganglionnaire Métastases

**TP53:** Tumor Suppresor p53

**Wnt:** wingless type

### Index des figures :

<b>Figure 1</b> : Anatomie du colon.....	2
<b>Figure 2</b> : Schéma représentatif de la structure d'une crypte colique.....	3
<b>Figure 3</b> : Aspect macroscopique d'un polype sessile.....	3
<b>Figure 4</b> : Aspect macroscopique d'un polype pédiculé.....	4
<b>Figure 5</b> : Schéma des 15 exons du gène APC montrant la localisation génétique des trois groupes de polyposes atténuées.....	7
<b>Figure 6</b> : Répartition des différents types de cancers colorectaux.....	8
<b>Figure 7</b> : Modèle de tumorigenèse colorectale selon Fearon et Vogelstein.....	9
<b>Figure 8</b> : Représentation schématique de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine.....	10
<b>Figure 9</b> : Structure exonique du gène APC.....	11
<b>Figure 10</b> : Représentation schématique des différents domaines de la protéine APC et son interaction avec les autres protéines cellulaires.....	11
<b>Figure 11</b> : Représentation schématique structure de la protéine p53.....	12
<b>Figure 12</b> : Structure de la protéine $\beta$ -caténine et domaines d'interactions protéine/protéine.....	13
<b>Figure 13</b> : Organisation génomique de gène ACE.....	14
<b>Figure 14</b> : Représentation schématique de la protéine ACE.....	15
<b>Figure 15</b> : Modèle du double événement mutationnel et de la perte de l'hétérozygotie de Knudson.....	15
<b>Figure 16</b> : Corrélation entre la position des mutation du gène APC et les manifestations phénotypiques de la PAF.....	17
<b>Figure 17</b> : Schéma représente montage chirurgicale lors des colectomies : Anastomose iléo-rectale.....	18
<b>Figure 18</b> : Schéma représente montage chirurgicale lors des colectomies : Anastomose iléo-anale.....	18
<b>Figure 19</b> : Arbre généalogique de la famille F1.....	26
<b>Figure 20</b> : Arbre généalogique de la famille F2.....	27

<b>Figure 21</b> : Répartition des PAF selon le sexe.....	30
<b>Figure 22</b> : Adénome tubuleux .....	31
<b>Figure 23</b> : Adénome tubuleux avec lésions de dysplasie de haut grade .....	32
<b>Figure 24</b> : Adénome tubulo-villeux avec lésions de dysplasie de bas grade .....	32
<b>Figure 25</b> : Adénome tubulo-villeux avec lésions de dysplasie de bas grade .....	33
<b>Figure 26</b> : Adénocarcinome bien différencié développé sur polype dysplasique.....	34
<b>Figure 27</b> : Répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps $\beta$ -caténine.	35
<b>Figure 28</b> : IHC à l'anticorps anti $\beta$ -caténine.....	36
<b>Figure 29</b> : Répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps ACE.....	36
<b>Figure 30</b> : IHC à l'anticorps anti ACE.....	37
<b>Figure 31</b> : Répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps.....	38
<b>Figure 32</b> : IHC à l'anticorps anti P53 positivité nucléaire.....	38
<b>Figure 33</b> : IHC à l'anticorps anti P53 Immunomarquage négatif.....	39

## **Glossaire :**

**Adénome :** Tumeur développée aux dépens d'une glande et dont la structure rappelle celle de la glande normale dont elle dérive.

**Anastomose :** Communication entre deux vaisseaux et par extension, entre deux conduits de même nature et entre deux nerfs. Elle peut être naturelle ou établie chirurgicalement.

**Carcinome :** Tumeur épithéliale maligne

**Hamartomateuses :** Une malformation, d'aspect tumoral due à un mélange anormal des éléments constitutifs normaux.

**Progénitrice :** la cellule souche.

**Néoplasique :** Formation d'un tissu nouveau dont les éléments se substituerait à ceux d'un tissu antérieur sans rien leur emprunter.

**Dysplasie :** Trouble acquis survenant après la naissance de la maturation d'un tissu à renouvellement rapide et pouvant constituer un état précancéreux.

**Inflammation chronique :** Ensemble des phénomènes réactionnels se produisant au point irrité par un agent pathogène.

**Rectorragie :** Hémorragie rectale.

**Syndrome de Gardner :** Maladie héréditaire à transmission dominante autosomique rare, survenant chez l'adulte jeune, caractérisée par l'association d'une polypose rectocolique disséminée évoluant généralement vers la dégénérescence maligne ; de kystes sébacés multiple ; d'ostéomes bénins localisés ; lipomes sous cutanés ; tumeur fibreuses.

**Polyploïde :** Certaines constitutions anormales des cellules.

**Polype :** Tumeur généralement bénigne, fibreuse ou muqueuse, s'implantant par un pédicule tantôt large et court, tantôt longue et grêle, dans une cavité naturelle.

**Pédicule :** Partie rétrécie rattachant au corps certaines tumeurs ou certains organes.

**Sessile :** Qui possède une large base d'implantation.

**Médulloblastome :** Germe de la moelle.

**Syndrome de Turcot :** Association d'une polypose colique familiale et de gliomes malins du système nerveux central.

**Desmoïde :** Tumeur formée de tissu dérivés du mésenchyme, siégeant au niveau de la peau ou des muscles de la paroi abdominale.

**Hépatoblastome :** Tumeur maligne du foie formée de cellule hépatique embryonnaires à développement anarchique.

**Hémicolectomie :** Résection de la moitié du colon.

**Colectomie :** Résection de la totalité du colon.

**Adénome (synonyme de polype) :** tumeur bénigne (par opposition au carcinome qui est une tumeur maligne, c'est-à-dire cancéreuse) qui peut être souvent enlevée par voie endoscopique.

**Asymptomatique :** ne présentant pas de signe clinique permettant le diagnostic de la maladie.

**Chromosome :** structure située dans le noyau des cellules et support de l'information génétique.

**Coloprotectomie (ou colectomie totale préventive) :** ablation de la totalité du gros intestin.

**Examen histologique :** examen d'un tissu ou d'une lésion au microscope par un médecin anatomopathologiste. Cet examen permet de déterminer la nature bénigne ou maligne de la lésion et d'en préciser sa gravité.

**Incidence :** nombre de nouveaux cas d'une maladie dans une population, pendant un temps donné.

**Marqueur biologique tumoral :** substance sécrétée par certains types de cellule et présente dans le sang. En cas de croissance anormale de ces cellules, la production du marqueur

est anormalement élevée. Le marqueur constitue un bon indice de l'activité de ces cellules. C'est un outil précieux de surveillance de certains cancers, mais pas un outil de diagnostic. Il existe différents types de marqueurs, suivant le type de cellules.

Pour le cancer du côlon et du rectum, le marqueur usuel est l'ACE (antigène carcino embryonnaire).

**Mutation constitutionnelle délétère :** altération d'un gène par suite d'une erreur de réplication de l'ADN.

**Polype :** Le terme polype rectocolique désigne une tumeur de petite dimension faisant saillie dans la lumière intestinale (Jouret *et al.*, 1998).

## Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est le troisième cancer dans le monde chez les deux sexes confondus 608700 décès par ce cancer sont enregistrés en 2008 et devenu un véritable enjeu de santé publique. Environ 5% des CCR sont d'origine héréditaire, les principaux syndromes de prédisposition aux cancers : la polypose adénomateuse familiale (PAF) liée à une mutation sur le gène APC et le syndrome de lynch (HNPCC) lié à des mutations sur les gènes du système MMR.

La PAF responsable d'environ 1% de l'ensemble des cancers colorectaux chaque année (Bercovich *et al.*, 2009)

Notre travail repose sur une étude anatomoclinique, histopathologique et immunohistochimique sur prélèvement tissulaire et enquête génétique qui permet à partir d'un cas index de pouvoir identifier dans sa famille les sujets chez qui l'affection peut être présente. L'étude épidémiologique est réalisée sur une période allant de 2009 à Aout 2013 l'échantillonnage comporte biopsie de 11 patients, les résultats montre une prédominance de sexe féminin 73% pour les femmes et 27% pour les hommes. Le type histologique représenté par les adénomes tubulo et tubulo villosus et pour les adénocarcinomes peu différenciés 20%, moyennement différenciés 20% et bien différenciés 60% selon la classification TNM.

Une étude immunohistochimique des marqueurs  $\beta$ -caténine, ACE et P53 est réalisée sur un échantillon de patients ayant un adénome (polype) et/ou adénocarcinomes, consiste à identifier et évaluer la distribution et la localisation cellulaire de ces différentes protéines chez les malades atteints de PAF ce qui permet d'évaluer son grade.

**Mots clé :** PAF, CCR,  $\beta$ -caténine, ACE, P53, APC, IHC et voie Wnt.

## Summary

Cancer colorectal is the third cancer in the world at the two confused sexes 608700 deaths by this cancer are recorded in 2008 and become an real issue of public health. Approximately 5% of the CRC are of origin hereditary, the principal syndromes of predisposition to cancers: the family adenomatose polypose related to a change on gene APC and the syndrome of lynch (HNPCC) related to changes on genes of the system MR.

The PAF responsible for approximately 1% of the whole of colorectal cancers each year (Bercovich *and Al*, 2009)

Our work rests on an anatomico-clinic, histopathologic and immunohistochemical study on tissue taking away and genetic investigation which makes it possible starting from a case index to be able to identify in its family the subjects at which the affection can be present. The epidemiological study is carried out over one period going of 2009 in Aout 2013 sampling coorte biopsy of 11 patients, the results shows a prevalence of female sex 73% for the women and 27% for the men. The histological type represented by the adenomata tubulo and tubulo villous and for the adenocarcinomas little 20%, fairly 20% and differentiated well 60% according to classification TNM.

A immunohistochemical study of the markers  $\beta$ -caténine, ACE and P53 is carried out on a sample of patients having an adenoma (polyp) and/or adenocarcinomas, consists to identify and evaluate the distribution and the cellular localization of these various proteins among patients reached of PAF what makes it possible to evaluate its rank.

**Keywords:** PAF, CRC,  $\beta$ -caténine, ACE, P53, APC, IHC and Wnt way.



## ملخص

سرطان القولون و المستقيم , هو ثالث سرطان في العالم لدى الجنسين حيث يسجل 608700 وفاة خلال سنة 2008 بحيث صار رهان في الصحة العمومية , ما يقارب 5% من سرطان القولون و المستقيم ينتقل وراثيا , اهم الاعراض الاستعدادية للسرطان adenomateuse polypose La المرتبط بالتحول الوراثي على مستوى المورث المرتبط بالنظام MMR.

ان PAF مسؤول تقريبا على 1 % من مجموع سرطان القولون و المستقيم كل سنة.

حرصنا في عملنا على دراسة النسيج المرضي و التشريح العيادي و IHC حيث عملنا على اقتطاع نسيج من المريض, ايضا قمنا بالتحقيق الوراثي مع المرضى المصابين ب PAF .

ان البحث عن الوباء تحقق في مدة زمنية ممتدة من 2009 ال اوت 2013 و تحصلنا على 11 نموذج للمرضى و النتائج تبين ان النسبة المرضية عند النساء 73% , و 27% للرجال . نوع النسيج ممثل ب villeux tubulo et adenome tubulo , و بالنسبة ل Adenome tubulo قليل 20% , متوسط 20% و متميز 60% حسب الترتيب TNM

دراسة IHC للبروتين ACE,  $\beta$ -caténin , و P53 تحقق على نموذج مرضي لهم Adénome او adenome الذي يشخص و يقيم التوزيع و يعين الخلايا لمختلف هذه البروتينات عند المرضى المصابين ب PAF و هذا ما يقيم تطور المرضى

**الكلمات المفتاحية:**

PAF . CCR .  $\beta$ - caténine . ACE . P53 . APC . IHC et voie

## Introduction

---

Lors des 30 dernières années, les cancers colorectaux se sont hissés au 3<sup>ème</sup> rang des cancers dans le monde (Bouvier *et al.*, 2008). Ils sont représentés par 2 classes de cancers : les cancers sporadiques et les cancers héréditaires regroupant deux types de cancers : les cancers avec polyposis telle que la Polyposis Adénomateuse Familiale (PAF) et les cancers sans polyposis tel que le syndrome de Lynch (HNPCC).

La PAF est une pathologie génétique à transmission autosomique dominante qui s'inscrit dans le registre des syndromes de prédisposition aux cancers colorectaux héréditaires. Cette maladie rare est responsable chaque année d'environ 1% de l'ensemble des cancers colorectaux. Elle a une prévalence de 1/10000 et touche de façon équivalente les deux sexes.

Cliniquement, il existe deux formes de PAF : la forme classique (sévère) et la forme atténuée (APAF) phénotypiquement moins sévère. La PAF classique se caractérise par l'apparition de centaines voire de milliers de polypes au niveau du colon et du rectum dès l'âge de la puberté.

La APAF est caractérisée quant à elle par une apparition de polypes à un âge plus tardif (35 ans) et un nombre d'adénomes réduit inférieur à 100. En l'absence de chirurgie préventive, la dégénérescence des polypes en cancer colorectal (CCR) est inévitable vers l'âge de 40 ans pour la PAF classique et vers l'âge de 55 ans pour la AFAP.

Dans certains cas des manifestations extra-coliques peuvent être retrouvées chez des patients atteints de PAF. Certaines d'entre elles peuvent s'associer à la PAF et s'inscrire dans des syndromes : le Syndrome de Gardner (tumeurs desmoïdes, ostéomes, anomalies dentaires) et le Syndrome de Turcot (médulloblastome).

La PAF résulte d'une mutation au niveau du gène suppresseur de tumeurs APC (Adénomateux Polyposis Coli) (Kinzler *et al.*, 1991 ; Nishisho *et al.*, 1992). La nature et la position de la mutation sur ce gène détermine la sévérité de la maladie (Nagase *et al.*, 1992).

La forme atténuée peut aussi être due à une mutation du gène MYH qui est l'origine de la forme récessive de la APAF.

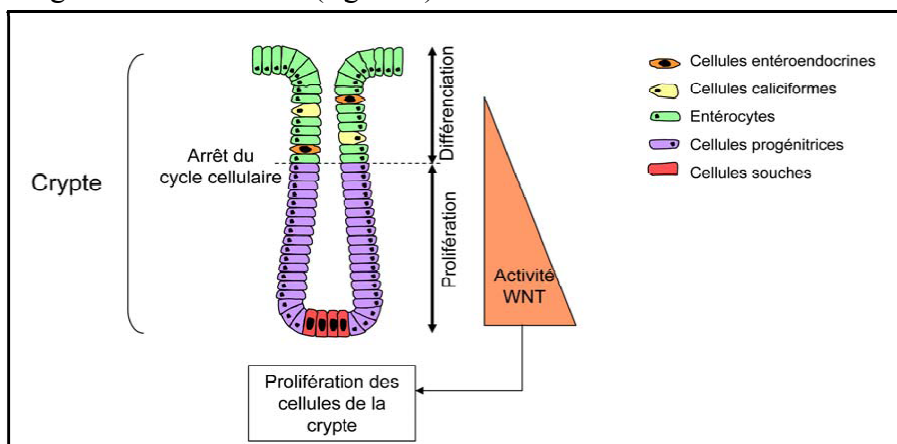
La protéine du gène APC interagissait avec la  $\beta$ -caténine qui est un élément clé de la voie de signalisation Wnt.

Dans notre travail nous avons recherché grâce à l'immunomarquage l'expression et l'accumulation cellulaire de la protéine  $\beta$ -caténine, ACE (antigène carcinome embryonnaire) et P53 chez les malades atteints de la polyposis adénomateuse familiale.

## 1. Rappels :

### 1.1. Anatomie du colon :

Le côlon est la partie de l'intestin qui fait suite à l'intestin grêle jusqu'au rectum et aboutissant à l'orifice anal (Kamina et Di Marino 1998). Il débute ainsi dans la fosse iliaque droite et fait le tour de la cavité abdominale, constituant ainsi le cadre colique qui se termine au niveau du rectum. Sa longueur est en moyenne de 1.5 m et son diamètre diminue progressivement de la droite vers la gauche (vers le rectum) (Casoli 2009). Il assure la concentration et le transit du bol fécal, il est très septique et ses blessures sont très graves (Kamina et Di Marino 1998). Morphologiquement, le colon est organisé en différentes parties: le caecum, le colon ascendant, le colon transverse, le colon descendant, le sigmoïde et le rectum (figure 1).



**Figure 1 :** Anatomie du colon (Kamina et Di Marino 1998).

### 1.2. Structure de la paroi colique :

Le colon est constitué de quatre tuniques (Kamina et Di Marino 1998) reliées entre elle par un tissu conjonctif : la séreuse, la musculuse, la sous muqueuse, la muqueuse. (Robert 2002).

**1.2.1. La séreuse :** formée de péritoine viscéral, elle comprend un mésothélium et une couche sous-séreuse de conjonctif lâche, riche en tissu adipeux au niveau des appendices.

#### 1.2.2. La musculuse :

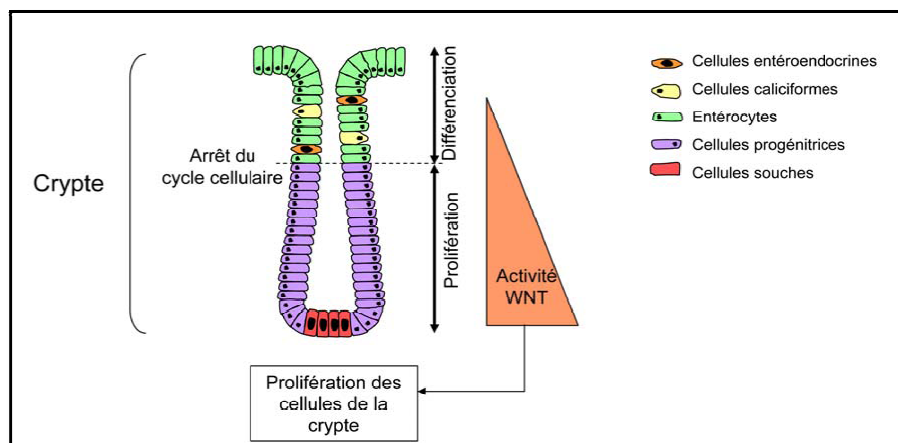
**1.2.2.1. La couche externe :** elle constituée de myofibres lisses longitudinales.

**1.2.2.2. La couche interne :** elle est constituée de myofibres lisses circulaires.

**1.2.3. La sous-muqueuse :** représente près de la moitié de l'épaisseur du colon, elle riche en fibre de collagène et fibroblaste (Kamina et Di Marino 1998).

**1.2.4. La muqueuse :** l'épithélium colique contient de nombreuses invaginations appelées cryptes. Au fond des cryptes il y a les cellules souches qui permettent le renouvellement cellulaire. Une des cellules filles en mitose conserve ses propriétés de cellule souche. La deuxième migre le long de l'axe de la crypte (Robert 2003) (figure 2). Au cours de leur migration vers la lumière de l'intestin la cellule subira encore plusieurs divisions avant de se différencier, ceux-ci arrêtent leur prolifération et se différencient en un des types cellulaires fonctionnels, puis sont éliminés à la surface de l'épithélium par apoptose ; ce cycle dure environ 3 à 5 jours (Hamelin *et al.*, 2003)

Ces processus assurent l'homéostasie de l'épithélium colique.



**Figure 2:** Schéma représentatif de la structure d'une crypte colique (Chatel 2009).

### 1.3. Histologie des polypes néoplasique (adénomes) :

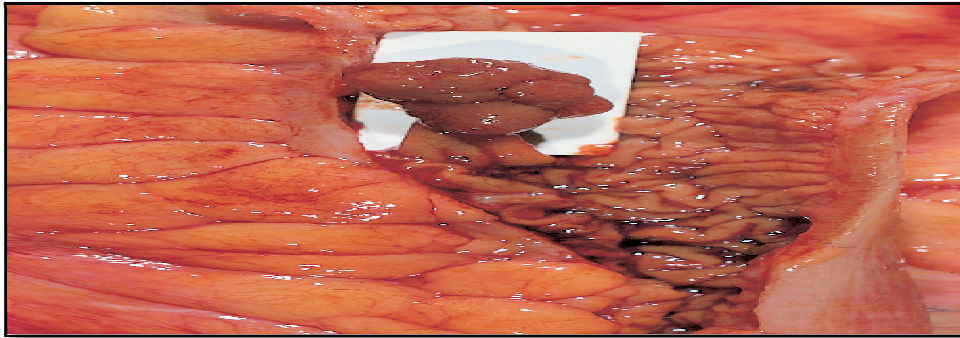
#### 1.3.1. Aspect macroscopique :

Les polypes peuvent être sessiles ou pédiculés. Les polypes sessiles sont fixés directement à la paroi par un socle à large base d'implantation.

Les polypes pédiculés sont reliés à la muqueuse colique par un pédicule plus ou moins long constitué de muqueuse et de sous-muqueuse coliques normales (Jouret *et al.*, 1998).

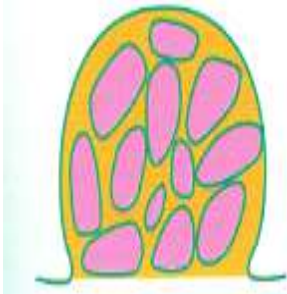
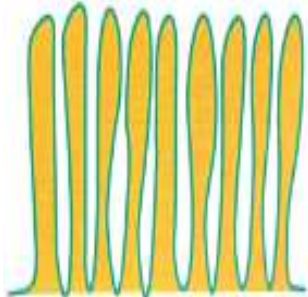



**Figure 3 :** Aspect macroscopique d'un polype sessile. (Jouret *et al.*, 1998)



**Figure 4 :** Aspect macroscopique d'un polype pédiculé (Jouret *et al.*, 1998).

### 1.3.2. Aspect microscopique :

Types de polype	Caractère néoplasique	Figure
Le polype adénomateux ou adénome tubuleux	petite taille et constitué de glandes néoformées, ramifiées, bordées par des cellules basophiles pseudostratifiées. Il présente une inversion de l'activité mitotique par rapport à la normale (Jouret <i>et al.</i> , 1998)	
Le polype vilieux ou adénome vilieux	Plus grande taille, constitué par des projections papillaires ramifiées tapissées par un épithélium pseudo-stratifié dont les axes conjonctivo-vasculaires sont grêles. Les lésions volumineuses prennent le nom de tumeur vilieuse (Jouret <i>et al.</i> , 1998)	

Le polype adéno-villeux ou adénome tubulo-villeux	constitué à la fois d'une association de structures vilieuses et de structures tubuleuses (Jouret <i>et al.</i> , 1998)	
---	---	---

## 2. La polypose Adénomateuse Familiale(PAF) :

### 2.1. Historique :

L'histoire de la PAF débute en 1721 avec Mezel qui identifie et décrit pour la première fois des lésions polyplôides colorectales. En 1857, Lebert commence à associer certains symptômes tels que les rectorragies, les inflammations chroniques ou encore les diarrhées, constipations à la présence de centaines de polypes colorectaux, et ce chez des patients âgés de moins de 40(Bülow *et al.*, 2006)

C'est en 1881 que Sklifasowski signala le premier cas précis de PAF. En 1882, Cripps introduit la notion de prédisposition, héritée de génération en génération : l'origine génétique de la polypose commence à être envisagée. En 1927, Cockayne a établi que la polypose est héritée de façon dominante.

Les aspects cliniques et pathologiques de la PAF ont été précisément définis dans les années 1950 et 1960. Gardner en 1953, lie la PAF au syndrome de Gardner qui associe une polypose colique familiale à différentes manifestations extra-coliques (Gardner *et al.*, 1953)

Le syndrome de Gardner est causé principalement par une mutation du gène Adenomatous polyposis coli (APC). Ce gène, identifié au début des années 90 par plusieurs équipes de chercheurs (Grodén *et al.*, Joslyn *et al.*, Kinzler *et al.*, Nishisho *et al.*), se trouve sur le bras long du chromosome numéro 5 (5q) (Karazivan *et al.*, 2000). En 1991 le gène APC a été localisé en 5q21-22 et sa séquence définie par Kinzler (Kinzler *et al.*, 1991 ; Nishisho *et al.*, 1991). La protéine APC n'a été identifiée qu'en 1995 (Rubinfeld *et al.*, 1995) Jusqu'à présent, plus de 200 mutations ont été rapportées. La position de la mutation au niveau de la séquence du code du gène APC peut influencer l'expression du phénotype.

Ces mutations ou anomalies génétiques sont habituellement transmises par un des parents, mais peuvent survenir de novo dans un tiers des cas (Karazivan *et al.*, 2000).

### 2.2. Polypose Adénomateuse Familiale Classique :

La FAP classique est une maladie génétique autosomique dominante. Se transmet de génération en génération caractérisée par des mutations dans le gène APC (Adenomatous Polyposis Coli tumor suppressor gene) (Ponz *et al.*, 2001). Les patients atteints de FAP

classique développent des centaines, voire milliers de petites excroissances, des polypes bénins au niveau du colon et du rectum et ce, dès la puberté.

Vers l'âge de 40 ans, un ou plusieurs de ces polypes dégénèrent, entraînant un cancer colique évolutif. Seule une Colectomie préventive peut éviter cette évolution maligne en adénocarcinomes (CCR) (Renkonen *et al.*, 2005). En effet, 50% des patients non traités développent un cancer du colon à l'âge de 39 ans et 95% à l'âge de 50 ans (Burt 2007).

Chez de nombreux patients atteints de PAF classique, des manifestations extra-coliques surviennent sous formes de polypes au niveau de l'estomac (dans 50% des cas), du duodénum (90% des cas) et de l'intestin grêle (50% des cas) (Burt 2007).

La PAF peut aussi s'associer à des lésions extra-intestinales telles que des lésions rétinienne à l'origine de hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire rétinien, qui se traduisent par des taches visibles à l'examen du fond d'œil. Celle-ci est retrouvée chez certaines familles atteintes de PAF et a été utilisée pour faciliter le diagnostic de la PAF avant le développement des tests génétiques (Bertario *et al.*, 1993).

Les autres manifestations extra-intestinales s'associant à la FAP peuvent s'inscrire dans des syndromes ( Harb 2011), le syndrome de Gardner avec des kystes épidermoïdes, des ostéomes mandibulaires, diverses anomalies dentaires (Buecher *et al.*,2009) et des tumeurs desmoïdes ; ou encore le Syndrome de Turcot (médulloblastomes) (Hamilton *et al.*, 1995).

**2.3. Diagnostique de la FAP :** Au début, la maladie est asymptomatique. Le diagnostique doit être réalisé de façon pluridisciplinaire (Dorval 2006). Le dépistage de la PAF débute par :

- **L'observation de l'état général du patient :** les symptômes digestifs évocateurs sont des rectorragies ou des troubles du transit intestinal (diarrhée, constipation), la présence de sang dans les selles est rare, des douleurs abdominales et un amaigrissement du à une anémie.
- **Le test Hemocult II :** permet ensuite la recherche de sang occulte dans les selles (impossible à voir à l'œil nu).
- **Le toucher rectal :** permet de détecter des anomalies telles que la présence de polypes
- **La sigmoidoscopie :** permet d'examiner la paroi du rectum et la partie inférieure du colon, et d'en retirer les excroissances (polypes).
- **La coloscopie :** permet d'examiner la paroi du colon sur toute sa longueur, ainsi que la forme des polypes (sessile, pédiculé ou plan). Au cours de cet examen, les polypes peuvent être biopsiés ou excisés avant qu'ils ne dégénèrent. En effet, 70 à

75% des polypes constituent de véritables lésions précancéreuses : les polypes adénomateux. Le risque de dégénérescence augmente avec la taille du polype : 28% entre 10 et 15 mm et plus de 50% pour un diamètre supérieur à 20 mm (Houcke *et al.*, 2002)

- **Le diagnostic histologique du polype** : permet de classer les polypes selon leur type histologique adénome tubulaire (75% des cas), villos (5%) ou tubulo-villos (20%) ou leur nature (bénigne ou maligne). En cas de cancer colorectal, un diagnostic histologique de la tumeur est établi via la classification TNM. Cette classification permet de distinguer cinq niveaux d'envahissement pariétal (T) et trois degrés d'extension ganglionnaire (N). En fonction de la présence ou non de métastases (M) (Sobin *et al.*, 1997)

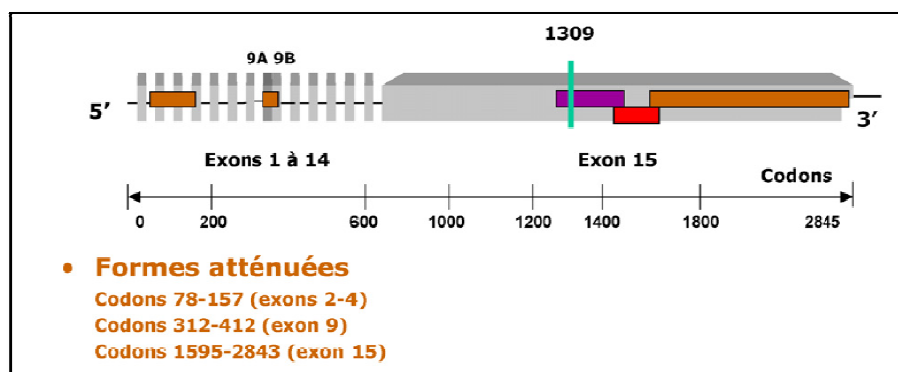
#### 2.4. FAP atténuée ou AFAP :

La PAF atténuée est caractérisé par un phénotype moins sévère que celui de la PAF classique. En effet, le nombre de polypes varie entre 10 et 100 et sont prédominants au niveau du colon proximal (Rozen *et al.*, 2006). Ils apparaissent entre 40 et 45 ans, l'âge d'apparition du CCR qui est d'environ 55 ans.

Bien que le nombre de polypes soit inférieur à celui retrouvé dans le PAF classique, le risque pour développer un cancer colorectal est plus élevé.

Les manifestations cliniques de la APAF peuvent varier entre les familles ayant le même site de mutation (variation interfamiliale) et entre les membres d'une même famille (variation intrafamiliale) (Rozen *et al.*, 2006). Les manifestations extra-intestinales les plus fréquentes pour la APAF sont les mêmes que pour la PAF classique (estomac et duodénum) (Half *et al.*, 2009).

La définition claire des polyposes atténuées, est génétique, avec trois régions du gène APC concernées (Saurin 2008).





**Figure 5 :** Schéma des 15 exons du gène *APC* montrant la localisation génétique des trois groupes de polyposes atténuées (Saurin 2008).

### 2.5. Polypose MYH associée ou MAP :

La MAP est une maladie phénotypiquement similaire à l'APAF, mais nécessite une mutation bi-allélique du gène MYH localisé en 1p32-34. Ce gène est impliqué dans la réparation de l'ADN, dont la fonction est de reconnaître une forme d'anomalie survenant lors de la copie de l'ADN (Al-Tassan *et al.*, 2002). Elle est transmise sur le mode autosomique récessif et touche une naissance sur 10 000 à 40 000. Elle est diagnostiquée chez des personnes âgées de plus de 50 et représente 0.5% des cas de cancer du colon (Lipton *et al.*, 2006).

Chez les individus homozygotes pour une mutation sur le gène MYH, le risque de dégénérescence des polypes en CCR après 50 ans est élevé (60 à 70%).

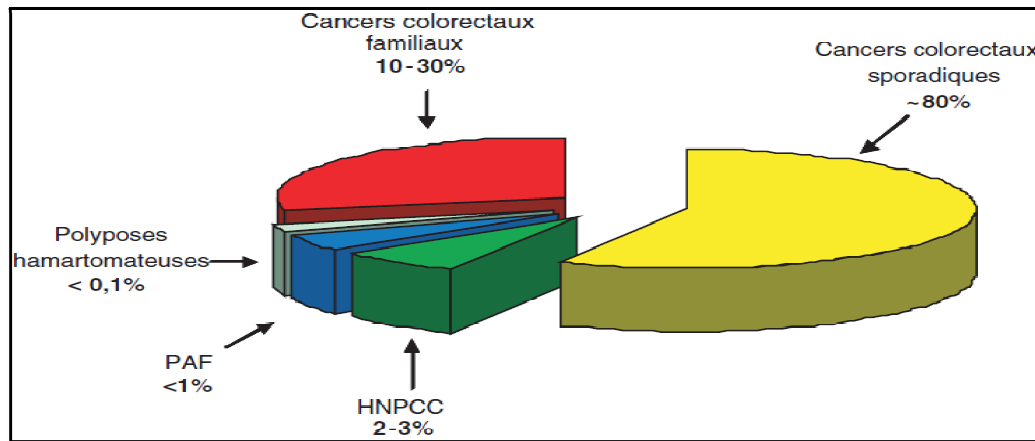
### 3. Les cancers colorectaux :

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus répandus dans le monde avec plus de 1 millions de personnes diagnostiquées chaque année (Choong *et al.*, 2012).

Les cancers du colon sont sporadiques dans 80% des cas. Ce type de cancer est le résultat de multiples mutations somatiques au sein de la cellule (délétion homozygote, mutation ponctuelle, insertion d'ADN) (Fearon et Vogelstein 1990), et touchent la population générale sans antécédent familial et sans facteurs de risque identifiés qui sont caractérisées par une apparition nettement plus tardive (âge moyen du diagnostique = 70 ans). Ces formes sporadiques sont peu fréquentes avant 50 ans et augmentent après 60 ans (Chung 2000).

Les principaux syndromes de prédisposition aux cancers du colon sont la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) représentent respectivement moins de 1 %. La prévalence estimée 1/11 300 à 37 600 dans l'UE (Bercovich *et al.*, 2009), le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) représentent entre 2 et 3% de tous les cancers colorectal et les polyposes hamartomateuses qui représentent moins de 0,1% (Karoui *et al.*, 2007).

Cependant, il est important de souligner que dans certains cas, le cancer colorectal est associé à une histoire familiale (Karoui *et al.*, 2007) sans identification préalable d'un gène mais avec des prédisposition mineures (Marie Monge.2006). Ces cas sont environ 10-30% des cas de cancers sporadique.



**Figure 6 :** Répartition des différents types de cancers colorectaux (Karoui *et al.*, 2007).

### 3.1. Carcinogénèse colique :

Deux grands mécanismes d'instabilité indépendants ont été identifiés dans le cancer l'instabilité chromosomique (CIN) et l'instabilité génomique (MSI) (Worthley *et al.*, 2007). Ces derniers s'accompagnent à l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques telle que l'hyperméthylation, conduisant à la transformation de l'épithélium colique normal en adénocarcinome (Philippe *et al.*, 2007).

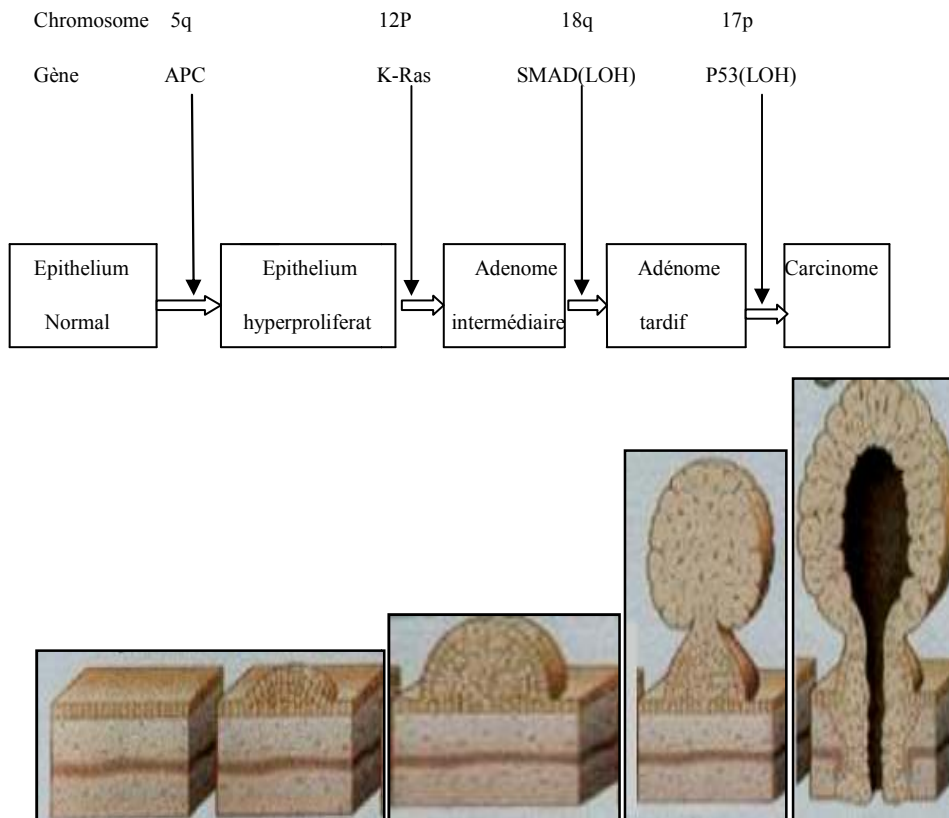
La tumorigénèse colique a d'abord été décrite et précisée par Vogelstein (1990), ce modèle se base sur des corrélations établies entre les stades histologique et morphologique des lésions pré-néoplasique et les altérations génétiques associées.

Le cancer colorectal représente un modèle de cancérogénèse multi étape caractérisée par l'apparition d'altération atteignent successives, responsables de la transformation d'une cellule colique normale en cellule cancéreuse. Ces altérations atteignent les oncogènes et gènes supresseurs de tumeurs (Viguier *et al.*, 2003 ).

Les cancers du côlon se développent à partir de l'épithélium, dans un premier temps Par formation de foyers de cryptes aberrantes (ACF). A partir de ces foyers, il peut y avoir développement d'un adénome puis enfin d'un carcinome (Vogelstein *et al.*, 1988).

Ce processus débute par le gène APC qui intervient à l'état normale dans la dégradation intracellulaire des  $\beta$ -caténine (Bosset,Rouanet 2005), une mutation inactivatrice du gène supresseur de tumeur APC qui se traduit par une expansion de la zone de prolifération cellulaire dans le tiers supérieur de la crypte colique. Ceci abouti à la formation d'adénomes de petite taille (polypes adénomateux de bas grade de dysplasie) à la surface de l'épithélium (Bosman 2009). La seconde étape est une mutation activant l'oncogène K-Ras. C'est l'oncogène le plus activé dans l'adénome et le cancer colique (P.Validire 2001), elle est à l'origine de la formation d'adénomes intermédiaires. Une immortalisation des cellules par l'activation de la télomérase et la perte d'hétérozygotie (LOH) au niveau des gènes SMAD mènent à la formation d'un adénome de haut grade de dysplasie (Bosman 2009).

Enfin, une inactivation du gène suppresseur de tumeurs TP53 marque la transition du stade d'adénome de haut grade au stade de carcinome (Yu *et al.*, 2005).



**Figure 7 :** Modèle de tumorigenèse colorectale selon Fearon et Vogelstein (1990) appelé aussi séquence adénome-carcinome.

### 3.2. Voie de signalisation Wnt :

La voie de transduction du signal Wnt est impliquée dans la régulation du taux cytosolique de  $\beta$ -caténine par le biais de la protéine APC, la bêta caténine c'est la clé de cette voie. La voie Wnt est active dans les cellules de la zone proliférative de l'épithélium (crypte) et inactive lorsque les cellules migrent à la surface de l'épithélium (Hamelin *et al.*, 2003).

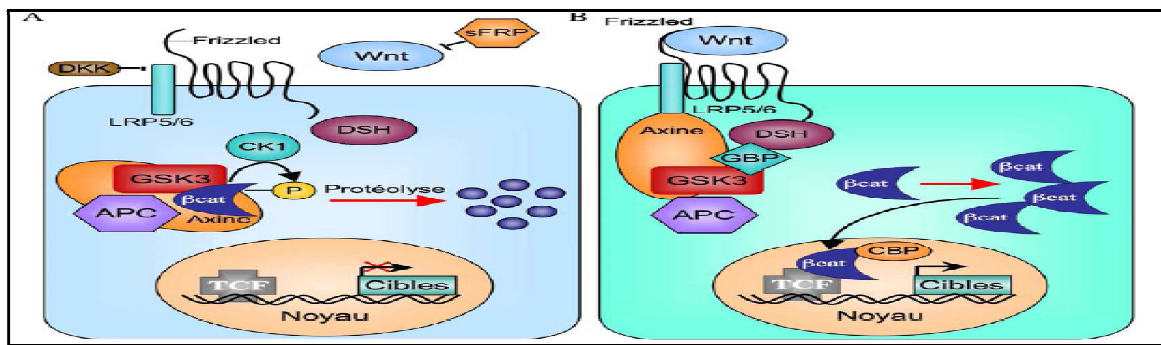
En absence de ligand Wnt (voie inhibitrice OFF) (Figure A.8),  $\beta$ -caténine est recrutée au sein d'un complexe de destruction contenant les protéines APC, axine et GSK-3 $\beta$ .  $\beta$ -caténine est phosphorylée par CK1 $\alpha$  et GSK-3 $\beta$  sur les sérines et thréonines de la partie N-terminale de  $\beta$ -caténine. Cette phosphorylation entraîne l'ubiquitination et la dégradation de  $\beta$ -caténine par le protéasome. Ainsi, en absence de Wnt, les niveaux cytoplasmique et nucléaire de  $\beta$ -caténine sont très faibles. Les gènes cibles de  $\beta$ -caténine sont réprimés (Brantjes *et al.*, 2001; Cavallo *et al.*, 1998; Roose *et al.*, 1998).

Dans le seconde cas, en présence de ligand Wnt (voie activatrice ou ON) (Figure B.8), un complexe se forme entre Wnt, le récepteur LRP5/6 (LDL-receptor-related proteins 5 and 6) et Frizzled (Fz) (He *et al.*, 2004). Ce complexe recrute les protéines Dishevelled (Dsh) et axine à la membrane (Bilic *et al.*, 2007). Le récepteur LRP5/6 est alors phosphorylé par la

CK1 $\gamma$  (Casein kinase 1 $\gamma$ ). Cette phosphorylation active le récepteur LRP6. La séquestration de l'axine à la membrane inhibe l'interaction entre l'axine et GSK-3 $\beta$  (He *et al.*, 2004). GSK-3 $\beta$  est phosphorylée par Dsh. GSK-3 $\beta$  inactive n'est plus capable de phosphoryler  $\beta$ -caténine, la  $\beta$ -caténine s'accumule dans le cytoplasme puis se transloque dans le noyau où elle interagit avec les facteurs Lef/Tcf pour activer la transcription de ses gènes cibles. Un des gènes cibles de la transcription induite par le complexe  $\beta$ -caténine-TCF4 est l'oncogène c-MYC, surexprimé dans les CCR où il induit une prolifération des cellules épithéliales coliques (Puig *et al.*, 2010)

Dans 80% des CCR une mutation du gène *APC* (protéine *APC* tronquée) est à l'origine d'une activation de cette voie de signalisation Wnt, la protéine *APC* étant tronquée, les protéines telles que l'axine, la GSK-3 $\beta$  ne pourront pas reconnaître leurs sites de fixation au niveau de l'*APC*. La voie ON sera activée au sommet de la crypte en induisant l'activation de c-MYC va à son tour réprimer l'expression de *p21* (inhibiteur du cycle cellulaire) et aboutir au blocage du processus apoptotique (Hameline *et al.*, 2003).

L'absence d'une protéine *APC* fonctionnelle contribue à l'apparition d'une dysplasie sévère se traduisant par le développement d'adénomes puis d'adénocarcinomes (cancer).



**Figure 8 :** Représentation schématique de La voie Wnt/ $\beta$ -caténine (Moon *et al.*,2004)  
 (A) En absence de ligand Wnt.  
 (B) En présence de Wnt.

**3.3. Structure du gène *APC* :**

Le gène *APC* est exprimé dans tous les tissus, il possède 2 régions promotrices : 1A et 1B (Fearnhead *et al.*, 2001) Il s'étend sur une longueur génomique de 108 353 pb, il comporte 15 exons (Grodén *et al.*, 1991) de 1 à 15, l'exon 15 représente 75% de la partie codante du gène *APC*.

Les exons de 1 à 14 ont une taille comprise entre 100 et 200 nucléotides pour chaque exon et l'exon 15 à une longueur d'environ 6500 nucléotides.



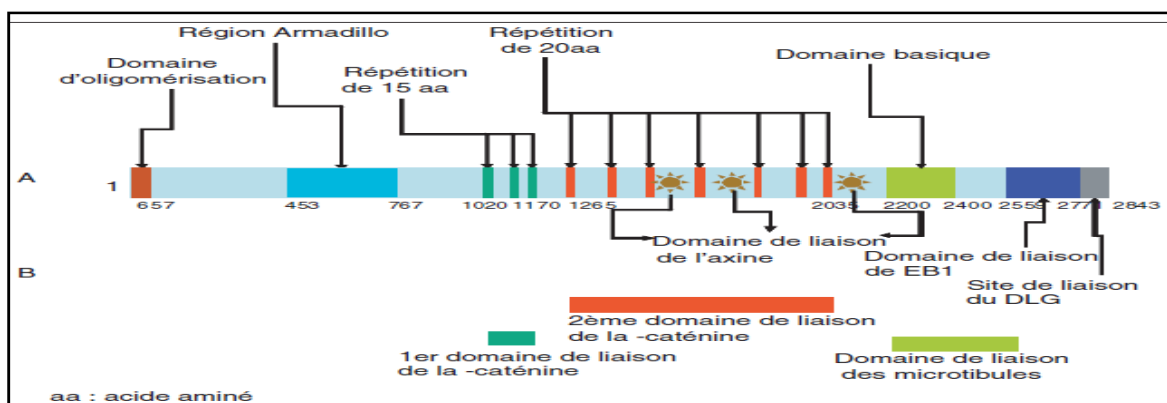
**Figure 9 :** Structure exonique du gène *APC*.

### 3.4. Protéine APC :

La protéine APC est exprimée dans de nombreux tissus : poumon, sein, pancréas, cerveau, tissu lymphoïde, intestin grêle, colon. Elle est retrouvée aussi bien dans le cytoplasme que dans le noyau et n'est fonctionnelle que sous forme d'un complexe homodimérique. Elle est impliquée dans des processus d'adhésion et de prolifération cellulaire au niveau de l'épithélium colique, le contrôle de la voie de signalisation Wnt, la migration et l'apoptose (Kinzler et Vogelstein 1996). La fonction principale d'APC, dans les cellules coliques, serait la régulation du taux de  $\beta$ -caténine au sein de la cellule (Laurent Prevotat 2003).

La protéine APC est composée de 2843 acides aminés (Rubinfeld *et al.*, 1995), la structure primaire de cette protéine comprend (figure 10) :

- ❖ **Une extrémité N –terminale comprenant :** Le domaine d'oligomérisation constitué de 8 répétitions s'étendant du 6<sup>ème</sup> au 57<sup>ème</sup> acide aminé (Aa) et la région Armadillo elle est constituée de 7 répétitions situées entre les Aa 453 et 767. Ce domaine lie les protéines PP2A (rôle antagoniste de la GSK3 $\beta$ ), l'Axine (lie la  $\beta$ -caténine et la GSK3 $\beta$ ) et la ASEF (interagit avec raf et assure l'adhésion et la mobilité cellulaire).
- ❖ **Une région centrale avec deux motifs de répétitions :** Un motif de 15 Aa répété 3 fois entre les Aa 1120 et 1169 permettant de lier la  $\beta$ -caténine, et un motif de 20 Aa répété 7 fois entre les Aa 1262 et 2033 permettant de lier l'Axine et la  $\beta$ -caténine mais seulement après phosphorylation des 20 Aa par la GSK3 $\beta$ .
- ❖ **Une extrémité C-terminale comprenant :** Une région basique entre les Aa 2219 et 2580 qui permet la liaison aux microtubules et à la protéine EB1 (famille des tubulines) et des séquences d'exportation nucléaire ou NES impliquées dans la redistribution cytoplasmique de la  $\beta$ -caténine par la protéine APC (Arbesfeld *et al.*, 2000). Deux autres protéines interagissent avec l'extrémité C-terminale : la protéine HDLG qui interagit avec la région qui s'étant de 2771 Aa à 2843 Aa et la protéine phosphatase PTP-BL.

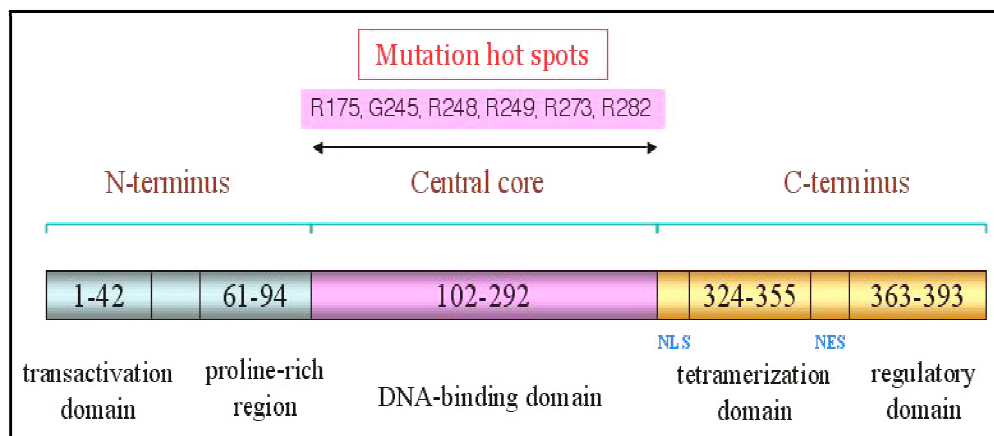


**Figure 10 :** Représentation schématique des différents domaines de la protéine APC et son interaction avec les autres protéines cellulaires ( Karoui *et al.* , 2007).

**3.5. Structure du gène P53 :** le p53 gène suppresseur de tumeurs (Cho *et al.*, 1999) est situé en position 17p13.1 (Angélique Guillaudeau 2012) et s'étend sur une longueur génomique de 20-Kb et composé de 11 exons et 10 introns, qui est situé sur l'arme de petit calibre du chromosome 17 ( Laurent Prevotat 2003).

**3.6. Protéine P53 :** Le gène p53 code pour une phosphoprotéine de 393 Aa qui est présente en très petite quantité dans les cellules normales, mais en abondance dans les cellules transformées dans les tumeurs humaines (Angélique Guillaudeau 2012) en réglant la prolifération, la différenciation et l'apoptose des cellules (Cho *et al.*, 1999), se composant de trois domaines fonctionnels :

- ❖ **Un domaine d'activation de N-terminal :** Le domaine de N-terminal inclut le sous-domaine de transactivation et une région de PXXP qui est un fragment proline-proline-riche.
- ❖ **Un domaine obligatoire central d'ADN :** est exigé pour l'attache ordre séquence-spécifique d'ADN et des résidus d'acide aminé dans ce domaine sont fréquemment subis une mutation dans les cellules cancéreuses et les tissus humains de tumeur. On rapporte que les Arg175, les Gly245, les Arg248, les Arg249, les Arg273, et les Arg282 sont les points chauds de mutation dans divers cancers humains.
- ❖ **Un domaine tetramerization de C-terminal :** est considérée comme remplir une fonction de normalisation, les résidus sur ce domaine de base de C-terminal subissent des modifications comprenant la phosphorylation et l'acétylation. (Bai *et al.*, 2006).



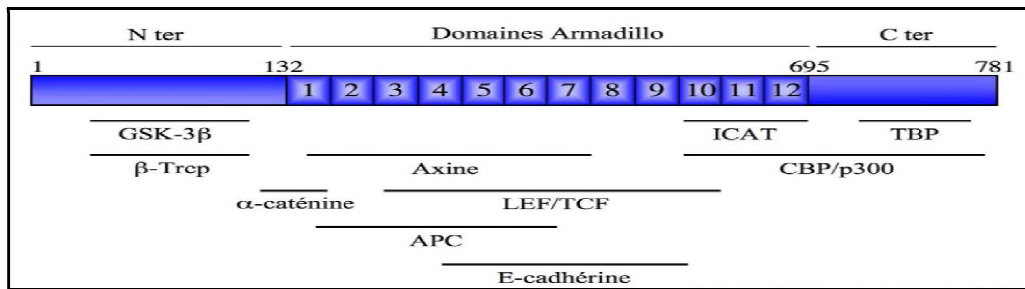
**Figure 11 :** Représentation schématique structure de la protéine p53 (Bai *et al.*, 2006).

**3.7. Structure de  $\beta$ -caténine :** Le gène de la  $\beta$ -caténine est localisé au niveau de la région chromosomique 3p21 et code pour une protéine de 88 kD, elle est présente dans les différents compartiments de la cellule et joue des rôles différents en fonction de sa localisation subcellulaire. Au niveau membranaire,  $\beta$ -caténine est impliquée dans l'adhérence cellulaire en reliant les cadhérines aux filaments d'actine. Au niveau cytoplasmique, elle intervient dans la voie de signalisation Wnt/ $\beta$ -caténine. Au niveau

nucléaire,  $\beta$ -caténine agit comme facteur de transcription, en association avec les facteurs Lef/Tcf (Lymphoid Enhancer Factor/T Cell Factor) (Takeda *et al.*, 2000)

Structurellement, la  $\beta$ -caténine est composée de trois domaines :

- ❖ **une région N-terminale** : d'environ 130 acides aminés, possédant de multiples sites de phosphorylation par la GSK-3 $\beta$ , par la caséine kinase Ia (CKIa) et un site de fixation (sérines 33/37) à la protéine b-TrCP initiatrice du processus de dégradation par le protéasome.
- ❖ **Un domaine central** : de 550 acides aminés comprenant 12 ARD (*Armadillo Repeat Domain*) de 42 acides aminés chacun. Dans ce domaine, il existe des sites de liaison à la protéine APC (ARD 4 et 5), à l'axine (ARD 9-10), à l'E-cadhérine (ARD 9 et 10) et au facteur de transcription Tcf (ARD 6 et 7).
- ❖ **Un domaine C-terminale** : de 100 acides aminés ayant une fonction de signalisation par sa capacité à activer la transcription (Bienz 1999).

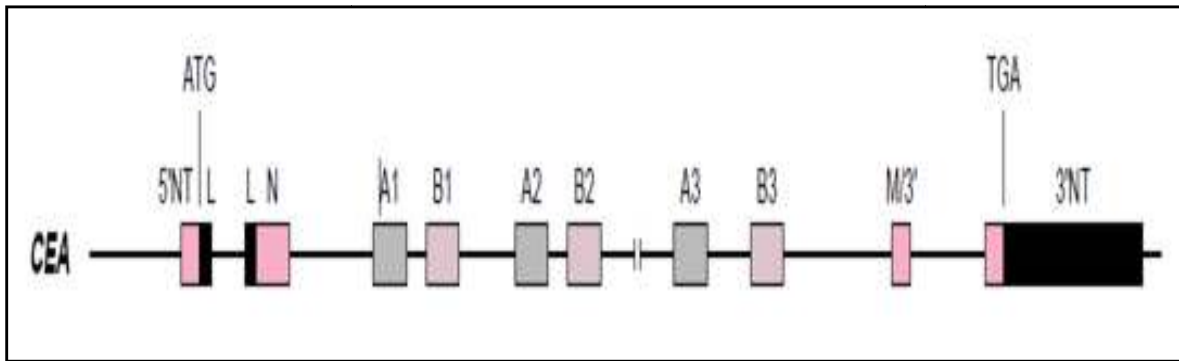


**Figure 12:** Structure de la protéine  $\beta$ -caténine et domaines d'interactions protéine/protéine (Hurlston *et al.*, 2003)

### 3.8. Structure du gène ACE :

Le gène de l'ACE est le CEA-related cell adhesion molecule (CEACAM) (Beauchemin *et al.*, 1999). La famille de l'ACE comprend 29 gènes, dont 18 sont exprimés, 7 appartenant au sous groupe de l'ACE et 11 au sous-groupe des glycoprotéines spécifiques.

L'expression de gène ACE donne des protéines ancrées à la membrane par un lien phosphatidyl inositol, les gènes de la famille ACE sont regroupés sur le bras long du chromosome 19, dans la région 19q13.1-19q13.3.



**Figure 13 :** Organisation génomique de gène ACE.( Létourneau et Beauchemin 1997)

5'NT: région 5' non traduite

L : région leader

N: région amino-terminale, analogue des domaines variables des immunoglobulines

An et Bn : domaines analogues des domaines constants des immunoglobulines

M : domaine permettant l'ancrage de la protéine à la membrane cellulaire par un lien lipidique,

ATG : codon initiateur

TGA : codon de terminaison

3'NT: région 3' non traduite

### 3.9. La protéine ACE :

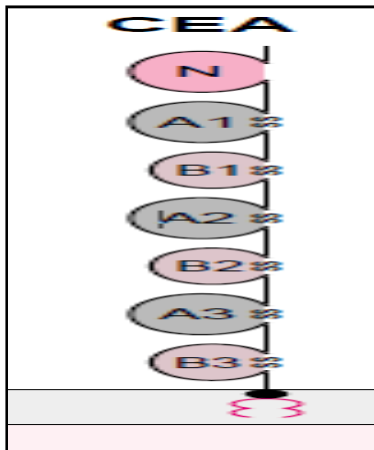
L'ACE est une glycoprotéine de poids moléculaire compris entre 180 et 200 KDa. Près de 60 % de son poids moléculaire est constitué d'hydrates de carbone. L'ACE appartient à la super famille des immunoglobulines dont plusieurs membres sont impliqués dans le processus d'adhérence et de reconnaissance intercellulaire cette protéine est synthétisée principalement dans certaines portions du tube digestif. On la retrouve à la surface apicale des cellules de l'épithélium de la langue, de la portion distale de l'oesophage, de l'estomac, de l'intestin grêle, du côlon et du rectum ( Nap *et al.*, 1988)

Chez l'adulte, l'ACE est synthétisé principalement dans certaines portions du tube digestif tel que la langue, l'oesophage distal, l'estomac, l'intestin grêle. Le colon et le rectum où il n'est présent qu'au pôle apical des cellules épithéliales.

Chez le fœtus, la synthèse est abondante au niveau du duodénum et du colon à partir de la 9<sup>ème</sup> semaine, à un stade où l'épithélium n'est pas encore stratifié, l'antigène est alors localisé sur toute la surface de la membrane cellulaire, la stratification de l'épithélium coïncidant avec la restriction de l'ACE au domaine apical de la cellule (Létourneau, 1997).

Dans le cancer du colon, le gène ACE est sur exprimé. Le gradient de sécrétion vers le pôle apical est perturbé et l'antigène carcino-embryonnaire est distribué sur toute la surface de la cellule et dans l'espace intercellulaire (Benchimol *et al.*, 1989 ;Jothy *et al.*, 1993).





**Figure 14:** Représentation schématique de la protéine ACE.( Létourneau et Beauchemin 1997)

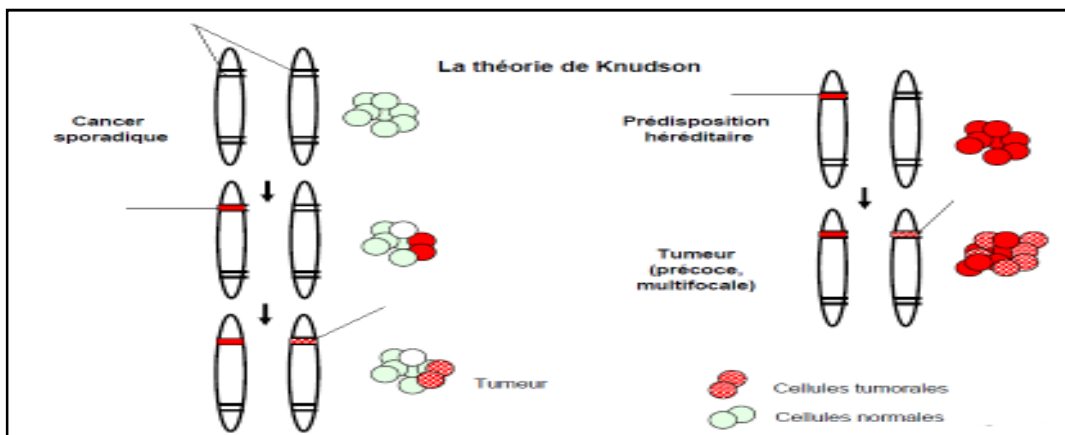
N : domaines immunoglobulines variable  
A, B : constants

### 3.10. Mutation du gène APC :

L'un des premiers événements dans l'oncogenèse colorectale est le plus souvent une mutation inhibant les fonctions du gène *APC* dont la pénétrance est proche de 100%. La perte de la fonctionnalité de la protéine *APC* est retrouvée dans les cas de cancers héréditaires ainsi que dans les cancers sporadiques.

Dans la PAF les mutations constitutionnelles (germinales) du gène *APC* sont héritées dans tous les tissus de l'organisme. Dans les cellules du colon, un second événement qui consiste en une mutation somatique du deuxième allèle inactive la protéine *APC* selon le modèle de Knudson du double événement mutationnel ou LOH (Knudson *et al.*, 1971) (figure 15).

Le GST *APC* code pour une protéine homodimérique et ne répond qu'imparfaitement au concept de Knudson et à l'activation des 2 copies du gène.



**Figure 15 :** Modèle du double événement mutationnel et de la perte de l'hétérozygotie de Knudson (Knudson *et al.*, 1971)

### 3.10.1. Mutations germinales :

Plus de 900 mutations différentes ont été recensées par la base de données HGMD (Chen *et al.*, 2011). La majorité des mutations germinales dans le gène *APC* sont des mutations tronquantes qui provoquent l'apparition d'un codon stop prématuré, les proportions des mutations germinales sont estimées à 46% pour les petites délétions, 10% pour les petites insertions, 28% pour les mutations non-sens, 13% pour les grands réarrangements génomiques et 3% pour les mutations faux sens (Hegde *et al.*, 2006).

Les mutations germinales siègent entre le codon 200 et le codon 1600, cependant 30% des mutations siègent entre les codons 1061 et 1309 (Fearnhead *et al.*, 2001). Dans de rares cas, nous pouvons retrouver des mutations au-delà du codon 1600.

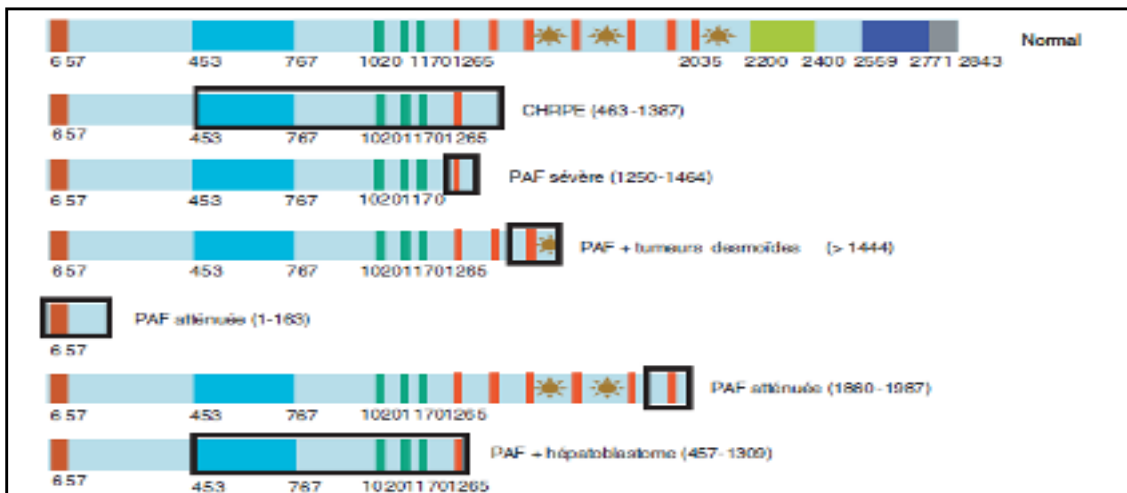
### 3.10.2. Mutations somatique :

Plus de 700 mutations somatiques ont été décrites à ce jour. La majorité des mutations somatiques (plus de 60%) dans le gène *APC* se produisent dans une petite région du gène entre les codons 1250 et 1550, cette zone a été appelée MCR (Mutation Cluster Région) (Fearnhead *et al.*, 2001). Dans cette région il y a deux hotspots situés au niveau des codons 1309 et 1450. Les mutations dans la région MCR sont associées à une perte allélique LOH alors que les mutations qui ne siègent pas dans la région MCR sont associées à des mutations tronquantes. Ces dernières regroupent la plupart des mutations somatiques : 62% sont des mutations frameshift et 34% des mutations non-sens (Fearnhead *et al.*, 2002). De plus des mutations ont été décrites au niveau du promoteur 1A du gène *APC*. Elles sont caractérisées par une hyperméthylation.

### 3.11. Corrélations génotype- phénotype :

Plusieurs études ont montré une corrélation entre une mutation spécifique du gène *APC* et l'expression phénotypique qui lui est associée.

Pour la PAF sévère, elle est située entre les codons 1250 et 1464 et est associée à une forme profuse caractérisée par l'apparition précoce d'adénomes colorectaux et duodénaux et une évolution rapidement défavorable (particulièrement sur le codon 1309), la présence d'un phénotype atténué est liée à l'existence de mutations aux extrémités 3' et 5' du gène *APC* au niveau des codons 1 et 163 et les codons 1860 et 1987 ; celles les lésions rétiniennes CHRPE (hypertrophie congénitale de l'épithélium pigmentaire de la rétine), entre les codons 463 et 1387; les mutations siégeant au-delà du codon 1444 sont systématiquement associées au développement précoce de tumeurs desmoides (Karoui *et al.*, 2007). (figure 16). En général le phénotype et donc la sévérité de la maladie varient en fonction du siège précis de la mutation causale (Half *et al.*, 2009).



**Figure 16 :** Corrélation entre la position des mutations du gène APC et les manifestations phénotypiques de la PAF (Karoui *et al.*, 2007).

### 3.12. Dépistage :

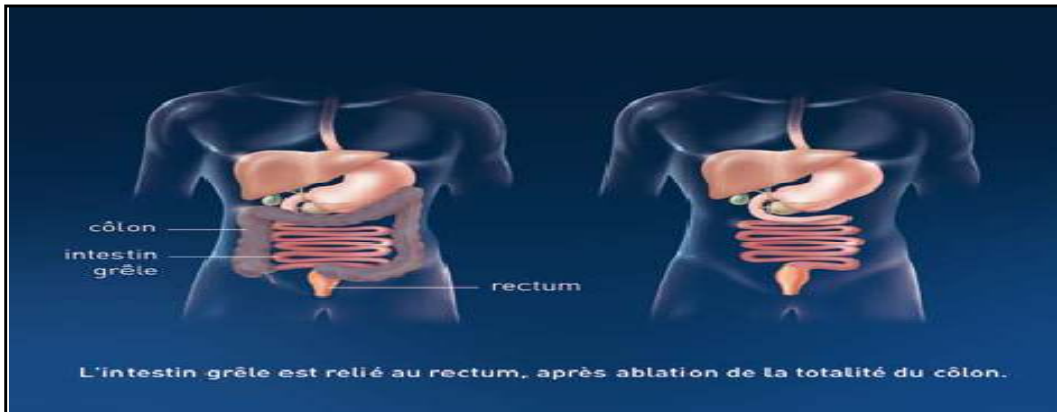
- **Tests génétiques :** une fois le diagnostic clinique de la PAF solidement établi, les patients atteints de PAF doivent passer par une consultation d'oncogénétique débutant par une anamnèse. Cette dernière est suivie par des tests génétiques qui consistent en un séquençage automatique de Sanger, afin d'identifier le type de mutations en cause au niveau de l'exon 15 du gène APC dans le cas de la PAF classique (et les exons de 1 à 14 pour la APAF). Le test génétique peut vous être proposé dans deux situations : vous êtes la première personne de votre famille à développer une polypose ou la première personne atteinte à faire le test, vous êtes à risque et la mutation génétique responsable de la maladie a déjà été identifiée dans votre famille (Ferron *et al.*, 2005).
- L'enquête familiale permet de dresser un arbre généalogique. Un conseil génétique peut ensuite être donné aux membres de la famille. L'analyse génétique par un médecin spécialisé en génétique moléculaire permet de déterminer, à partir de prélèvements sanguins chez les différents membres de la famille, si la personne à risque a hérité de l'anomalie génétique associée à la maladie. Cet examen fournit une information qui oriente le médecin dans la prise en charge des personnes ayant l'altération génétique (Olschwang *et al.*, 1999).

## 4. Thérapeutique de la FAP:

### 4.1 Chirurgie prophylactique :

Du fait du risque de dégénérescence élevé des polypes coliques, il est recommandé de réaliser une colectomie prophylactique. Deux techniques chirurgicales sont envisagées : la colectomie avec anastomose iléo rectale (AIR) (figure 17) et la coloproctectomie totale avec

anastomose iléo anale (AIA) (figure 18). Le risque de l'AIR est de voir se développer de nouveaux adénomes sur la muqueuses rectale laissée en place (pommaret 2009).



**Figure17 :** Schéma représente montage chirurgicale lors des colectomies : Anastomose iléo-rectale ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).



**Figure 18 :** Schéma représente montage chirurgicale lors des colectomies : Anastomose iléo-anale ([www.e-cancer.fr](http://www.e-cancer.fr)).

#### 4.2. Chimio-prévention :

La chimio-prévention du cancer utilise des agents chimiques pour inverser, supprimer ou empêcher soit la phase initiale de la cancérogenèse soit la progression des cellules néoplasiques vers un cancer.

Les anti-inflammatoires non-stéroïdiens (AINS) et les dérivés vitaminiques constitueraient des anticancéreux ciblant efficacement la voie Wnt. Parmi les AINS, le sulindac et le célécoxib réduiraient sensiblement les niveaux de la  $\beta$ -caténine nucléaire chez les patients atteints de PAF et diminution du nombre et de la taille des polypes (Robert *et al.*, 2003).

Parmi les dérivés vitaminiques, se trouvent la vitamine D et ses dérivés (EB1089) dont on sait qu'ils interagissent avec des récepteurs nucléaires des rétinoïdes. Ces récepteurs interagissent également avec la  $\beta$ -caténine en compétition avec les facteurs Tcf (Akhter *et al.*, 1997). Un traitement par ces rétinoïdes induit la formation d'un complexe qui se lie à la  $\beta$ -caténine, ce qui a pour effet de réduire son taux dans le noyau.

#### 4.3.Stratégies immunologiques et génétiques :

Face aux substances chimiopréventives, d'autres voies thérapeutiques visant à bloquer le processus de carcinogenèse ont été mises en place in vitro et sur des modèles animaux :

- **Les anticorps monoclonaux** : visent à inhiber la voie Wnt (Ac anti-Wnt)(Rhee *et al.*, 2002) et à rompre artificiellement l'interaction  $\beta$ -caténine Tcf dans des cellules cancéreuses (pour bloquer l'activation des proto-oncogènes (Van *et al.*, 2002) afin de stopper la prolifération cellulaire et induire l'apoptose des cellules tumorales.
- **La thérapie génique** : vise à utiliser des virus modifiés ciblant les cellules cancéreuses et induisant leur apoptose (Lipinski *et al.*, 2004). Une autre approche a pour but d'utiliser des adénovirus oncolytiques afin qu'ils détruisent les cellules cancéreuses coliques par cytotoxicité en s'y repliquant.
- **Manipulations génétiques** : visent à utiliser des ARN anti-sens pour réduire l'expression des gènes cibles de la voie Wnt tels que le gène c-MYC, supprimant ainsi la croissance de cellules cancéreuses (Jvesen *et al.*, 2003).

## **Matériel et Méthodes :**

Notre étude est réalisée au sein du laboratoire d'anatomie-pathologique du C.H.U. MUSTAPHA Bacha durant deux mois, la période choisie de l'étude rétrospective concernait les quatre dernières années. Ce travail touche 11 patients est basé sur :

- ❖ Enquête génétique (Annexe 1).
- ❖ Etude anatomoclinique.
- ❖ Etude histopathologique.
- ❖ Etude immunohistochimique.

### **1. Matériel :**

#### **1.1. Patients :**

Parmi les cas étudiés, nous avons sélectionné 2 familles originaires de 2 différentes wilayas de notre pays, une famille de Blida originaire de Médéa et l'autre originaire de Mila, à partir de l'étude rétrospective de leurs dossiers médicaux.

#### **1.2. Matériel biologique :**

Notre étude est effectuée à partir des blocs de paraffine archivés comportant des fragments de pièces opératoires ou des fragments biopsique. Les fiches des patients sont le support des renseignements cliniques.

#### **1.3. Matériel non biologique :** Appareillage et réactifs (Voir annexe 2)

### **2. Méthodes :**

#### **2.1. Pedigrees :**

Un arbre généalogique est tracé pour chaque famille à partir des questions au patient relatives à ses antécédents personnels et familiaux (au moins trois générations), l'âge auquel ils ont été diagnostiqués et la présence ou non de cancers associés permettant ainsi de dénombrer les parents affectés et les membres de la famille qui sont atteints par la pathologie.

L'intérêt de l'enquête familiale est qu'elle permet à partir d'un cas index de pouvoir identifier dans sa famille les sujets chez qui l'affection peut être présente.

#### **2.2. Etude anatomoclinique :**

L'étude anatomo-clinique est établie à partir des fiches des malades accompagnants leurs prélèvements et enregistrés et archivés au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique.

Les paramètres étudiés sont :

- ❖ Le sexe du malade
- ❖ L'âge du malade

- ❖ Nombre des polypes

### 2.3. Etude histopathologique :

#### 2.3.1. Préparation des coupes

##### A. Fixation

La fixation des prélèvements se fait dans une solution de formol (10 %), et a pour but de s'opposer à la déshydratation prématurée des cellules et surtout à la décomposition des tissus.

##### B. Déshydratation

La déshydratation comprend trois étapes :

- **Déshydratation** proprement dite qui consiste à chasser l'eau qui existe dans le tissu par passage des cassettes d'échantillons dans des bains d'alcool éthylique à des degrés croissants jusqu'à l'alcool absolu (huit bains d'alcool) pendant 2h pour chaque bain à température ambiante dans un circulateur (Leica) qui est muni d'un système d'agitation facilitant la pénétration de l'alcool dans le tissu.
- **Clarification ou éclaircissement** qui consiste à éliminer l'alcool utilisée dans la déshydratation par un solvant organique, le xylène (C<sub>8</sub>H<sub>10</sub>) qui est miscible à l'alcool absolu et à la paraffine (2 bains/ 2h chacun) préparant ainsi le tissu à l'imprégnation. Le xylène rend le tissu translucide et facilite la pénétration de la paraffine à l'intérieur du fragment déshydraté.
- **Imprégnation** consiste à remplacer l'eau des tissus et ceci pour pouvoir confectionner des coupes très minces et c'est la dernière étape qui aboutit à la substitution du xylène par la paraffine liquide (point de fusion 56°C) qui remplace l'eau qui a été éliminée des tissus (2 bains/ 2h chacun).

##### C. Inclusion (Enrobage)

L'échantillon est alors immergé dans de la paraffine chauffée à une température dépassant juste son point de fusion, dans des moules afin d'obtenir des blocs de paraffine. Une fois l'échantillon bien imprégné, nous le laissons refroidir.

##### D. Réalisation des coupes

A partir des blocs obtenus, des coupes de 3 µm sont réalisées à l'aide d'un microtome.

##### E. Etalement

Sur une lame, nous posons une image du ruban après avoir versé quelques gouttes d'eau afin d'éviter la formation des plis. La lame sera mise sur une plaque chauffante afin de faire ramollir la paraffine. Ceci permettra la fixation du tissu sur la lame. Les lames seront séchées puis préparées à la coloration.

### 2.3.2. Coloration

#### A. Préparation à la coloration

Les lames destinées à l'étude histologique sont mises dans une étuve à 58°C pendant 20 à 30 min ce qui permettra le déparaffinage de l'échantillon, donc l'élimination totale de la paraffine et fixation du tissu sur la lame. Cette étape est suivie de la réhydratation des échantillons par la mise en succession des lames dans 3 bains de xylène 5 min pour chacun. Le passage de l'étuve au xylène doit être rapide pour éviter le séchage du tissu. Ensuite, nous effectuons un passage des lames dans des bains d'alcool à concentration décroissantes : 100%, 90%, 70% ; de 5 min chacun.

Enfin, vient l'étape de blanchissement des lames à l'eau courante afin d'éliminer toutes traces d'alcool et de permettre la réhydratation du tissu.

Le but de cette étape est l'élimination totale de la paraffine des tissus, étant solides deviennent mous à nouveau et accessibles à l'eau grâce à l'alcool qui permet la réhydratation des tissus qui retrouvent leurs états physiologiques initiaux en récupérant l'eau contenue dans leurs structures et sont ainsi prêts pour la coloration.

#### B. Coloration à l'Hématoxyline-Eosine (HE)

C'est une technique dite coloration de routine ou de base qui permet la structuration du tissu et de ces constituants cellulaires. Elle donne une coloration bleue aux noyaux et rose aux cytoplasmes (voire annexes 2).

### 2.4. Etude immunohistochimique :

La technique immunohistochimique permet de localiser des antigènes dans des tissus, cellules. Le réactif principal est un anticorps dirigé contre l'antigène à marquer ; des traceurs (molécules fluorescentes, enzymes ) fixés directement ou indirectement sur l'anticorps permettent de visualiser la réaction.

La méthode streptavidine-peroxydase ; elle consiste à mettre en évidence un antigène grâce à la fixation d'un anticorps primaire puis celle d'un anticorps secondaire biotinylé.

Notre étude immunohistochimique consiste à visualiser l'expression de la protéine  $\beta$ -caténine, ACE (antigène carcino-embryonnaire) et P53 chez des malades atteints de polypose adénomateuse familiale.

#### 2.4.1. Principes de la procédure :

Pour mettre en évidence l'expression de la  $\beta$ -caténine, ACE et P53 nous avons choisi un modèle opératoire basé sur une méthode indirecte complexe Peroxydase-Anti-Peroxydase (PAP), qui consiste en l'amplification du marquage par un système de révélation qui peut fixer deux molécules de chromogènes. Ceci permet une meilleure visualisation des complexes Antigène (Ag)-Anticorps (Ac) qui sont invisibles naturellement. Ce système est constitué d'un deuxième Ac biotinylé lié à une molécule porteuse d'une enzyme qui est la streptavidine peroxydase, qui est de son tour peut relier deux molécules de chromogènes diabenzidine (DAB) qui représente le substrat. Une coloration brunâtre vue sous



microscope est dégagée par la réaction entre l'enzyme et le substrat (Frédérique *et al.*, 2000).

#### **2.4.2. Mode opératoire** (voire annexes 2).

##### **A. Déparaffinage et réhydratation**

Les rubans sont étalés dans un bain-marie contenant de l'eau distillée et sont ensuite recueillis sur des lames silanisées. La particularité de ces lames est le fait qu'elles soient recouvertes de silane qui est une sorte de colle, ce qui empêche le décollement des tissus lors du prétraitement créant ainsi des liaisons hydrophobes entre le tissu et la lame. Les lames sont ensuite mises dans une étuve à 90° pendant une nuit pour faire fondre la paraffine puis placées dans 3 bains de xylène pendant 5mn chacun pour éliminer toute trace de paraffine qui se trouve encore dans l'échantillon. Par la suite on fait passer les lames dans 3 bains d'alcool à concentration décroissante (100%-90%-70%) de 5mn chacun afin de réhydrater le tissu sans pour autant créer un choc. Enfin pour le blanchissement, les lames sont mises dans de l'eau distillée.

##### **B. Démasquage antigénique**

Le démasquage antigénique sert à augmenter l'affinité de l'anticorps envers son antigène en utilisant une solution de démasquage « Target Retrieval Solution » (TRS) appliquée sur les lames. Ces dernières sont ensuite mise dans l'incubation à 95° pendant 40mn, après refroidies sur la paillasse pendant 20 mn puis transférées dans un bain d'eau distillée deux fois (2x5 mn) et enfin lavées dans du « Tris Buffered Saline » (TBS) pendant 5mn.

##### **C. Immunomarquage**

L'immunomarquage est une étape qui sert à marquer un antigène recherché par l'utilisation d'un anticorps primaire dirigé contre cet antigène et un anticorps secondaire dirigé contre le premier anticorps et qui est couplé à un révélateur. Les coupes sont cerclées avec un marqueur DAKO PEN afin que les anticorps restent concentrer sur l'échantillon du fait que ce marqueur créé un milieu hydrophobe pour le réactif. Les peroxydases endogènes sont bloquées avec une quantité suffisante d'eau oxygénée (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) qui recouvre le tissu pendant 5mn afin de libérer les sites antigéniques, puis les lames sont rincées en eau distillée. Les lames sont par la suite placées dans un bain de TBS propre. Nous procédons alors à une incubation des lames en présence du 1<sup>er</sup> anticorps de 30 mn à 4°C suivie d'un rinçage au TBS et d'un bain de TBS propre. Les lames sont de nouveaux incubées pendant 1h à 4°C en présence d'un 2<sup>ème</sup> anticorps puis rincées au TBS.

##### **D. Révélation**

La révélation permet la mise en évidence du marquage par une coloration marron. Nous appliquons quelques gouttes de la solution DAB+Chromogene pendant 30 mn sur les coupes.

##### **E. Contre coloration et montage**

La contre coloration sert à mettre en évidence les noyaux en leur donnant une coloration bleue par immersion des lames dans une solution d'hématoxyline de Mayer pendant 5mn puis les lames sont parfaitement rincées dans un bain d'eau courante puis trempées dans un bain d'ammoniaque afin d'éliminer l'excès de l'hématoxyline. Les lames sont finalement rincées avec de l'eau distillée puis bien séchées avant de pratiquer le montage grâce à un milieu de montage aqueux (Eukitt Faramount).

L'interprétation des lames d'histologie et d'immunohistochimie a été réalisée par Pr Ait-Younès.

**Symboles utilisés pour la réalisation des pedigrees :**

○ Femme saine

□ Homme sain

● Femme atteinte de PAF

■ Homme atteint de PAF

∅ Femme décédée

◻ Homme décédé

○ Tumeur cérébrale

◻ Cancer de la prostate

■ Cancer du colon

↑ Cas index

○ ○ Jumelles dizygotes

■ Infarctus du myocarde (IDM)

**Y** : Age actuel du patient.

**dx** : Age du patient au diagnostic.

**dd** : Age au moment du décès.

## 1. Résultats :

### 1.1. Analyse des pedigrees :

Nous avons établi les pedigrees de 2 familles avec une histoire héréditaire de Polypose Adénomateuse Familiale. L'analyse des pedigrees montre que la maladie se transmet dans les deux sexes selon les lois mendéliennes. L'un des deux familles présente une forte histoire de PAF et l'autre présente des antécédents de différents types de cancer.

#### La famille F1 :

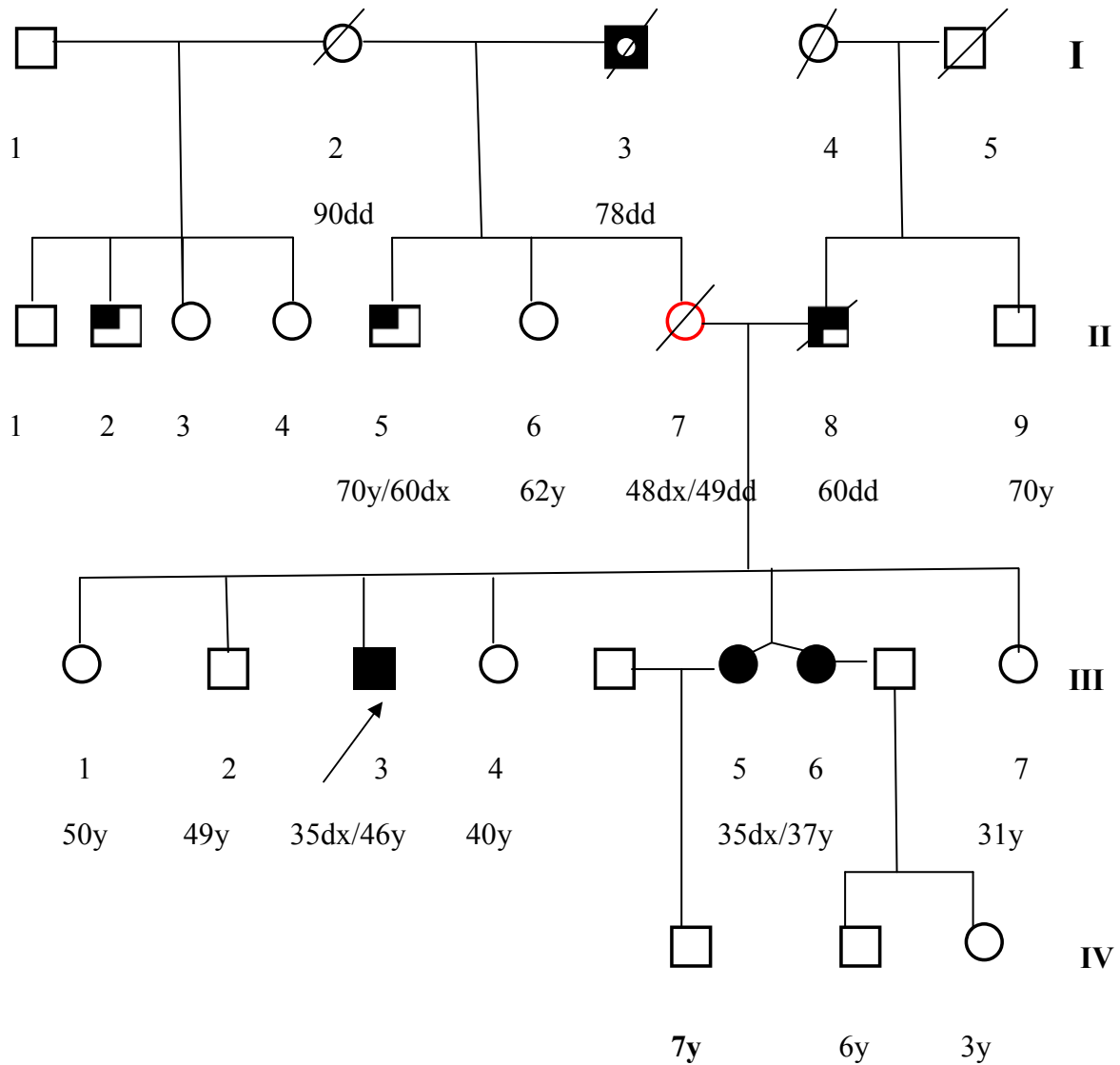
Le cas index (III3 sur le pedigree) a été diagnostiqué porteur d'une PAF à l'âge de 35 ans à la suite de symptômes à type de rectorragies et a subi pour cela une hémicolectomie. Le retour des symptômes à l'âge de 45 ans l'a amené à reconsulter et subir une colectomie totale en Mars 2012. Le diagnostic de PAF atténuée a été retenu du fait du nombre de polypes inférieur à 100.

Le cas index est le premier atteint de PAF dans sa fratrie dans laquelle nous retrouvons des jumelles dizygotiques (III5 et III6) atteintes également de PAF diagnostiquées à 35 ans, l'une d'elles (III5) a bénéficié d'une colectomie préventive.

La mère du cas index (II7) est décédée après avoir développé une tumeur cérébrale à l'âge de 48 ans, Le père décédé par Infarctus du myocarde (IDM) le frère aîné (II5) et son demi-frère (côté maternel) ont développé un cancer de la prostate. Ce n'est qu'à la génération I que nous retrouvons un cas de CCR présenté par le grand père maternel du cas index (I3),

Malgré l'absence de cas apparents de PAF au sein de la génération II et le manque d'informations concernant la mère du cas index (II7), la présence d'une

tumeur cérébrale chez cette dernière nous laisse suggérer que nous sommes en présence d'un Syndrome de Turcot associé à une PAF atténuée.



**Figure 19 :** Arbre généalogique de la famille F1.

**La famille F2 :**

Le cas index (IV3 sur le pedigree) a été diagnostiqué porteur de PAF à l'âge de 25 ans (2011) suite à des symptômes à type de douleurs abdominales et constipation ; elle a subi une colectomie totale préventive durant la même année. Elle appartient à une famille avec une forte histoire familiale de cancers colorectaux familiaux.

La transmission de la maladie se fait sans interruption sur 4 générations :

Dans la fraterie du cas index, on retrouve un frère( aîné) âgé de 31 ans (IV1) qui est atteint de PAF.

la mère du cas index (III6) est décédée suite à un cancer colique ;

Trois oncles maternels sont également porteurs de la PAF : l'oncle (III1) âgé de 75 ans ; l'oncle (III2) décédé à l'âge de 40 ans suite à un cancer colique et l'oncle (III3)

La maladie est héritée du côté maternel. Ceci est confirmé par le fait que le grand père maternel soit atteint de cancer du colon, ce dernier a hérité le gène muté par son père (I1) lui-même décédé suite à un cancer colique.

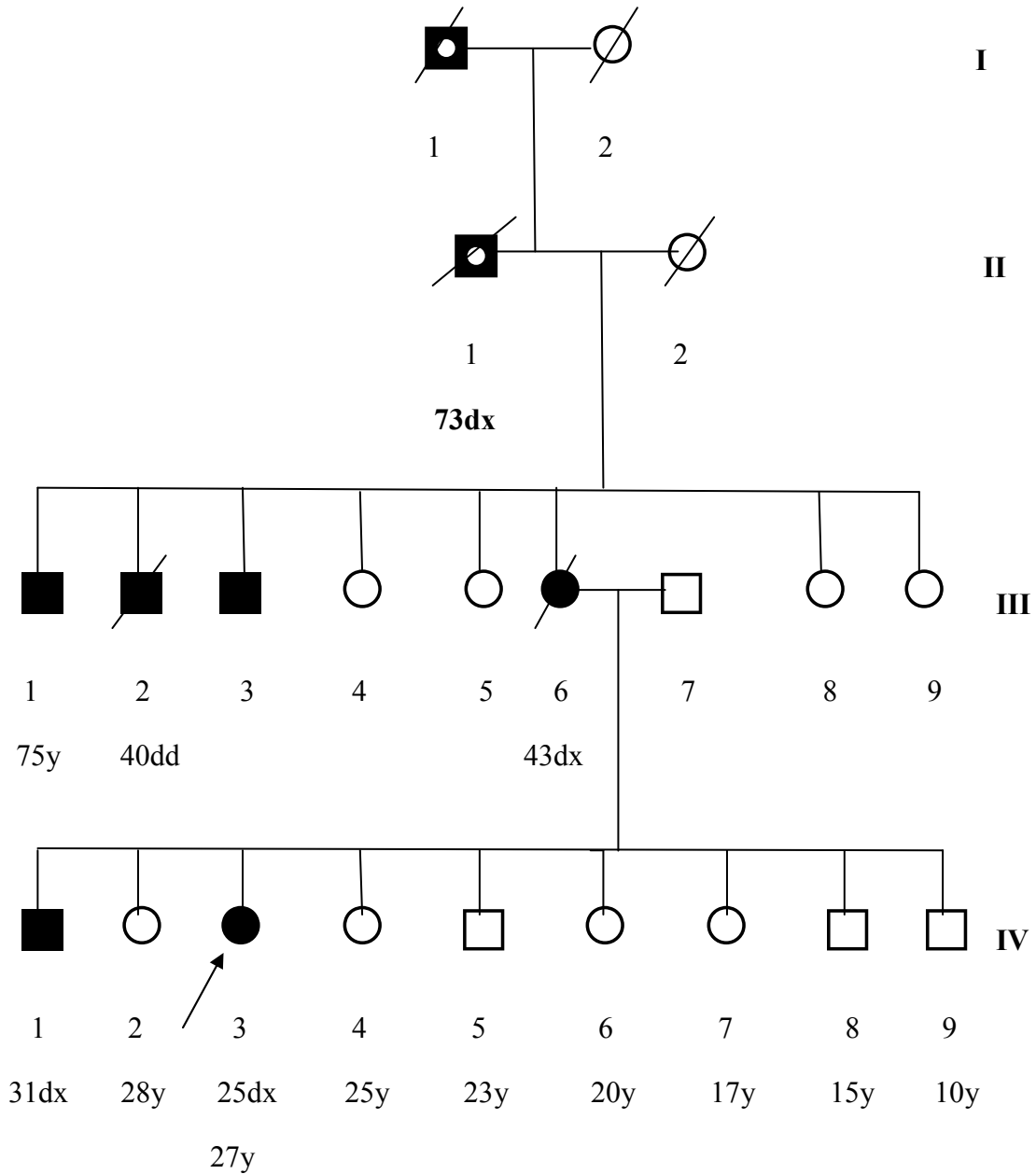


Figure 20 : Arbre généalogique de la famille F2.

**1.2. Etude anatomoclinique :**

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'Anatomopathologie de CHU MUSTAPHA Bacha. Nous avons recensé tous les cas de PAF colligés durant une période de 4 ans (2009 -2013)

Notre étude a porté sur 11 patients qui représentent la totalité des dossiers médicaux retrouvés entre 2009 et Aout 2013. Ces patients ont été hospitalisés dans le service de chirurgie générale et/ou dans le service Gastro-Entérologie du CHU Mustapha.

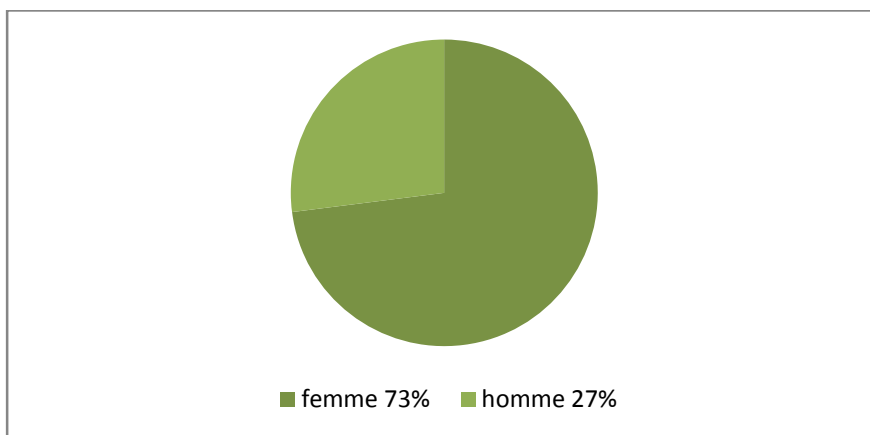


### 1.2.1. Répartition des PAF selon le sexe :

La PAF touche les 2 sexes

Sexe masculin : 3 patients / 11.

Sexe féminin : 8 patients /11.



**Figure 21 :** Répartition des PAF selon le sexe

Les résultats obtenus à partir de la figure montrent que le nombre des femmes est trois fois supérieure au nombre des hommes. La majorité se sont des femmes (3 femme pour un homme).

**Tableau II :** Moyen d'âge des patients

	Moyenne d'âge (ans)
<b>Homme</b>	45
<b>Femme</b>	34

La maladie s'observe entre 25 et 66 ans chez l'homme, avec un moyenne d'âge se situant à 45 ans pour l'homme. Et elle s'observe pour la femme, entre 18 et 52 ans avec un maximum de fréquence entre 30 et 40 ans, et une moyenne d'âge de 34 ans.

**Tableau III :** Répartition des cas selon la forme de PAF :

Le nombre de PAF	11
<b>PAF classique</b>	8
<b>PAF atténuée</b>	3

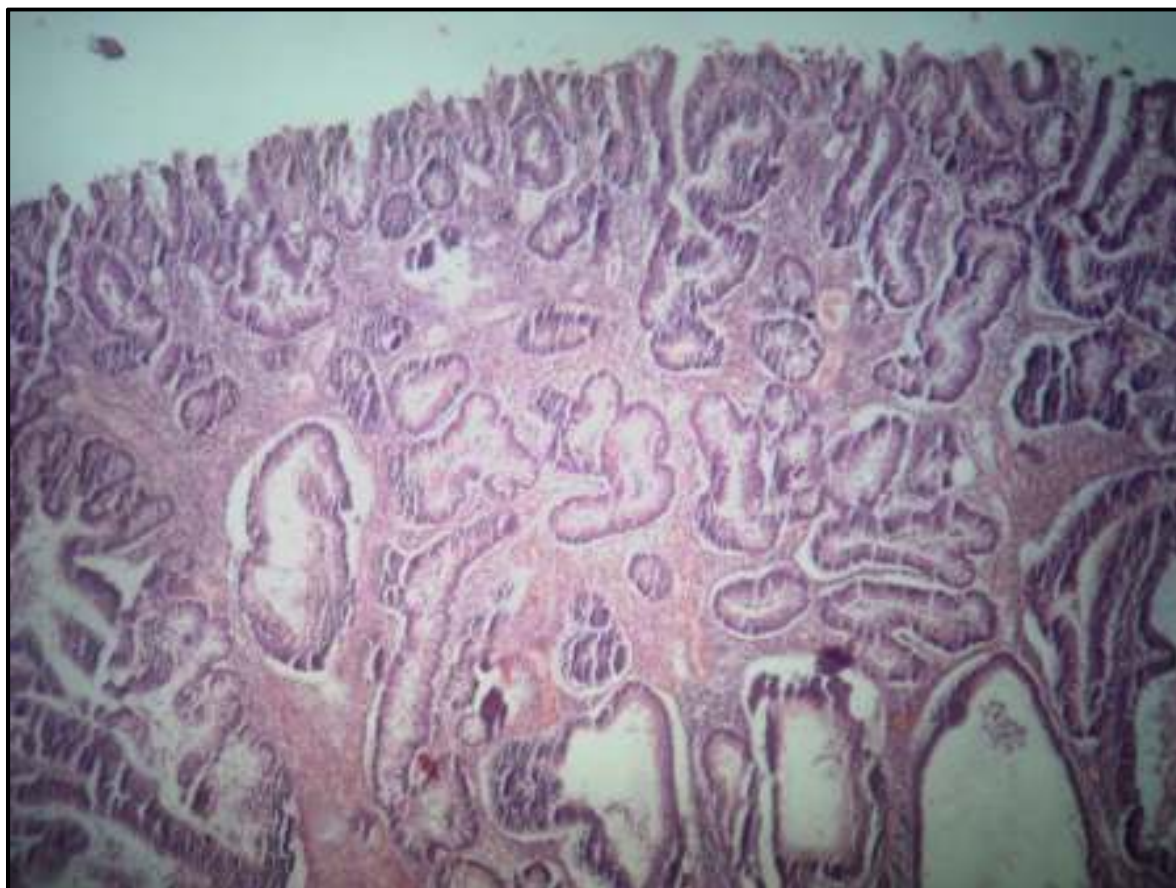
Parmi 11 patients traités pour PAF dans notre étude de 2009 à 2013 âgés plus de 18 ans, 8 entraient dans le cadre d'une PAF classique et 3 entraient dans le cadre de PAF atténuée. on a classée ces cas selon le nombre des polypes.



**1.3. Etude histopathologique :**

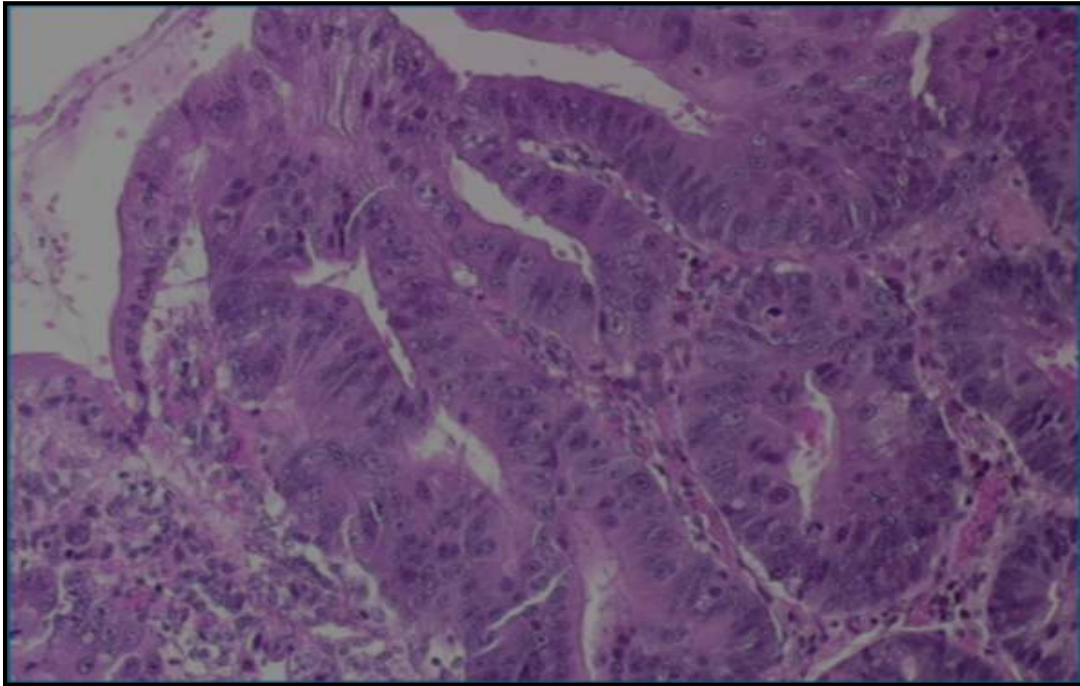
**Tableau IV :** Répartition des adénomes (polype) selon le type histologique et degré de dysplasie

Type histologique	Nombre des cas	Dysplasie
Adénome tubuleux	4	Bas grade (légère)
Adénome tubulo-villeux	3	Haut grade (Sévère)



**Figure 22: photo originale, coloration HE, Gr x250**

Adénome tubuleux : nombreuses glandes revêtues par un épithélium siège d'une dysplasie de bas grade.



**Figure 23 : photo originale, coloration HE, Gr x400**

Adénome tubuleux avec lésions de dysplasie de haut grade ; l'épithélium est pluri-stratifié siège d'atypies et de mitoses arrivant au 1/3 supérieur du pôle de la cellule.



**Figure 24: photo originale, coloration HE, Gr x400**

Adénome tubulo-villeux avec lésions de dysplasie de bas grade : structures tubuleuses et vilieuses tapissées par un épithélium montrant des signes de dysplasie de bas grade.

### 1.3.1. Répartition des adénocarcinomes selon le degré de différenciation :

Parmi les 11 patients, 5 ont développé des cancers à type d'adénocarcinomes colorectaux, leurs âges varient de 25 à 52 ans avec une moyenne de 36 ans.

Les adénocarcinomes représentent un pourcentage de 45% des cas de PAF ; et ces derniers se répartissent en trois types selon leurs degrés de différenciation.

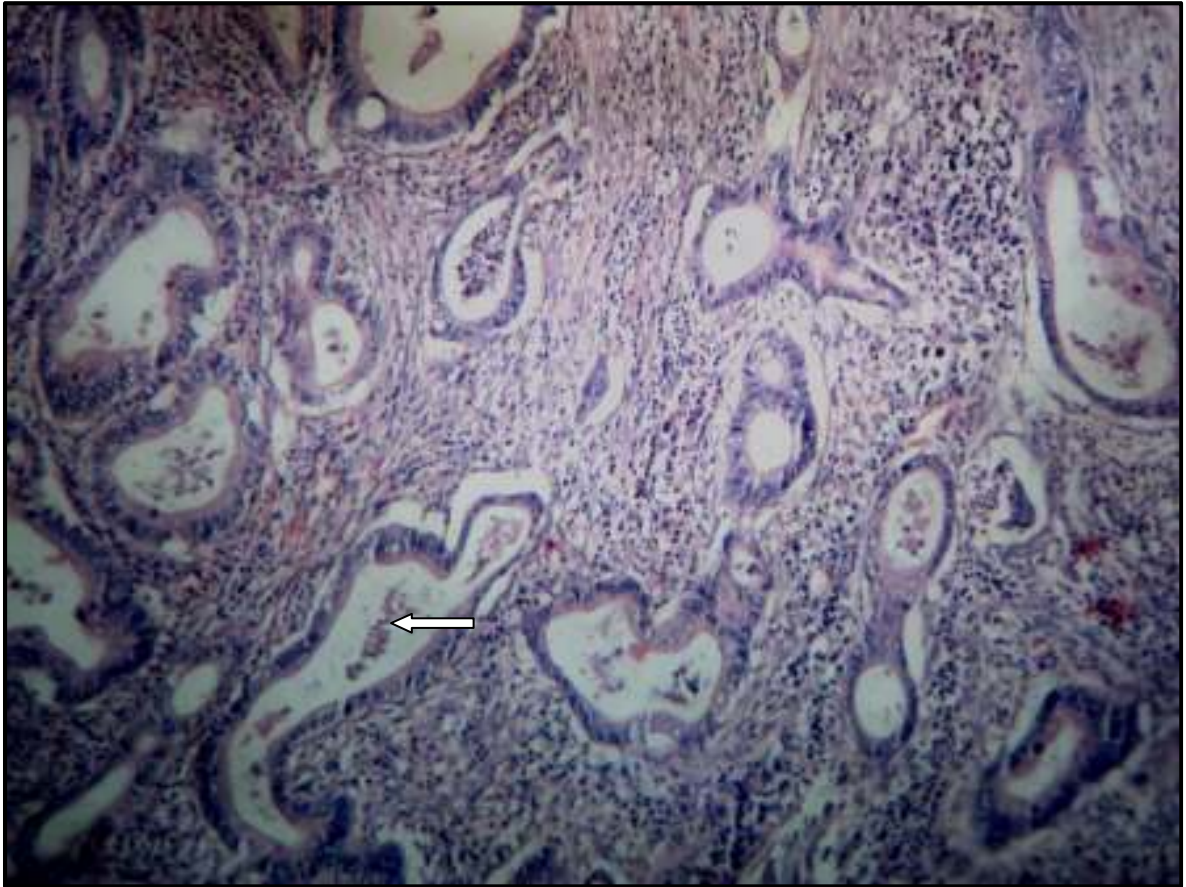
**Tableau V** : Répartition des ADK selon le degré de différenciation.

Type histologique des ADK	Nombre des cas
<b>ADK peu différencié</b>	1
<b>ADK moyennement différencié</b>	1
<b>ADK bien différencié</b>	3



**Figure 25** : Répartition des ADK selon le type histologique

La figure montre que les ADK bien différenciés sont prédominants et constituent 3/5 des cas ; et les ADK moyennement différenciés et les ADK peu différenciés représentent chacun 1/5 des cas des CCR.



**Figure 26 : photo originale, coloration HE, Gr x100.**

Adénocarcinome bien différencié développé sur polype dysplasique ; structures glandulaires tortueuses revêtues par un épithélium atypique, présence de nécrose dans la lumière.

#### 1.4. Etude immunohistochimique :

La technique d'HIC a été réalisée au sein du service d'anatomie-pathologie, sur des prélèvements de PAF.

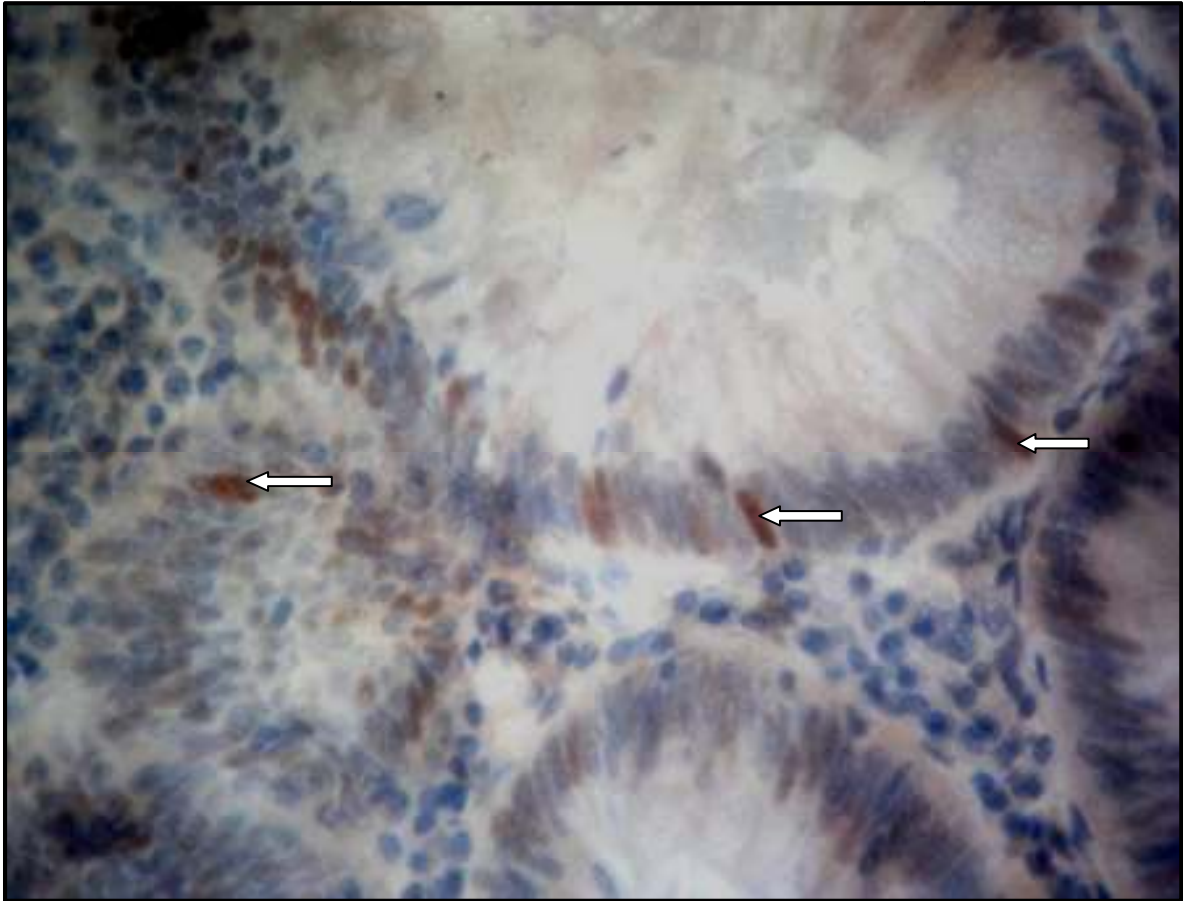
Les marqueurs qui ont été utilisés : la  $\beta$ -caténine, ACE et P53.

##### 1.4.1. Immunomarquage $\beta$ -caténine :



**Figure 27 :** Répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps  $\beta$ -caténine .

La figure représente une répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps anti  $\beta$ -caténine. On enregistre une positivité marquée avec 50% des cas (pour un cas positivité membranaire et nucléaire et 2 cas représente une positivité membranaire), une faible positivité dans 17% des cas, et 33% des cas sont des PAF qui n'ont pas pré l'immunomarquage, il n'ont pas été marquée.



**Figure 28 : photo original ; (Gr x400) IHC à l'anticorps anti  $\beta$ -caténine.**

Positivité nucléaire modérée à la  $\beta$ -caténine au niveau de quelques noyaux témoignant de la mutation.

#### 1.4.2. Immunomarquage ACE :



**Figure 29 : Répartition des PAF selon l'immunomarquage à l'anticorps ACE**

La figure représente les différents types de marquage à l'anticorps anti ACE. On retrouve une positivité marquée dans 33% des cas.

Une faible positivité est enregistrée dans 22% des cas, et 45% des cas sont des PAF qui sont négatifs.



**Figure 30 : photo originale ; (Gr x250) IHC à l'anticorps anti ACE.**

Marquage cytoplasmique et membranaire à l'ACE dans un adénome tubuleux avec dysplasie de bas grade.

#### **1.4.3. Immunomarquage P53 :**

Sur une série de 9 patients, 8 cas (89%) présentent une négativité de l'immunomarquage ; un seul cas (11%) présente une positivité marquée à l'anticorps anti P53 ( figure 31)

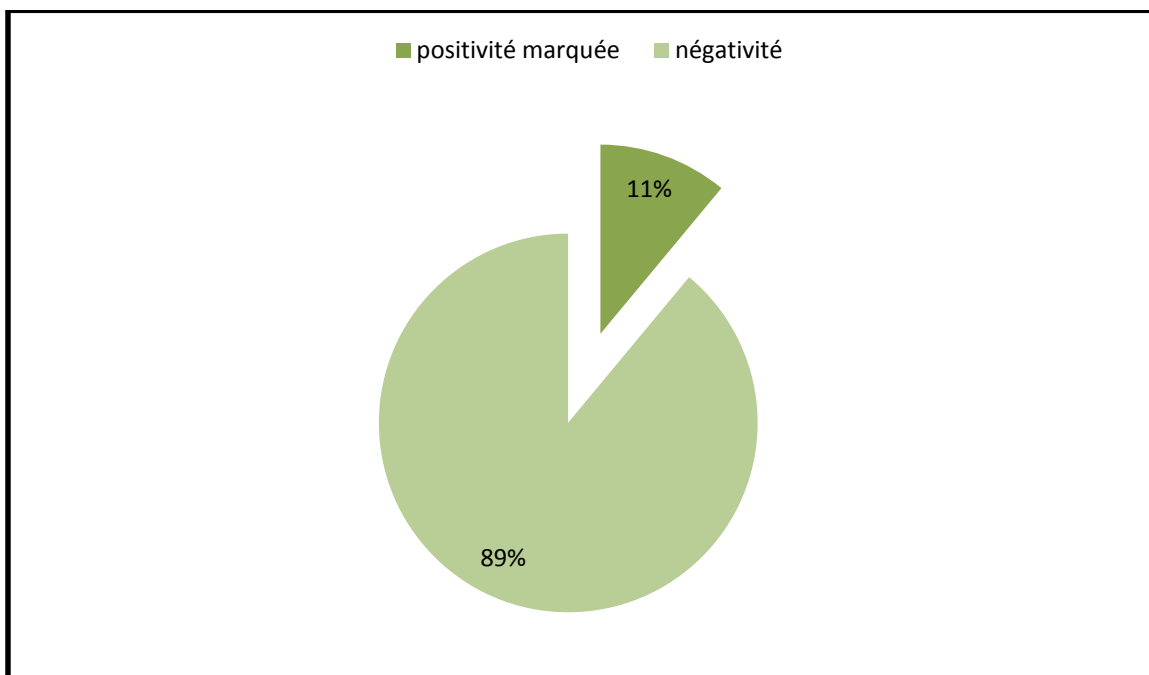


Figure 31 : Répartition des PAF selon l’immunomarquage à l’anticorps

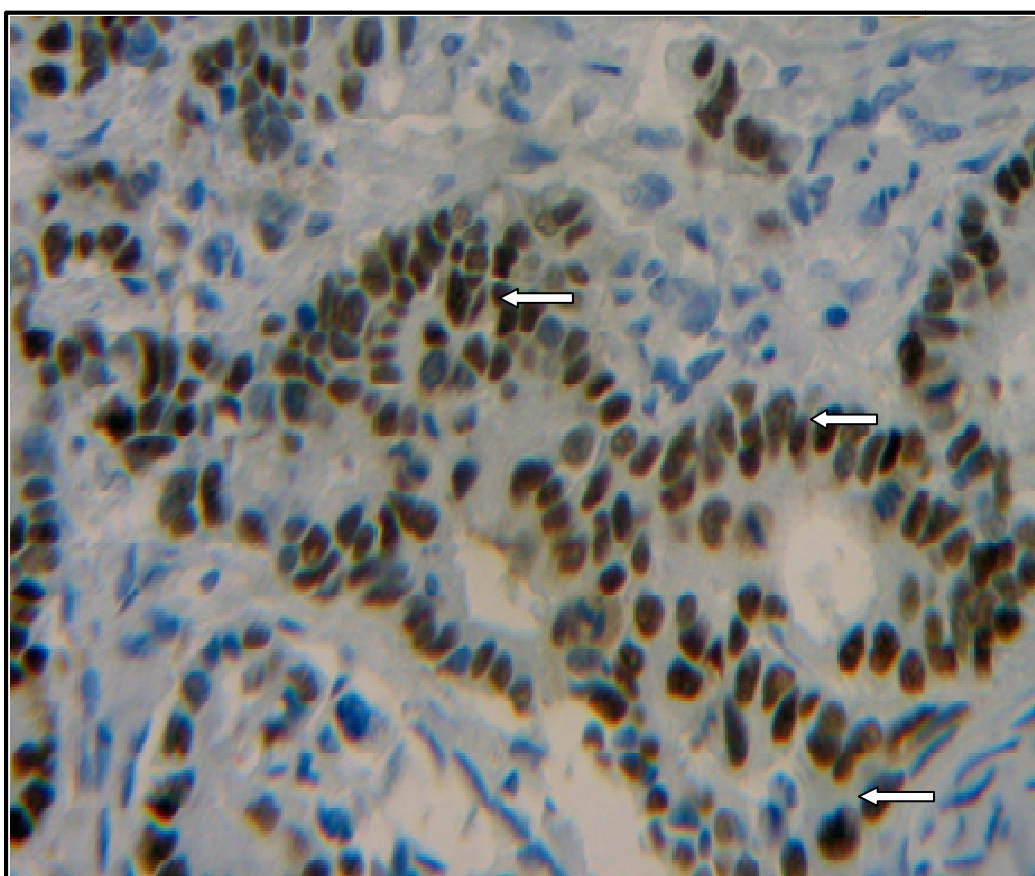
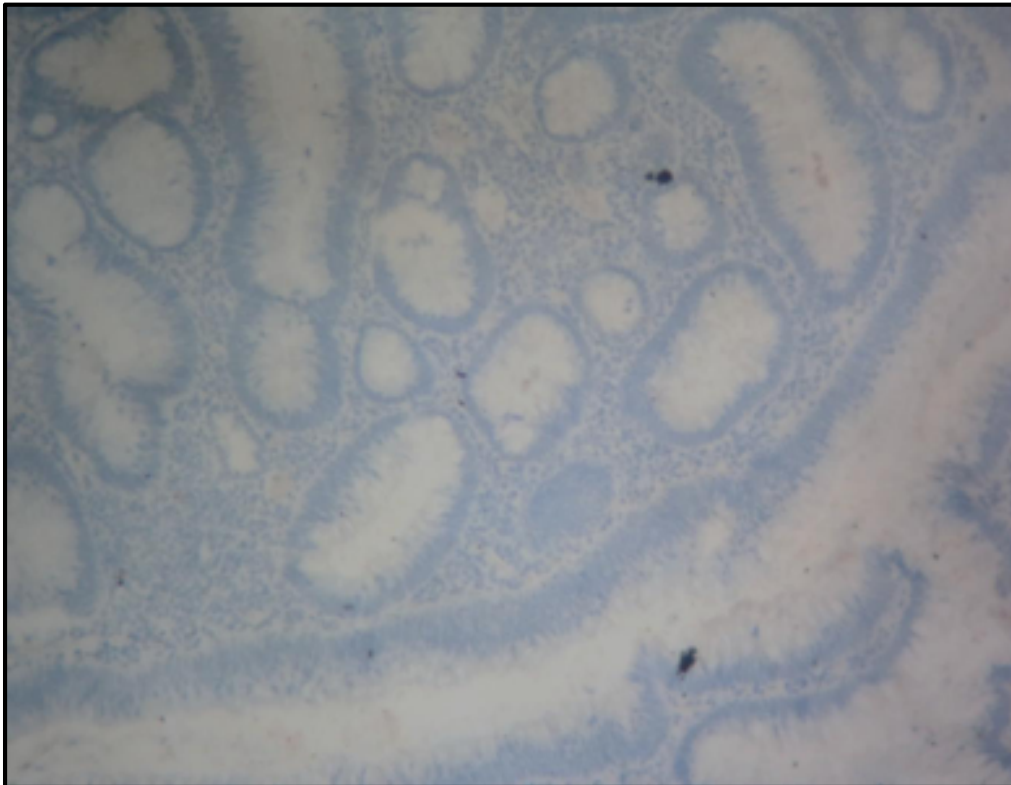


Figure 32: photo originale ; (Gr x200) IHC à l’anticorps anti P53.



Positivité nucléaire intense à la P53 dans un adénocarcinome bien différencié développé sur polype dysplasique.



**Figure 33 : photo originale ; (Gr x200) IHC à l'anticorps anti P53.**

Immunomarquage négatif : absence d'expression des cellules à la P53 dans un adénome tubuleux avec dysplasie de bas grade

## **2. Discussion :**

Le cancer colorectal est le 3<sup>ème</sup> cancer le plus diagnostiqué dans le monde. Son incidence varie considérablement entre les pays en voie de développement (Afrique et Asie) et les pays développés, ou elle est la plus élevée (Amérique du Nord, Australie et Europe Centrale/Ouest) (Jemal *et al.*, 2011).

La forte incidence du CCR dans les pays développés s'explique par une prédominance des facteurs de risque tels que la croissance démographique, l'augmentation de la longévité et surtout la mauvaise hygiène de vie (alimentation, absence d'activité physique, tabagisme)

En Algérie, le CCR est le deuxième cancer le plus fréquent après le cancer du poumon chez l'homme et le second chez la femme après le cancer du sein (Registre des Tumeurs d'Alger 2007). Parmi les cancers colorectaux 5% sont d'origine héréditaire avec une prévalence de 1% pour la PAF. Celle-ci se définit comme une maladie héréditaire rare caractérisée par l'apparition précoce des centaines, voire milliers de petites excroissances, des polypes bénins au niveau du colon et du rectum. Elle se transmet selon le mode autosomique dominant et le risque cumulé de CCR après l'âge de 40 ans est élevé.

En Algérie, très peu d'études d'épidémiologie et d'oncologie moléculaire ont été réalisées pour connaître l'importance du dépistage génétique de la PAF chez des familles à risque. De plus les populations nord africaines n'ont pas fait l'objet de nombreux travaux de recherche dans ce domaine (dépistage génétique).

Le pronostic de la maladie tient toujours au risque de cancer colorectal, cause principale de décès. Néanmoins, le traitement de PAF est coloproctectomie avec anastomose iléo-anale ou iléo-rectal, et les résultats sont excellents (Morpurgo *et al.*, 2004), la chirurgie classique reste le traitement de référence dans les formes de la PAF (Lundell *et al.*, 2002) ; c'est le cas du sujet index de la famille F2 qui a développé un cancer colique sur le colon restant 10 ans après une première hémicolectomie.

Dans la forme atténuée de la PAF, l'apparition des adénomes coliques est plus tardive (vers l'âge de 30-40), leur nombre plus limité (de quelques uns à une centaine) et l'atteinte rectale exceptionnelle ; elle ne s'accompagne pas de symptomatologie extra colique à l'exception d'une polypose fundique glandulo kystique bénigne.

Les adénomes ont cependant un risque élevé de transformation maligne.

L'existence de mutations germinales bi-alléliques du gène MYH (pour Mut Y Homologue) chez des patients ayant un phénotype de PAF atténuée et sans mutation germinale du gène APC ont été décrites récemment. La transmission de ce syndrome se fait selon un mode autosomique récessif. Les mutations de MYH sont responsables de moins de 1% de l'ensemble des CCR.

Dans ce travail, 3 cas de PAF atténués ont été recensés ; le diagnostic étant basé uniquement sur le nombre des polypes (<100) ; il n'a pas été réalisé de test génétique pour préciser le type de mutation (APC ou MYH).

Il y a un nombre relativement limité d'études qui ont examiné le rôle de l'IHC dans la PAF. Les techniques immunohistochimiques ont l'avantage d'être applicables à n'importe quel type de prélève, incluant les prélèvements congelés et les prélèvements fixés.

**La  $\beta$ -caténine :** est impliquée dans l'adhérence cellulaire en reliant les cadhérines aux filaments d'actine. Elle joue un rôle important dans la voie de signalisation Wnt/  $\beta$ -caténine intervenant dans la prolifération et la transformation des cellules (Takeda *et al.*, 2000). La mutation de  $\beta$ -caténine est un événement important dans la progression.

Certain nombre de tumeurs, c'est également une oncoprotéine qui peut mener à la carcinogenèse (Ben-Ze'ev *et al.*, 2000).

Dans les cellules normales la  $\beta$ -caténine est positive en intracytoplasmique ; sa détection en intranucléaire est synonyme de mutation. Les études récentes ont prouvé que l'accumulation du  $\beta$ -caténine en intracytoplasmique et nucléaire est associée à la perte d'adhérence, transformation maligne et la prolifération non réprimée (Saegusa et Okayasu 2001)

Dans notre étude nous avons étudié le taux d'expression de  $\beta$ -caténine par IHC chez 5 patients atteints de PAF ; le type de marquage : membranaire, cytoplasmique, nucléaire est précisé dans chaque cas.

La localisation anormale de la  $\beta$ -caténine a été bien documentée dans les ADK du colon avec la mutation dans le gène suppresseur de tumeur APC (Chung 2000), le produit de gène APC fonctionne pour dégrader  $\beta$ -caténine cytoplasmique libre.

Dans notre étude on a trouvé que la  $\beta$ -caténine est marquée positivement au niveau nucléaire dans un cas ADK bien différencié de grade 1 ; nos résultats corroborent celles de Chung.

Chez les patients avec APC muté, la  $\beta$ -caténine n'est plus dégradée et s'accumule dans noyau de la cellule et agit tant qu'un facteur transactivateur pour le facteur transcriptionnel Tcf-4 pour régler l'expression d'un certain nombre de gènes jouant un rôle dans l'oncogenèse (Morin *et al.*, 1997).

L'intensité du marquage est corrélée au degré de dysplasie (selon des études américaines menées sur une série d'adénomes coliques, l'intensité est importante dans les dysplasies de haut grade.

Nos résultats sont en accord avec les résultats de littérature.

Paola *et al.* (2006) ont prouvé dans leur étude que la voie de signalisation Wnt était activée dans les premières étapes de la carcinogénèse colorectale via la localisation nucléaire de l'effecteur clé  $\beta$ -caténine dans les foyers de crypte aberrantes ; ainsi, la détection immunohistochimique de la  $\beta$ -caténine nucléaire peut servir comme outil complémentaire au diagnostic différentiel et un indicateur de sévérité.

**La P53** : l'expression immunohistochimique (marquage nucléaire) de la p53 est un marqueur de sa mutation et donc de la perte biallélique LOH.

Chapusot *et al.*, 2001 ont montré que la protéine P53 est accumulée dans 50 à 70% dans les cancers colorectaux. Ce qui s'accorde avec nos résultats, en effet parmi les 5 cas d'adénocarcinomes étudiés, un cas était positif et il présentait une localisation nucléaire de la P53.

La mutation du gène P53 intervient tardivement dans la séquence adénome-carcinome, ce qui explique l'absence de marquage dans les petits adénomes étudiés et sa positivité dans le cas de l'adénome avec dysplasie de haut grade/ carcinome in situ.

L'expression de la p53 pourrait avoir un rôle dans le dépistage des patients porteurs d'adénomes qui ont un risque élevé de développer des carcinomes colorectaux.

Dans l'étude rétrospective menée par arfa *et la* en tunisie, les ADK bien différenciés représentent dans 46%, les ADK moyennement différenciés 33.3% et peu différenciés 11.3% ; nos résultats sont proche (arfa *et al.*, 2006).

Selon *li et al.* (2003) en chine, l'expression de la protéine P53 n'a pas été observée dans des conditions normales de la muqueuse. Le taux de l'expression positive de P53 dans les adénocarcinomes était de 52.6% il y avait une différence significative entre adénocarcinomes et de la muqueuse normale ( $p < 0.001$ ).

Selon l'étude établie par *li et al.* (2003) en chine, l'expression de la protéine P53 n'est pas liée au degré de différenciation de l'adénocarcinome

La valeur pronostique péjorative des mutations du gène TP53 reste controversée dans la littérature.

**L'antigène ACE** est présent dans l'intestin, le foie ; le pancréas d'embryons ou de fœtus humains au cours des deux premiers mois de grossesse et est absent dans des tissus sains adultes. Il est généralement présent dans la plupart des adénocarcinomes tels ceux du tube digestif (*Létourneau et al.*, 1997).

L'ACE est l'un des marqueurs tumoraux les plus répandus et certainement le plus fréquemment utilisé sous forme protéique comme marqueur dans les cancers gastrointestinaux, en particulier dans le cancer colorectal.

En oncologie, L'ACE n'est pas un marqueur spécifique d'un tissu tumoral particulier (*Goldestein et Mitchell* 2005) les valeurs détectées n'ont de sens que pour concourir à établir un pronostic et à effectuer un suivi thérapeutique.

Dans les cancers colorectaux, le produit de gène ACE est sur-exprimé ; le gradient de sécrétion vers le pôle apical est perturbé et L'ACE est distribué sur toute la surface de la cellule et dans l'espace intercellulaire.

L'ACE faciliterait des l'adhésion des cellules tumorales aux protéines de la matrice extracellulaire favorisant le processus d'induction des métastases.

Le taux d'ACE est corrélé positivement au stade de la tumeur et négativement au degré de différenciation : 52% des cancers colorectaux sans métastases (M0) et 75% des cancers métastasés (*Meley et al.*, 1991).

Un taux sérique d'ACE élevé (supérieur à 5 g/ml) en pré opératoire, en l'absence de métastases, signe un pronostic défavorable. La persistance d'un taux élevé après résection de la tumeur primitive, a une valeur pronostique en matière de récurrence précoce et de survie.

Une bonne corrélation est retrouvée entre le taux de positivité en IHC et les taux sériques. (40-60%).

Dans cette étude, l'ACE a été exprimé dans 55% des cas ; le marquage est membranaire et cytoplasmique comparé à la muqueuse colorectale normale où le marquage est retrouvé à la partie supérieur du pôle de la cellule ; nos résultats corroborent celles de Meley *et al.*

Globalement nos résultats se concorde avec ceux annoncés par la littérature mais la technique IHC reste indicative du status ou grade de la PAF mais n'est pas utilisée pour décider une intervention chirurgicale vu que celle-ci dépend de l'examen clinique seul.

## Annexe 1

---

### Enquête sur la polypose adénomateuse familiale :

Nom : Prénom :

L'âge : (âge actuel du patient) Sexe :

(Âge du patient au diagnostic)

(Âge au moment du décès)

Etat civil : Adresse :

### Antécédents :

Personnels :

Familiaux :

### Clinique :

Date de recrutement :

Symptomatologie :

Examen clinique :

### Coloscopie :

Le nombre des polypes au niveau du colon : supérieure à 100 polypes

Inferieure à 100 polypes

Egale 100 polypes

Colectomie : oui : non : date :

Autre membres de la famille ont eu une polypose adénomateuse familiale : oui  
non

C'est qui :

L'un des deux parent a eu un PAF : oui non

C'est qui : père mère

La mère : en vie. .... Décédé..... la cause de la  
mort.....

Le père : en vie..... décédé..... la cause de la  
mort.....

## Annexe 1

---

### **Les grands parents maternels :**

Grand-mère : en vie.... Décédé..... la cause de la mort.....  
Grand-père : en vie... décédé..... la cause de la mort.....

### **Les grands parents paternels :**

Grand-mère : en vie... décédé.... La cause de la mort.....  
Grand-père : en vie... décédé.... La cause de la mort.....

Le nombre de vos sœurs et frère :

### **Les Filles :**

L'âge de chacune :

Si elles sont mariée le nombre des enfants et l'âge pour chacun

Les filles saines :

Les filles atteintes :

En vie :

Décédés :

La cause de la mort et l'âge :

### **Les garçons :**(Les mêmes quêtions pour les garçons)

**Les oncles maternels** : en vie..... Décédés..... La cause de la mort.....

**Les tentes maternelles** : en vie.... décédés..... la cause de la mort.....

**Les oncles paternels:** en vie..... décédés..... la cause de la mort.....

**Les tentes paternelles** : en vie... décédés..... La cause de la mort.....

## **Annexe 1**

---



- **Materiel**

Cassettes en plastique.  
Moules en métal (porte cassettes).  
Lames, porte lames et lamelles.  
Pince, crayon et DAKO pen.  
Lame de bistouri.

- **Appareillage**



**Automate d'inclusion (Circulateur) Leica**



**Station d'enrobage Leica**



**Microtome Leica**



**Bain marie servant à l'étalement Leica**



**Plaque chauffante Leica**



**Etuve Memmert**



**Bain marie Memmert**



**Microscope photonique multi-têtes type Leica**

**Tableau I :** Caractéristiques des anticorps utilisés dans notre étude immunohistochimique

AC	clone	Marquage	Dilution	Démasquage
$\beta$ -caténine	$\beta$ -caténine-1	Membranaaire	1/50	Chaleur (20 min), Ph=6
ACE		Membranaire	1/50	Chaleur (30 min), Ph=9
P53	DO-7	Nucléaire	1/50	Chaleur (30 min), Ph=9

**Tableau II:** Les différentes solutions utilisées et leurs caractéristiques

Solution	Dilution	pH	Ref
Dako REAL Antibody Diluent	Non dilué	7.2	S2022
DAko Target Retrieval Solution (TRS)	1/10	6	S1699
Dako Target Retrieval Solution (TRS)	1/10	9	S2375
Dako Tris-Buffer Saline (TBS)	3 paquets dans 1 litre	7.6	S3001

### • Modes opératoires

#### Mode opératoire (Coloration à Hématoxyline Eosine)

- Mettre le portoir des lames dans l'Hémalun 2mn: coloration des noyaux
- Rinçage à l'eau
- Passage dans l'acide chlorhydrique: ce qui conduit à l'élimination de l'excès d'Hémalun
- Rinçage à l'eau
- Passage dans l'ammoniaque : qui différencie le noyau du cytoplasme.
- Rinçage à l'eau
- Passage dans l'éosine : coloration du cytoplasme en rose.
- Rinçage à l'eau
- Séchage

**Mode opératoire (immunohistochimie)**

- Etaler les rubans dans un bain-marie contenant de l'eau distillée et repêchés sur des lames silanisées
- Mettre les lames dans une étuve à 58°C pendant une nuit pour faire fondre la paraffine
- Faire passer chaque lame dans 3 bains de xylène pendant 5mn pour éliminer toute trace de paraffine qui se trouve encore sur l'échantillon
- Faire passer chaque lame dans 3 bains d'alcool pendant 5 min chacun.
- Mettre chaque lame dans de l'eau distillée
- Démasquage antigénique : Immerger les lames dans une solution TRS à pH 6-9 et mises au bain-marie à 95° pendant 40 min.
- Refroidissement : retirer les bacs du bain-marie, puis les laisser refroidir sur la paillasse à température ambiante pendant 20 min.
- Cercler les échantillons avec un marqueur DAKO PEN
- Blocage de la peroxydase avec de l'eau oxygénée H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
- Rincer à l'eau distillée
- Faire passer les lames dans 2 bains de PBS pendant 5mn à chaque fois.
- Application de l'anticorps primaire pendant 40mn.
- Faire passer lames dans un bain du tampon PBS pendant 5mn
- Application de l'anticorps secondaire pendant 30 mn. (polymère HRP anti mouse)
- Effectuer 2 lavages de 5 mn chacun au PBS
- Révélation : Mettre quelques gouttes de la solution DAB+ Chromogène et laisser incuber pendant 30 min
- Contre coloration : immerger les lames pendant 5 min dans une solution d'hémalum de Mayer
- Rincer parfaitement dans un bain d'eau courante, puis tremper les lames dans un bain d'ammoniaque, puis rincer à l'eau distillée
- Montage

## Classification TNM :

La classification TNM est un système international, proposé par le chirurgien français Pierre Denoix dans les années 1940-1950, de façon à classer les cancers selon leur extension anatomique (Denoix, 1946).

Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour node en anglais) et à distance pour d'éventuelles métastases (M). Chaque lettre est affectée d'un coefficient. Dans son principe, cette classification considère seulement les données cliniques et ne s'applique qu'à des cancers qui n'ont pas encore été traités.

<p><b>Tumeur primitive (T)</b></p> <p><b>TIS = Carcinome in situ. Tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria sans extension à la sous-muqueuse</b></p> <p><b>T1 = Tumeur infiltrant la sous-muqueuse sans la dépasser</b></p> <p><b>T2 = Tumeur infiltrant la musculuse sans la dépasser</b></p> <p><b>T3 = Tumeur envahissant toute la paroi sans la dépasser</b></p> <p><b>T4 = Tumeur dépassant la séreuse</b></p>
<p><b>Envahissement ganglionnaire (N)</b></p> <p><b>N0 = Absence de métastase ganglionnaire régionale</b></p> <p><b>N1 = Métastase dans un à trois ganglions régionaux</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- N1a = 1 ganglion envahi</li> <li>- N1b = 2 ou 3 ganglions envahis</li> <li>- N1c = présence d'embolies tumorales dans la sous-séreuse sans métastase ganglionnaire</li> </ul> <p><b>N2 = Métastase dans 4 ganglions régionaux ou plus</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- N2a = 4 à 6 ganglions envahis</li> <li>- N2b = 7 ganglions envahis ou plus</li> </ul> <p><b>Nx = Statut ganglionnaire inconnu</b></p>
<p><b>Métastases (M)</b></p> <p><b>M0 = Absence de métastase</b></p> <p><b>M1 = Présence de métastases à distance</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- M1a = limité à un site ou organe</li> <li>- M1b = touchant plusieurs organes ou le péritoine</li> </ul> <p><b>Mx = Statut métastatique inconnu</b></p>

**Figure 1 :** Classification TNM des cancers colorectaux



**Tableau I :** Caractéristiques des patients (Le nombre des patients en fonction de l'âge, le sexe, l'année considérée et le geste pratiqué)

L'année Sexe	2009					2010					2011					2012					2013					Geste pratiqué		
	18 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	> 60	18 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	> 60	18 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	> 60	18 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	> 60	18 - 30	30 - 40	40 - 50	50 - 60	> 60			
Femme			41																								Colectomie +résection rectale	
Homme					66																						Colectomie totale) +recoupe rectale	
Femme	_____																										Colectomie totale	
Femme						_____																						Biopsie colique
Homme											25																Biopsie (polype recto-colique)	
Femme											25																Colectomie totale	
Femme																			52								Pièce de résection colique	
Femme																	32										Pièce de colo proctectomie totale	
Femme																36											Colo proctectomie	
Homme																		45									Colectomie totale	
Femme																					18						Biopsie rectal	

**Note :** L'age de deux patients n'a pas été mentionné sur les fiches de renseignements.

