

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida1
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie et Physiologie Cellulaire



Mémoire de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme master II en biologie
Option : Génétique et physiologie

Thème

Mise en évidence de l'expression de p53 et EGFR (facteurs pronostiques) par immunohistochimie et détection des mutations activatrice du gène KRAS par PCR en temps réel dans le cancer colorectal avancé et métastatique

Présenté par :

M^{elle} HARMOUCHE Hiba.

Date de soutenance : 02.10.2014

Devant les membres de jury :

Mme AMOKRANE .A	Maitre assistante A à l'UB1	Présidente
Mme BEN AZZOUZ .F	Maitre assistante A à l'UB1	Examinatrice
Mme KESKAS.S	Maitre assistante B à l'UB1	Examinatrice
Mme AIT -KACI H	Maitre assistante à L' anapath CPMC	Examinatrice
Mme BERKANE .K	Maitre de conférences A à FSB Usthb	Promotrice
Mme HERKAT. S	Maitre assistante A à l'UB1	Co promotrice

Promotion 2013/2014

Remerciement

J'exprime tout d'abord mes profonds louanges à Dieu tout puissant, qui m'a guidé sur le droit chemin et m'a donné le courage et la volonté d'achever ce Travail.

Mes remerciements les plus profonds et les plus sincères à Mr. Bouzid K, chef de service d'oncologie médicale pour son accueil au sein de son service , et surtout de nous avoir permis une initiation aux techniques de biologie moléculaire et en particulier la PCR en temps réel au niveau de son laboratoire d'Oncologie Moléculaire Fondamentale et Appliquée (L.O.M.F.A) au centre Pierre et Marie Curie(CPMC).

Je tiens également à exprimer mes chaleureux remerciements à ma promotrice Mme BERKANE K (Maitre de conférences A) et ma Co-promotrice Mme HARKAT H (Maitre assistance A), et Mme AIT -KACI H (Médecin assistante à L'anapath CPMC), pour leur disponibilité, leurs conseils, leur orientation, mais aussi pour l'aide et le savoir qu'ils nous ont prodigués.

Toute ma gratitude aux membres du Jury et mes remerciements s'adressent d'abord à la présidente du jury Mme AMOKRANE A, qui a accepté de présider ce Jury et aux examinatrices Mme BEN AZZOUZ F et Mme KESKAS.S qui ont bien voulu examiner et évaluer ce travail.

Mes vifs remerciements à toutes l'équipe de Laboratoire d'Anatomie pathologique du centre Pierre et Marie Curie(CPMC).

Dedicaces

Louanges à Allah (mon dieu) qui m'a guidé sur le droit chemin tout le long du travail, de m'avoir donné la capacité de réfléchir et d'écrire, la force d'y croire, la patience d'aller jusqu'au bout du rêve et le bonheur de lever mes mains vers le ciel et de dire "YA KAYOUM" car sans sa miséricorde ; ce travail n'aura pas aboutit.

Je dédie ce modeste travail:

A celle qui m'a donné la vie, le symbole de tendresse, qui s'est sacrifiée pour mon bonheur

*Et ma réussite, à ma mère **Meriem**.*

*A mon père **Abdelkader**, école de mon enfance, qui a été mon ombre durant toutes les années des études, et qui a veillé tout au long de ma vie à m'encourager, à me donner l'aide et à me protéger et qui a toujours cru en moi..*

Rien au monde ne pourrait compenser les efforts et les sacrifices que vous avez consentis pour mon bien être et la poursuite de mes études dans de bonnes conditions.

Puisse Dieu, vous procure santé, bonheur et longue vie.

***A mes adorables sœurs** Houda et Rihab qui m'ont toujours soutenue et encouragée.*

***A mes chers frères** Mustapha Hicham et Abderrahmane, Rabeh, zaki et yahia.*

***A mes grands parents**, symbole de santé, le courage et responsabilité qui leurs prières et bénédictions étaient pour moi le principal support pour que je puisse arriver à mon but.*

***A ma tante Eldja et son mari Kouidri Abdelhamid** qui m'ont hébergée et soutenue durant toute la période du travail.*

Que dieu vous garde, vous comble, la santé et vous donne longue vie.

***A mes oncles et mes tantes** ; et en particulier ma tante Karima à qui je souhaite un bon rétablissement et guérison ;*

***A mes cousins et cousines** : en particulier Soumia qui m'a vraiment aidée*

A toute la famille

***A mes amies** Samia, Naima, Meriem, Aicha, Fatima, Kawter Amina, Ismahane.*

A tous ceux qui m'aiment

A tous ceux que j'aime

A toute personne qui a participé de près sinon de loin à mettre ce travail en œuvre.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé publique en raison de sa fréquence et de sa gravité, il occupe le 2^{ème} en Algérie, et le second en termes de décès par cancer (Registre du cancer, INSP, 2009).

Dans notre étude, nous avons évalué l'expression des facteurs pronostiques p53 et l'EGFR par la technique d'immunohistochimie. Elle concerne 30 patients atteints d'adénocarcinome colorectal métastatique ou non. La détection des mutations du gène KRAS est effectuée en vue d'une prescription thérapeutique (thérapie ciblée) par une technique de biologie moléculaire la PCR en temps réel. Elle concerne 11 cas. La p53 est exprimée dans 24 cas (80%), et l'EGFR 23 cas (73,33%). L'étude statistique a montré qu'il n'y a pas de corrélation significative entre l'expression des deux facteurs pronostique et le sexe, l'âge, l'histologie, la localisation tumorale, et le stade pTNM, ($p > 0,05$). D'autres études confirment nos résultats.

La présence de mutation du gène KRAS est prédictive de l'absence de réponse aux thérapies ciblées anti EGFR utilisant des anticorps monoclonaux. Sur les 11 patients 7 cas présentant une mutation sur le gène KRAS avec 6 cas (85,71%) la mutation située sur le codon 12/13 et 1 cas (9,09%) porte la mutation sur le codon 61. L'étude statistique a montré qu'il n'y a pas de corrélation statistique significative entre la mutation du KRAS et les différents paramètres clinicopathologiques ($p > 0,05$) et l'expression de p53, et EGFR ($p > 0,05$).

Mots clés : Cancer colorectal, Immunohistochimie, p53, EGFR, PCR en temps réel, KRAS.

Abstract

Colorectal cancer (CCR) is a major health problem because of its frequency and severity, he was the second largest in Algeria, and second in terms of cancer deaths.

In our study, we attempted to evaluate the expression of p53 and EGFR by immunohistochemistry technique involves 30 patients with metastatic colorectal adenocarcinoma or not, and the detection of KRAS mutation in order to a therapeutic prescription (targeted therapy) by the technique of molecular biology in the real time PCR, 11cas regards achievement of metastatic colorectal cancer. p53 is expressed in 24cas (80%) of 30 patients, and EGFR 23cas (73.33%) of 30 patients. Statistical analysis showed that there is no significant correlation between the expression of two prognostic factors and sex, age, histology, tumor location, and pTNM stage ($p > 0.05$). Others studies confirm our results. The presence of KRAS mutation was predictive of lack of response to targeted therapies using anti-EGFR monoclonal antibodies. Of the 11 patients 7 cases with a mutation in the KRAS gene with 6cas (85.71%) the mutation located on 12/13 and 1 case codon (9.09%) carries the mutation at codon 61 The statistical study has shown that there is no statistically significant correlation between KRAS mutation and different clinicopathological parameters ($p > 0.05$) and the expression of p53 and EGFR ($p > 0.05$).

Key words: Colorectal cancer, immunohistochemistry, p53, EGFR, real time PCR, KRAS.

Liste des figures

Figure 01 : Anatomie du côlon.....	03
Figure 02 : Histologie de la paroi colique saine chez l'homme.....	03
Figure 03 : Deux mécanismes de carcinogenèse colique.....	09
Figure 04 : la voie du <i>TGF-β</i>	10
Figure 05 : Voie WNT/wingless ou voie APC/b-caténine.....	11
Figure 06 : La protéine EGFR.....	12
Figure 07 : Représentation schématique de la voie de l'EGFR.....	14
Figure 08 : La Voie de p53.....	15
Figure 09 : Mécanisme d'action de l'inhibiteur de voie de signalisation EGFR.....	20
Figure10 : pièce de résection colique gauche plus Transverse de 60cm fixé au formol.....	22
Figure 11 : Immunomarquage (système de révélation EnVision).....	25
Figure 12 : Schéma qui représente le principe de l'analyseur <i>Cobas z 480</i>	31
Figure 13 : Principe de la sonde Taqman.....	32
Figure 14 : répartition des patients porteurs adénocarcinomes en fonction de sexe.....	33
Figure 15 : Répartition des patients porteurs adénocarcinomes en fonction de l'âge.....	34
Figure 16 :Répartition des patients porteurs adénocarcinomes selon la localisation de la tumeur.....	34
Figure 17 : Répartition des patients porteurs adénocarcinomes on fonction de stade.....	35
Figure 18 : Répartition des patients porteurs adénocarcinomes selon le grade de différenciation	36
Figure 19 : Aspect macroscopique d'une tumeur du colon.....	37
Figure 20 : Aspect microscopique de la muqueuse colique saine après coloration HE.....	38
Figure 21 : Aspect d'un adénocarcinome bien différencié, coloration HE.....	40
Figure 22 : Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié, coloration HE.....	40
Figure 23 : Aspect d'un adénocarcinome peu différencié, coloration HE.....	40

Figure 24 : Evaluation de l'expression de p53.....	42
Figure 25 : Profil IHC de l'expression nucléaire de la p53.....	43
Figure 26 : Profil IHC de l'absence de l'expression nucléaire de la p53 dans la muqueuse sain.....	44
Figure 27 : Evaluation de l'expression d'EGFR.....	45
Figure 28 : Profil IHC de l'expression membranaire d'EGFR.....	46
Figure 29 : L'expression d'EGFR, de P53 on fonction de l'âge.....	48
Figure 30 : L'expression d'EGFR, de P53 on fonction de sexe.....	49
Figure31 : Expression d'EGFR, P53 on fonction de la localisation tumorale.....	50
Figure 32: L'expression d'EGFR, de P53 on fonction stade pTNM.....	51
Figure 33 : L'expression d'EGFR, de P53 on fonction du grade de différenciation	52
Figure 34 : Evaluation du statut Kras et des codons mutés.....	54
Figure 35 : L'expression d'EGFR, de P53 on fonction du l'âge.....	55
Figure 36 : La mutation de KRAS en fonction du sexe.....	56
Figure 37 : Histogramme de la mutation de KRAS en fonction de la localisation tumoral...	57
Figure 38 : Histogramme de l'expression d'EGFR et p53, avec le statut KRAS.....	58
Figure 39: Les kits du KRAS.....	Annexe II
Figure 40: Automate de circulation.....	Annexe IV
Figure 41 : Remplissage des tissus par la paraffine	Annexe IV
Figure 42 : Le remplissage des moules sur la plaque froide.....	Annexe IV
Figure 43 : Les blocs	Annexe IV
Figure 44 : Confection des coupes	Annexe IV
Figure 45 : L'étalement du ruban sur la lame	Annexe IV
Figure 46 : Automate de coloration	Annexe IV
Figure 47 : Lame HE	Annexe IV

Liste des tableaux

Tableau I : Expression de p53 en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage nucléaire par IHC.....	42
Tableau II: Expression d'EGFR en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage membranaire par IHC.....	45
Tableau III : Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de l'âge.....	48
Tableau IV: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de sexe.....	49
Tableau V : Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de la localisation tumorale	
Tableau VI: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de stade pTNM	51
Tableau VII: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction du grade de différenciation.....	52
Tableau VIII : Résultats de la phase analytique donnée par l'automate <i>cobas Z 480</i>	53
Tableau IX: Génotypage du gène KRAS et des codons mutés.....	54
Tableau X : Corrélation entre l'âge et le statut KRAS.....	55
Tableau XI : Corrélation entre le sexe et le statut KRAS.....	56
Tableau XII : Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS.....	57
Tableau XIII : Répartition de l'expression de p53, EGFR, avec le statut KRAS.....	58
Tableau XV : Stades regroupés.....	Annexe I
Tableau XVI: Les réactifs utilisés dans l'histopathologie.....	Annexe II
Tableau XVII : Les appareillages utilisés dans l'histopathologie.....	Annexe II
Tableau XVIII : Les réactifs utilisés dans l'immunohistochimie.....	Annexe II
Tableau XIX: Les appareillages utilisés dans l'immunohistochimie	Annexe II
Tableau XX: Les appareillages et les kits utilisés dans la technique de la PCR en temps réel	
Tableau XXI : Caractéristiques des patients.....	Annexe III
Tableau XXII : les calculs de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon.....	Annexe V

Tableau XXIII : Volumes de réactifs nécessaires pour les mélanges réactionnels actifs MMX 12/13 et MMX 61..... **Annexe V**

Tableau XXIV : Disposition de la plaque d'échantillons..... **Annexe V**

Tableau IX: Caractéristiques des 11 patients atteints le CCRm..... **Annexe V**

Liste des abréviations

ABD : Adénocarcinome bien différenciée.

ADK : Adénocarcinome.

AMD : adénocarcinome moyennement différenciée.

APC : Adénomatos Polyposis Coli.

APD : adénocarcinome peu différenciée.

ARNm : Acide ribonucléique messenger.

CCR : Cancer colorectal.

CCRm : Cancer colorectal métastatique.

CIMP: CpG Island Methylator phenotype.

CIN: Chromosomal Instability.

CPMC : Centre Pierre Et Marrie Curie.

CT : Tubes de prélèvement.

DAB: 3-3 DiAminoBenzidine.

DAKO: Dakocytomation.

DCC: Deleted in Colorectal Cancer.

DNA PBB : Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine.

DNA SD : Diluant échantillon d'ADN.

DNA TLB : Tampon de lyse de tissu d'ADN.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

ER : épithélium de revêtement.

FT : Tubes de filtration avec bouchons.

GL: glande de Liberkühn.

Grb2: Growth factor Receptor-Bind protein 2.

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3.

H₂O₂: Hydroxyde d'hydrogène.

HE: Hématoxyline-Eosine.

hMLH1: human mutL homolog 1.

hMSH2: human mutS homolog 2.

HNPC: hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer.

hPMS1: human postmeiotic segregation 1.

HRP : Peroxydase de Raifort.

IHC: Immunohistochimie.

kDa : Kilo Dalton.

KRAS 12/13 OM: Mélange oligo de codon 12/13 du KRAS.

KRAS 61 OM : Mélange oligo de codon 61 du KRAS.

KRAS CAL : Calibrateur KRAS.

KRAS MC : Contrôle mutant KRAS.

KRAS MIX : Mélange réactionnel.

K-ras : Kirsten rat sarcoma viral oncogene.

MAPK: Mitogen-activated protein Kinase.

MGAC : Acétate de magnésium.

MMR : Mis-Match Repair.

MSI : Microsatellite Instability.

NS : non significative.

OMS : Organisation mondiale de la Santé.

P110 : protéine 110.

PAF : Polyposis Adénomateuse Familiale.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

PCR : Polymerase chain reaction (Réaction en chaîne par polymérase).

PKB: Protéine Kinase B.

pTNM: post Tumor Nodes Metastasis.

RAS: Rat Sarcoma.

SH2: Src homology domain 2.

Shc: Src homology 2/ α -collagen-related.

TP53 : Tumor protein 53.

TRS: Target Retrieval Solution.

Glossaire

Adénocarcinome : est une tumeur maligne développée à partir d'un épithélium glandulaire (Goldman ,2013).

Adénome : est une tumeur bénigne pouvant affecter une glande ou bien une muqueuse (Goldman ,2013).

Adjuvant : chimiothérapie ou radiothérapie offerte après la chirurgie afin de réduire le risque de récurrence du cancer (Cacheux et *al.* ,2011).

Cancer localement avancé : terme descriptif pour parler d'un cancer s'étant propagé, depuis son site d'origine à la surface interne de l'intestin, à travers la paroi de l'intestin pour venir occuper des tissus ou des ganglions lymphatiques avoisinants (Michel, 2008).

La dysplasie : correspond à des anomalies cellulaires, nucléaires et cytoplasmiques associées à des anomalies architecturales de l'épithélium des glandes. Les anomalies sont progressivement croissantes, d'abord de bas grade puis de haut grade avec désorganisation architecturale marquée. L'apparition d'une dysplasie de haut grade témoigne des anomalies génétiques précoces de la transformation maligne (Morère et *al.* ,2011).

La néoplasie : il s'agit littéralement «d'une nouvelle formation» l'appellation du néoplasie est toutefois réservée à la prolifération pathologique car elle indique une multiplication cellulaire qui se vise aucun but utile et qui n'est pas contrôlée par les lois de la croissance cellulaire normale ou homéostasie (Morère et *al.* ,2011).

Les gènes suppresseurs de tumeurs : sont des régulateurs négatifs de la croissance cellulaire, leur altération peut contribuer au processus tumorigène. Il s'agit d'une transmission récessive, les 2 allèles du gène devant être altérés pour observer l'effet oncogénique (mode récessif). Les gènes suppresseurs de tumeur peuvent être classés en 2 familles de gènes: gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la survie cellulaire (gatekeepers) et Les gènes de maintien de l'intégrité du génome (caretakers)

(Michaël et *al.* ,2004).

Oncogène : est un gène altéré, dont le produit (protéine) est impliqué dans la transformation d'une cellule normale en cellule tumorale (Michaël et *al.* ,2004).

Glossaire

Polype : est une croissance anormale de tissus en saillie adénome, ou tumeur bénigne, se développant sur les muqueuses. Certains sont plats (polypes sessiles), d'autres possèdent un pied plus ou moins long (polypes pédiculés). Ils se retrouvent plus fréquemment sur les muqueuses du côlon, du rectum, de l'utérus, de l'estomac (Rochaix et *al.*, 2005).

Pronostic : une prévision ou une prédiction de l'évolution probable de la maladie, de l'issue du traitement et du risque de récurrence (Giacchetti S, 2010).

Système de stadification TNM : un système permettant de décrire l'étendue du cancer dans le corps d'un individu; T décrit la taille de la tumeur et si celle-ci a envahi les tissus avoisinants, N décrit tout ganglion lymphatique atteint par le cancer et M décrit les métastases (propagation du cancer d'un endroit du corps à l'autre) (AJCC, 7^{ème} édition 2009).

Thérapie ciblée : un type de traitement contre le cancer qui utilise des médicaments afin d'identifier et d'attaquer précisément les cellules cancéreuses sans nuire aux cellules saines (Cacheux et *al.*, 2011).

SOMMAIRE

Introduction.....	1
--------------------------	----------

Chapitre I: Etude bibliographiques

I.1 Rappels sur le colon-rectum.....	2
I.1.1 Anatomie	2
I.1.2 Histologie.....	3
I.2 Le cancer colorectal.	4
I.2.1 Epidémiologie	4
I.2.2 Histoire naturelle du cancer colorectal.....	4
I.2.3 Les types histologiques du cancer colorectal.....	5
I.2.4 Classification des cancers colorectaux.....	6
I.3 Facteurs de risque du cancer colorectal.....	6
I.3.1 Facteurs génétiques	6
I.3.2 Les facteurs environnementaux	7
I.3.3 Maladies inflammatoires chroniques.....	7
I.4 Physiopathologie du cancer colorectal.....	8
I.4.1 Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse	8
I.5 Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogène colorectale	10
I.5.1 voie du <i>TGF-β</i>	10
I.5.2 Voie APC/B-Caténine /TCF	11
I.5.3 La voie de L'EGFR	12
I.5.4 La voie P53	15
I.6 Les facteurs pronostiques et prédictifs du cancer colorectal	16
I.7 Prise en charge des cancers colorectaux.....	19

Chapitre II : Matériels et méthodes

II.1 Matériel	21
II.1.1. patient	21
II.1.2 Matériel non biologique	21

II.2 Méthodes	21
II.2.1. Technique anatomo-pathologique	21
II.2.2 Technique immunohistochimique	24
II.2.3 Technique de biologie moléculaire "PCR en temps réel"	28
II.2.4 Etude Statistique	32

Chapitre III : Résultats et discussion

III.1 : Caractéristiques des patients	33
III .1.1 Répartition selon le sexe	33
III .1.2 Répartition en fonction de l'âge	34
III .1.3 Répartition selon la localisation de la tumeur	34
III .1.4 Répartition on fonction de stade PTNM	35
III .1.5 Répartition selon le type histologique	36
III.2 Etude histopathologique	37
III.3. Etude immunohistochimique de la P53, EGFR	42
III.3.1. Immunodétection de la p53.....	42
III.3.2. Immunodétection d'EGFR.....	45
III.4. Etude des corrélations entre l'expression de la p53, EGFR avec les différents paramètres clinicopathologiques..	48
III .5 Détection des mutations du gène Kras par PCR en temps réel.....	53
III .5.1 Résultats de la phase analytique donnés par l'automate <i>cobas z 480</i>	53
III .5.2 Evaluation de statut KRAS.....	54
III.5.3 Etude de corrélation entre le statut KRAS avec les différents paramètres clinicopathologiques.....	55
III.5.4 Répartition de l'expression de p53, EGFR, avec le statut KRAS.....	58
Discussion	59
Conclusion	64

Références bibliographiques

Annexe

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé en raison de sa fréquence et de sa gravité. En Algérie, il représente le 2^{ème} cancer chez l'homme après le cancer du poumon et le 2^{ème} chez la femme après le cancer du sein (Registre du cancer, INSP, 2009).

Le cancer colorectal (CCR) correspond à toutes proliférations néoplasiques malignes prenant naissance à partir de la paroi colique (Scotté et *al.*, 2000), résultant de l'accumulation de plusieurs mutations des proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs ainsi que des gènes de réparation de l'ADN (Inieta et *al.*, 1998).

Des recherches approfondies sur la biologie du cancer colorectal ont identifié une multitude marqueurs moléculaires réputés pour fournir des informations pronostiques. Ainsi, des résultats contradictoires ont été établis sur le rôle du gène suppresseur de tumeur p53 et le récepteur membranaire au facteur de croissance épidermique (EGFR) ; deux marqueurs pronostiques les plus étudiés présumés dans le cancer colorectal.

Les traitements des cancers reposent sur l'utilisation de produits de chimiothérapie, qui ont permis l'amélioration de la survie chez de nombreux patients et dans de multiples localisations tumorales. Alors que les thérapies moléculaires ciblées (TMC) ont révolutionné l'approche de la prise en charge des cancers au stade métastatique.

Dans le CCRm le statut KRAS est prédictif de la réponse au traitement par des anticorps anti-EGFR. Il est devenu obligatoire de s'assurer de l'absence de mutation avant d'instaurer un traitement par anticorps anti-EGFR (Amado et *al.*, 2008).

De ce fait la recherche de facteurs pronostiques et prédictifs de réponse aux traitements devient un objectif majeur en cancérologie.

Dans cette optique, nous avons réalisé un travail dans le laboratoire d'anatomie pathologique et le laboratoire d'oncologie moléculaire fondamentale et appliquée du CPMC afin d'évaluer quelques marqueurs pronostiques et prédictifs chez des malades atteints de cancer colorectal.

Notre étude portée sur une série de 30 patients avait les objectifs suivant :

- la distinction entre les différents types histologiques du cancer colorectal (**par la technique histopathologique**).
- **une immunodétection (par IHC)** des deux marqueurs pronostiques « p53 et EGFR ».
- l'évaluation du statut KRAS en vue d'une prescription thérapeutique adaptée (Thérapie ciblée). **Par la technique de biologie moléculaire (PCR en temps réel)**.

Introduction

I.1 Rappels sur le colon – rectum :

I.1.1 Anatomie :

A. Le côlon :

Le côlon fait suite à l'intestin grêle au niveau de la valvule iléocœcale et se termine au niveau de la jonction rectosigmoïdienne. La longueur du côlon varie de 1,45 m à 1,65 m selon la taille de l'individu. (Christèle, 2008).

➤ **Les particularités morphologiques de chaque portion du côlon :**

- le **caecum** : légèrement dilaté, situé en bas et à droite de l'abdomen, auquel s'attache l'appendice.
- le **côlon droit** ou ascendant qui remonte vers le foie.
- le **côlon transverse** qui passe de droite à gauche devant l'estomac et remonte un peu sous les côtes gauches.
- le **côlon gauche** ou descendant qui redescend vers le bassin.
- le **côlon sigmoïde**, qui pénètre dans le bassin.

B. Rectum :

Le rectum est la partie terminale du tube digestif, il s'étend depuis le côlon sigmoïde auquel il fait suite niveau de la 3ème vertèbre sacrée jusqu' à l'orifice anal.

Il comprend 2 segments bien distincts : (Malle D, 2010).

1. Un segment pelvien ou ampoule rectale :

C'est un segment qui s'étend depuis la 3ème vertèbre sacrée qui correspond au point où les artères hémorroïdales supérieures abordent le rectum.

2. Un segment périnéal ou canal anal. Il s'agit en fait de la zone sphinctérienne entourée de 2 muscles, sphincter anal interne et sphincter anal externe.

Le canal anal s'étend sur un court trajet depuis le diaphragme pelvien des releveurs de l'anus en haut jusqu'à l'orifice anal en bas, a une forme cylindrique, long seulement de 3 cm. Il a un calibre extérieur de 2 à 3 cm (Malle D, 2010).

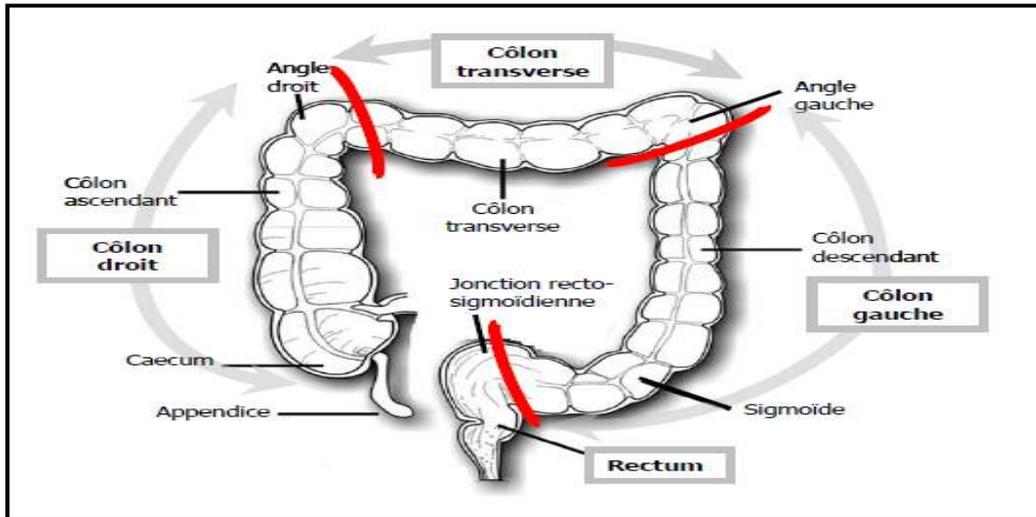


Figure 01 : Anatomie du côlon (Dolisi, 2013).

1.1.2 Histologie:

La paroi du côlon comprend 4 couches :

- **La muqueuse** : Sa surface est lisse, sans villosités, marquée seulement par les orifices des glandes de liberkühn. L'épithélium de surface et des cryptes est formé par une couche unicellulaire formée d'une part d'entérocytes, d'autre part de cellules caliciformes à mucus.
- **La sous muqueuse** : riche en plexus sanguins et lymphatiques, et en cellules lymphocytaires, Plasmocytaires, macrophages, éosinophiles..
- **La musculuse** à deux couches, une couche longitudinale externe (tenia coli), et une couche circulaire interne.
- **La séreuse** qui constitue le péritoine viscéral (Luillmann et *al.* ,2008).

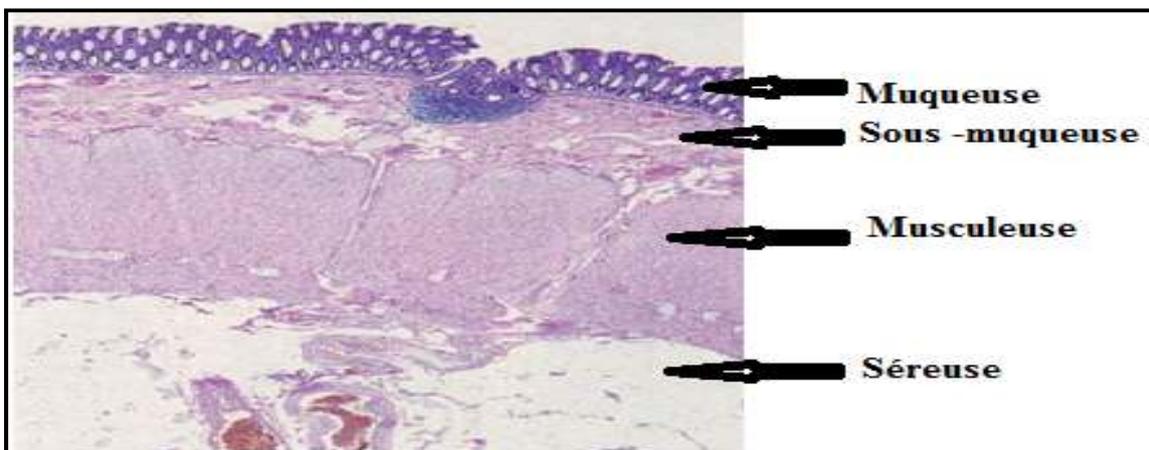


Figure 02 : Histologie de la paroi colique saine chez l'homme après coloration HE (Gr 20X) (INCa ; 2010).

I.2 Le cancers colorectal.

I.2.1 Epidémiologie :

Le cancer colorectal (CCR) est un problème majeur de santé en raison de sa fréquence et de sa gravité, il occupe le 3^{ème} rang dans le monde, et le second en termes de décès par cancer. Fréquent dans les pays occidentaux à haut niveau de vie (Amérique du nord – Australie – Europe), représente le deuxième cancer le plus fréquent en France, pour les deux sexes confondus. Il paraît plus rare dans les pays d'Asie et d'Afrique (Buech .B et *al* ; 2012).

En Algérie, son incidence paraît croissante et il représente le 2^{ème} cancer chez l'homme après le cancer du poumon et le 2^{ème} chez la femme après le cancer du sein (Registre du cancer, INSP, 2009).

I.2.2 Histoire naturelle du cancer colorectal :

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur maligne issue d'un processus complexe et néoplasique, il fait suite dans 60 % à 80 % des cas à une tumeur bénigne, appelée polype adénomateux ou adénome. Se développant à partir des épithéliums de revêtement intestinaux, sous forme d'une masse obstruant la lumière du colon ou du rectum. (Goldman ,2013).

La première étape du développement du cancer colorectal est l'apparition d'une hyperprolifération de l'épithélium colique.

Au plan morphologique la première anomalie décelable est le foyer de crypte aberrantes (FCA), il s'agit de crypte calibre élargi entourées d'un épithélium épaissi avec une mucosécrétion diminuée, ces FCA existent sous la forme d'une hyperplasie.

La plupart des CCR (90%) sont des adénocarcinomes et se développent à partir d'un Adénome (Goldman ,2013).

Adénocarcinome in situ : le développement d'un carcinome est d'abord superficiel, strictement intra-épithélial puis intramuqueux, sans franchissement de la lame basale et est désigné sous le terme **in situ** (Michaël et *al.* ,2004).

- ❖ **Adénocarcinome infiltrant** : le terme de carcinome invasif s'applique aux lésions entraînant une rupture de la lame basale dépassant la musculaire muqueuse, le carcinome s'étend ensuite progressivement en profondeur dans la paroi colique, dans la sous muqueuse dans la musculuse, puis dans la sous séreuse et la séreuse

(Michel, 2008).

I.2.3 les types histologiques du CCR :

a) La forme fréquente :

- **L'adénocarcinome lieberkuhnien**

L'adénocarcinome lieberkuhnien est la forme histologique la plus fréquente. Il s'agit d'une prolifération infiltrante de tubes ou de glandes dont le revêtement apparait cylindrique et basophile, avec pluristratification, atypies cytonucléaires et mitoses, ressemblant aux glandes de Lieberkuhn constituant la muqueuse normale du colon. On distingue des formes bien, moyennement ou peu différenciées (Rougier et *al.* ,2006).

b) Les formes histologiques particulières :

- **Adénocarcinomes mucineux (colloïde muqueux) :**

-Représente 10 à 15 % des adénocarcinomes colorectaux, définis par la présence de plus de 50% de la composante mucineuse (Rougier et *al.* ,2006).

- **Carcinome à cellules en « bague à chaton » :**

Appelé aussi carcinome à cellules isolées ou carcinome à cellules indépendantes.

-Il est rare, représente environ 1% de CCR (Morère et *al.* ,2011).

- **Carcinome épidermoïde :**

-Il est rare, constitué uniquement de cellules malpighiennes, de mauvais pronostic (Rougier et *al.* ,2006).

Carcinome adéno-squameux :

-Défini par la présence de nombreux foyers malpighiens ou séparés de la composante adénocarcinomateuse (Morère et *al.* ,2011).

- **Carcinome à petites cellules :**

-Il est constitué de cellules rondes ou ovales à cytoplasme peu abondant, noyau mono chromatine irrégulière et nucléole peu visible s'y associent des figures de mitose et d'apoptose (Morère et *al.* ,2011).

I.2.4 Classification des cancers colorectaux :

La classification TNM :

La Classification du cancer colorectal repose sur différentes classifications dont la classifications post opératoire Tumor Nodes Metastasis (pTNM) facteurs histopronostiques validé, qui permet la détermination de l'extension en profondeur de la tumeur dans et au-delà de la paroi digestive,

L'étude des tumeurs se fait selon 3 critères : taille et profondeur de la tumeur (T), atteinte ou non des ganglions lymphatiques et nombre des ganglions atteints (N), présence ou non de métastase (M) qui permettent de définir le stade du cancer (AJCC, 7^{ème} édition 2009). (Annexe 1)

.Classification en grade de différenciation (Mémento de pathologie, 3^{ème} édition 2009) :

Les carcinomes colorectaux sont gradés en 3 classes :

Grade 1 : bien différencié, contenant $\geq 95\%$ de structures glanduliformes.

Grade 2 : modérément différencié, contenant de 50 à 95% de structures glanduliformes.

Grade 3 : peu différencié, contenant $< 50\%$ de structures glanduliformes.

I.3 Facteurs de risque du cancer colorectal :

Le cancer colorectal est un processus multi factoriel, impliquant plusieurs facteurs de risque.

I.3.1 Facteurs génétiques :

a) Polypose adénomateuse familiale (PAF) :

La PAF est responsable de moins de 1 % des cancers colorectaux. Cette maladie est caractérisée par le développement de plusieurs dizaines ou centaines d'adénomes, tapissant toute la lumière intestinale. Il s'agit de mutations germinales qui siègent sur le bras long du chromosome 5 du gène APC de transmission autosomique dominante à pénétrance élevée. Ces cancers sont tous de phénotype LOH+,

Une mutation germinale biallélique du gène *MYH* a été mise en évidence chez des patients ayant un phénotype de PAF mais pas de mutation *APC*. Le gène *MYH* est un gène appartenant au système de réparation BER (base excision repair) de l'ADN. La transmission de cette anomalie se fait sous un mode autosomique récessif. (Sieber et *al.*, 2003).

b) Le cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) ou Syndrome de Lynch

Ce syndrome est défini cliniquement par les critères d'Amsterdam II de 1999 suivant (Faivre *et al.*, 2009).

- Au moins 3 sujets atteints de cancer appartenant au spectre étroit du syndrome HNPCC et histologiquement prouvé
- Unis 2 à 2 par un lien de parenté au 1er degré sur 2 générations
- Un des cancers au moins s'étant révélé avant l'âge de 50 ans

Affection génétique de transmission autosomique dominante résultant de mutations germinales touchant des gènes codant des protéines impliquées dans la réparation des erreurs de réplication de l'ADN MMR (Mis-Match Repair), les 2 principaux gènes impliqués sont les gènes hMSH2 et hMLH1, respectivement 31 % et 33 %. Plus rarement, les gènes PMS2 (4 %), PMS1 (2 %) et le gène hMSH6 (Laurent-Puig *et al.*, 2005, Buecher *et al.*, 2012).

Le diagnostic moléculaire du syndrome de Lynch est basé sur l'analyse des gènes touchés par la mutation : gène MSH2, gène MLH1, gène MSH6 (Vogel *et al.*, 2009). Les patients porteurs de la mutation peuvent développer un cancer du colon et du rectum, un cancer de l'endomètre, de l'estomac, de l'ovaire, de l'urothélium, ou des voies biliaires. (Olschwang S *et al.*; 2004).

I.3.2 les facteurs environnementaux :

Plusieurs études ont rapporté que l'alimentation joue un rôle très important dans le développement du cancer du colon. En effet, un apport calorique riche en graisses animales et l'obésité sont liées à une augmentation du risque du CCR. Par contre, on note un rôle protecteur par la consommation régulière de fibres (légumes, fruits, céréales) et par l'exercice physique régulier. Aussi, le tabagisme et l'alcool sont des facteurs d'apparition des adénomes favorisant l'augmentation de leurs tailles. Le risque d'être atteint d'un gros polype est dix fois plus élevé chez un sujet ayant fumé plus de 20 paquets par année plus de trois quart de litre de vin par jour (Morère *et al.*, 2011).

I.3.3 Maladies inflammatoires chroniques :

Chez les malades atteints de rectocolite hémorragique, le risque de CCR est multiplié par huit par rapport à celui de la population générale. Ce risque augmente avec la durée de l'évolution et devient significatif après dix ans d'évolution. Toutefois ces cas ne concernent que 1 à 2 % (Andrieu, 1991).

I.4 Physiopathologie du cancer colorectal.

On estime que plus de 90% des cas de cancer colorectal sont sporadiques.

I.4.1 Mécanismes moléculaires de la cancérogénèse :

À ce jour, trois principaux groupes de CCR sont définis suivant le type d'instabilité qui leur est associé :

- Les cancers LOH (loss of heterozygosity) ou CIN (chromosome instability):

Les CCR de type LOH représentent environ les trois quarts des CCR sporadiques et tous les CCR héréditaires développés sur polypose adénomateuse familiale (PAF). Ils sont définis par la perte de chromosome(s) ou des fragments de chromosomes. Le type LOH est caractérisé par une aneuploïdie des cellules, des pertes alléliques fréquentes, des mutations fréquentes des gènes *APC* (adenomatous polyposis coli), *KRAS* et *P53*, une localisation préférentielle dans le côlon distal et un mauvais pronostic (Svrceka et al. ,2011).

- Les cancers MSI (microsatellite instability) ou MIN (microsatellite instability) :

Sont caractérisés par une instabilité des séquences répétées de type microsatellite, MSI résultant de l'inactivation du système de réparation des mésappariements des bases. Chez l'homme, six gènes impliqués dans ce système ont été identifiés : *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hMSH3*, *hPMS2* et *hMLH3*. L'instabilité génétique à la réplication est présente dans 15 % des cancers colorectaux. Dans le cadre des CCR sporadiques, la cause de ce phénotype est une hyperméthylation du gène *hMLH1*, alors que dans le syndrome de Lynch, l'altération du système MMR est secondaire à une mutation inactivatrice constitutive d'un des gènes suivants : *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6* et *PMS2*. Dans Les tumeurs MSI+ L'inactivation du système MMR conduit à l'accumulation de mutations secondaires qui vont inactiver de nombreux gènes (*BAX*, *TGFR11*, les facteurs de transcription TCF-4 ou E2F4) aboutissant à la transformation de la cellule (Lamoril et al. ,2009).

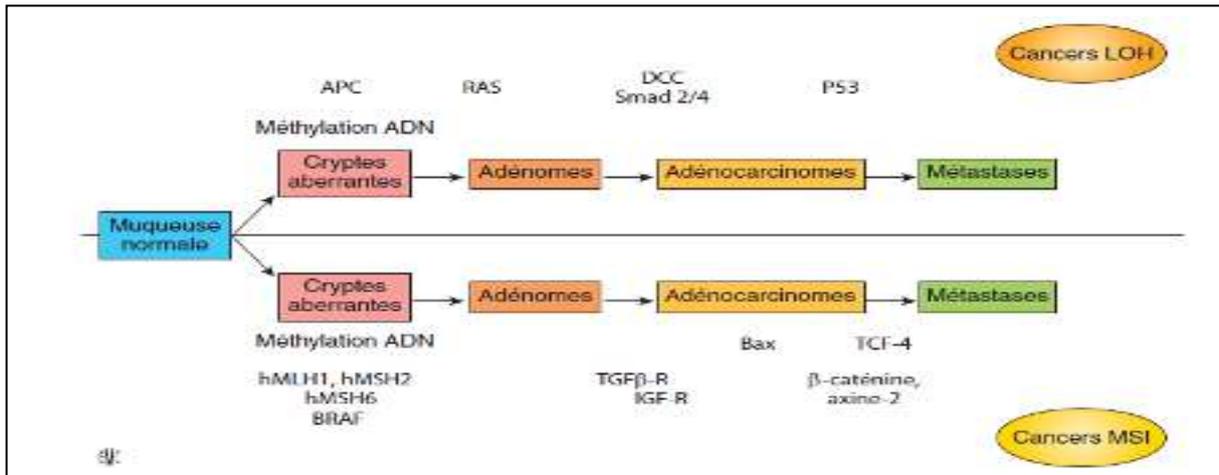


Figure 03 : Deux mécanismes de carcinogenèse colique (Aparicio, 2007).

- Les cancers CIMP (CpG island methylator phenotype):

Des dinucléotides CpG regroupés en îlots sont retrouvés dans les régions promotrices pour la moitié des gènes. Ces îlots CpG peuvent inactiver un gène en empêchant sa transcription si leur cytosine est méthylée (Svrceka et al. ,2011).

Dans le CCR, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs peuvent ainsi être inactivés conduisant à ce phénotype CIMP (*CpG Island Methylation Phenotype*) (Issa, 2004).

La méthylation du gène *hMLH1* responsable d'une inactivation du système MMR et donc d'un phénotype MSI rentre également dans ce cadre expliquant la possibilité de tumeur MSI+/CIMP+. La plupart des CCR sporadiques présentant un phénotype MSI surviennent chez des individus âgés, sont associés à des mutations de *BRAF* et à un phénotype CIMP+ (Svrceka et al. ,2011).

Chapitre I : Etude bibliographique

I.5. Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse colorectale :

I.5.1. voie du $TGF-\beta$:

Le transforming growth factor b ($TGF\beta$) activé se lie au récepteur de type II du $TGF\beta$; il se forme alors un complexe protéique avec le récepteur de type I du $TGF\beta$. Ce complexe phosphoryle SMAD2 qui forme alors un hétérodimère avec SMAD4 (Parsons et al. ,1995).

Le complexe SMAD2/SMAD4 est transloqué dans le noyau et induit la transcription de gènes qui inhibent le cycle cellulaire, notamment le gène *MTS2*.

Des mutations inactivatrices des gènes suppresseurs de tumeur *SMAD2* et *SMAD4* localisé sur le chromosome 18 sont mises en évidence dans plus de 25 % des cancers colorectaux LOH+ (Souza et al. ,1996). Mais surviennent tardivement lors de la transformation de l'adénome en carcinome.

Cette voie de signalisation est activée dans 20 à 30 % des CCR de phénotype CIN par mutations inactivatrices des gènes SMAD2 et SMAD4. Elle est également impliquée dans les CCR de phénotype MSI dans 60 à 80 % des cas. Ainsi, cette voie de signalisation est inactivée dans les deux types du CCR, quasi systématiquement dans les cancers de phénotype MSI+ et plus rarement parmi les phénotypes CIN+ (Laurent-Puig et al. ,2010).

Dans les cancers MSI+, une inactivation bi-allélique du gène du récepteur de type II du $TGF\beta$ est observée dans la majorité des cas. Toujours dans les tumeurs MSI+, en l'absence de mutation du gène du récepteur de type II du $TGF\beta$ ($TGF\beta$ -RII), des mutations du récepteur à l'insuline (IGF-IIR) mutuellement exclusives avec celles du récepteur de type II du $TGF\beta$ ont été décrites (Parsons et al. ,1995).

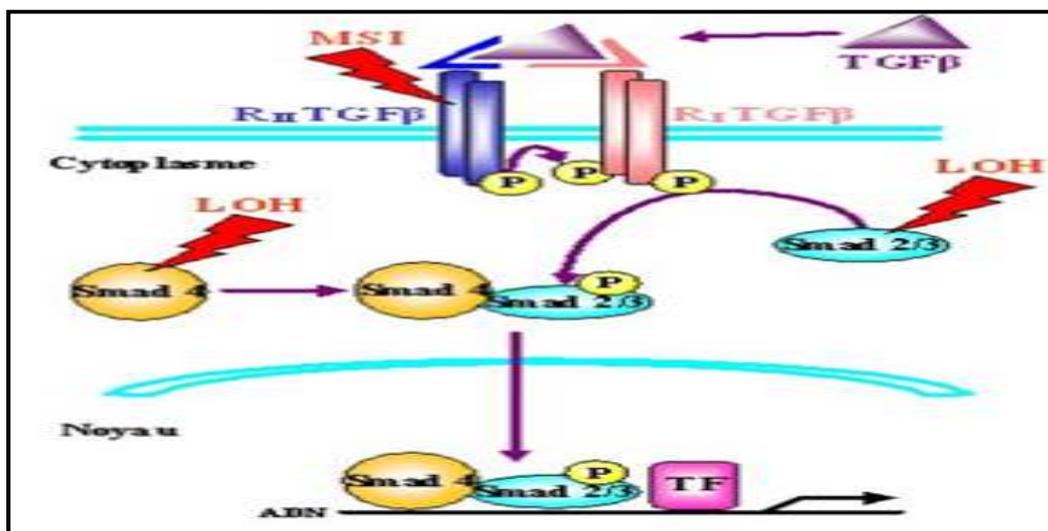


Figure 04 : la voie du $TGF-\beta$ (Parsons et al. ,1995)

Chapitre I : Etude bibliographique

I.5.2 Voie APC/B-Caténine /TCF :

Le gène APC est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine APC à multiples fonctions, sa fonction principale étant d'exercer un contrôle négatif du taux et de l'activité de la β caténine. En effet, en l'absence de signal mitotique, la protéine APC forme un complexe cytoplasmique avec la β caténine, l'axine et une sérine-thréonine glyco-gène-kinase (GSK 3 β). La GSK 3 β permet la dégradation de la β caténine via le protéasome (Aparicio ,2007).

Lorsqu'il y a activation du proto-oncogène WNT, la GSK 3 β est inhibée et la β caténine s'accumule dans le cytoplasme et forme un complexe avec le facteur de transcription TCF 4. Ce complexe est alors transloqué dans le noyau où il y a transcription des gènes qui permet la prolifération cellulaire dont l'oncogène c-MYC. Au cours de la prolifération maligne, le complexe β caténine-TCF 4 est activé de manière automatique conduisant à la prolifération des cellules épithéliales coliques vers la surface des cryptes intestinales qui deviennent alors des cryptes aberrantes, premières lésions pré-néoplasiques.

La voie de signalisation WNT est activée dans les 2 phénotypes de cancers colorectaux LOH+ et MSI+. Dans les cancers LOH+, il s'agit principalement d'une inactivation biallélique du gène APC, et dans les cancers MSI+, il s'agit de mutations activatrices du gène de la β -caténine ou de mutation inactivatrice du gène axine 2 (Aparicio, 2007).

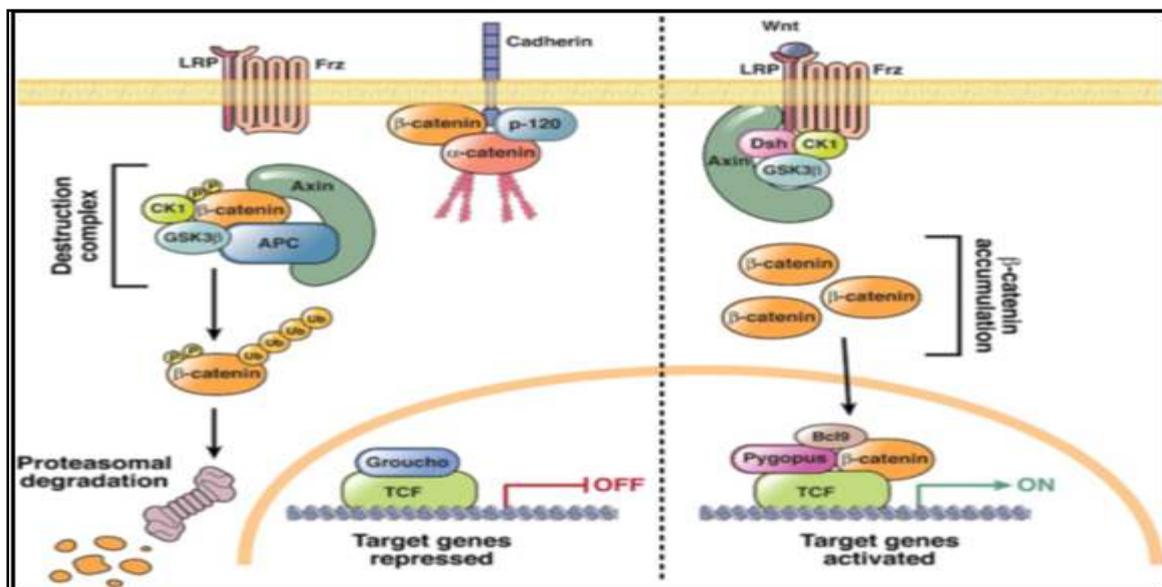


Figure 05 : Voie WNT/wingless ou voie APC/b-caténine (Lefèvre, 2012).

I.5.3 La voie de L'EGFR :

Les récepteurs EGFR sont des molécules transmembranaires permettant à partir de signaux extracellulaires, la transmission d'informations, dont la transduction intracellulaire, provoque un ensemble de processus métaboliques comme la croissance cellulaire, la différenciation, la survie, la progression du cycle, l'angiogénèse et la réponse aux médicaments.

Les EGFR (appelés aussi erbB1 ou HER1) sont des membres de la famille erbB de récepteurs tyrosine kinase comprenant entre autres, erbB2 (HER2/neu), erbB3 (HER3) et erbB4 (HER4). L'EGFR est une glycoprotéine de 170 kDa codée par le protooncogène c-erbB1 situé sur le chromosome 7q22 (Svrceka et al. ,2011).

Comme de nombreux récepteurs transmembranaires, les EGFR sont composés

- d'un domaine de fixation extracellulaire.
- d'un domaine lipophile transmembranaire.
- d'un domaine tyrosine kinase intracellulaire.

Plusieurs ligands se fixent sur ce dernier :

Epidermal growth factor (**EGF**), Transforming growth factor alpha (**TGF-alpha**),

L'amphiréguline, la betacelluline. L'épiréguline. NRG2-alpha (neuregulin 2) ,l'heparinbinding EGF.

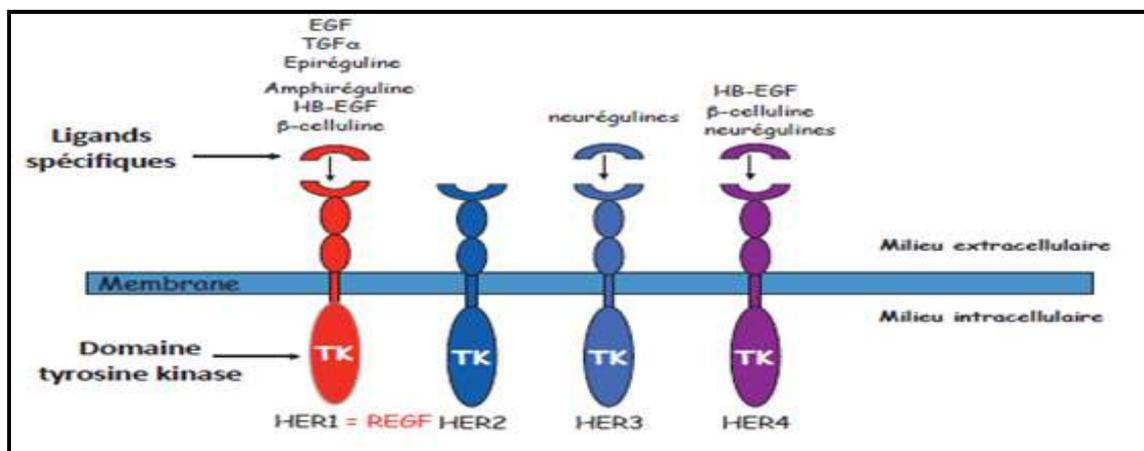


Figure 06 : La protéine EGFR (Lièvre et al. ,2010)

La fixation du ligand sur le récepteur entraîne, après homo- et/ou hétérodimérisation de ce récepteur avec d'autres récepteurs de la famille ErbB tels que HER2, l'activation de ce dernier par phosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire (Svrceka et al. ,2011).

Chapitre I : Etude bibliographique

Ces résidus phosphorylés servent de site d'amarrage pour un certain nombre de protéines intracellulaires contenant un domaine Src homology-2 (SH2) capable de reconnaître ces tyrosines phosphorylées. Ces protéines à domaine SH2 jouent donc un rôle central dans la transmission des signaux intracellulaires, raison pour laquelle on les retrouve dans la plupart des voies de signalisation : il s'agit du complexe Grb2/hSos qui active la protéine RAS dans la voie des RAS/MAPK et de la protéine PI3K qui phosphoryle certains lipides membranaires (Svrceka et *al.*, 2011).

La transduction du signal en intracellulaire est activée. Elle est essentiellement assurée par 2 voies : (Herbst, 2002)

- Ras-raf-MEK-ERK (voie des MAP kinase)
- PI3K/PTEN/AKT

a) Voie Ras /Raf /MAPK

La famille des proto-oncogènes *RAS* comprend trois gènes bien caractérisés *HRAS*, *NRAS* et *KRAS*. Les protéines issues de ces gènes ont un poids moléculaire de 21 000 daltons, d'où leurs noms p21. Elles sont localisées à la face interne de la membrane cytoplasmique, ancrées dans la couche phospholipidique membranaire par leur extrémité C terminale. Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases (Svrceka et *al.*, 2011).

L'activation de la voie des MAPK, également appelée « ERK » (Extracellular signal Regulated Kinase), débute par l'activation et le recrutement à la membrane par RAS de la protéine RAF-1. Cette première protéine kinase est responsable de l'activation par phosphorylation de la MAPK-kinase ou MEK (MAPK-ERK-Kinase). À son tour, MEK active de manière hautement spécifique, par double phosphorylation, ERK, ce qui entraîne sa translocation au niveau du noyau et l'expression de gènes précoces codant pour des facteurs de transcription (*c-FOS*) et autres (*c-MYC*, *c-JUN* ou *JUNB*) qui, à leur tour, stimulent l'expression d'un grand nombre de gènes, en particulier ceux de la cycline D1 et de cdk6 ayant un rôle majeur dans l'initiation du cycle cellulaire en G1 (Lièvre et *al.*, 2010)

b) Voie PI3K/Akt : phosphatidylinositol-3-kinase

Il existe 3 classes de PI3K mais seule la PI3K I est activée par les récepteurs à activité tyrosine kinase. L'enzyme est constituée d'une sous-unité régulatrice de 85-kDa (p85) et d'une sous-unité catalytique de 110-kDa (p110).

- p110, phosphoryle la partie D3 des phospho-inositols membranaires, ce qui aboutit à la formation de lipides tels que le PI3-phosphate PI(3) P, le PI3, 4-biphosphate PI(3,4) P₂ et le PI3, 4,5-triphosphate PI(3,4,5)P₃. Ces lipides sont à l'origine de l'initiation de nombreuses réponses cellulaires (Dreyer et al. ,2009).

Ainsi la formation de PIP₃ par la PI3K permet la liaison de la protéine sérine-thréonine kinase PKB. L'interaction avec le PIP₃ induit un changement conformationnel de la PKB et permet son association avec PDK1 qui la phosphoryle et l'active.

Réponses cellulaires consécutives à l'activation de la PKB

- stimulation de la survie cellulaire en inhibant l'activité d'une protéine pro-apoptotique (Bad), par phosphorylation.

- stimulation de la synthèse protéique lors de la croissance cellulaire en activant indirectement la protéine sérine-thréonine kinase mTOR qui active la p70S6K (S6kinase). Cette dernière phosphoryle la protéine S6 de la sous-unité 40S des ribosomes ce qui a pour conséquence d'augmenter la traduction des ARNm (Dreyer et al. ,2009).

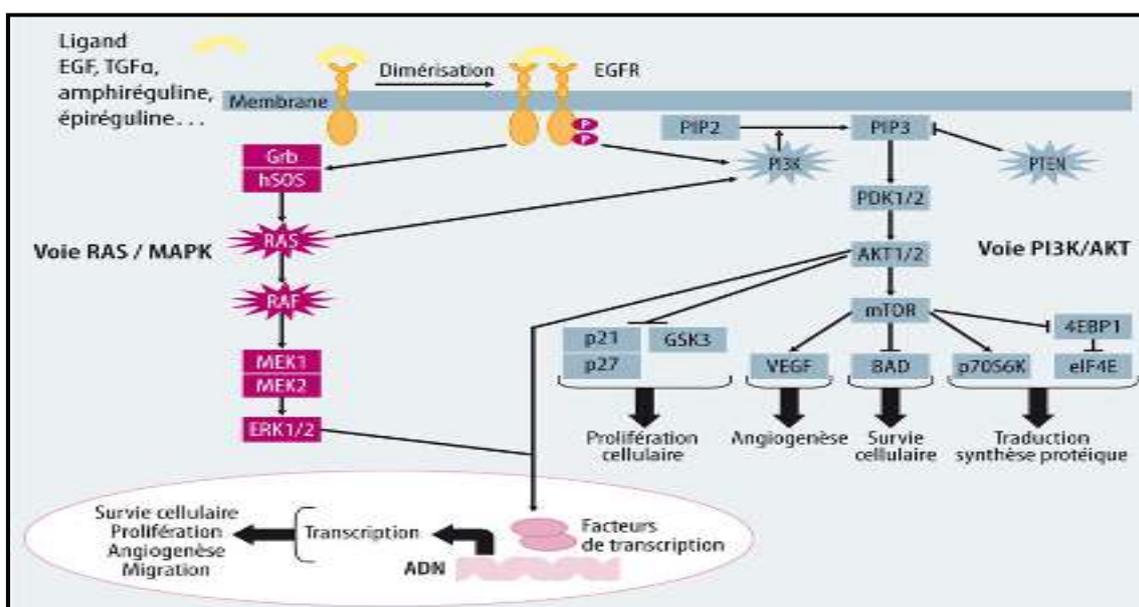


Figure 07 : Représentation schématique de la voie de l'EGFR (Ras et PI3K), d'après (De Roock et al. ,2010).

Chapitre I : Etude bibliographique

I.5.4. La voie P53 :

Le gène suppresseur de tumeur TP53 situé en 17p est invalidé à la fois par des pertes alléliques et des mutations ponctuelles. Ces anomalies surviennent tardivement dans la séquence adénome-cancer.

La protéine p53 régule de façon négative le cycle cellulaire et de façon positive la mort cellulaire programmée (apoptose). La survenue d'une altération de l'ADN dans une cellule en cycle stabilise la protéine p53 qui arrête les cellules en phase G1 (G1-S checkpoint) par l'activation de protéines inhibitrices de transcription telle que la p21. Cet arrêt permet la réparation de l'ADN avant la phase S. Toutefois, si les altérations sont trop importantes pour être réparées, la p53 induit l'apoptose par la transcription des gènes comme le gène BAX (Bcl-2 associated X protein). Ainsi, la mutation du gène TP53 est un point de non retour pour la cellule cancéreuse (Nancy *et al.* ,2000).

Le gène TP53 est muté dans environ la moitié des cancers colorectaux LOH+. D'autre part, le gène BAX est le siège d'altérations dans près de 50 % des tumeurs MSI+ (Aparicio ,2007).

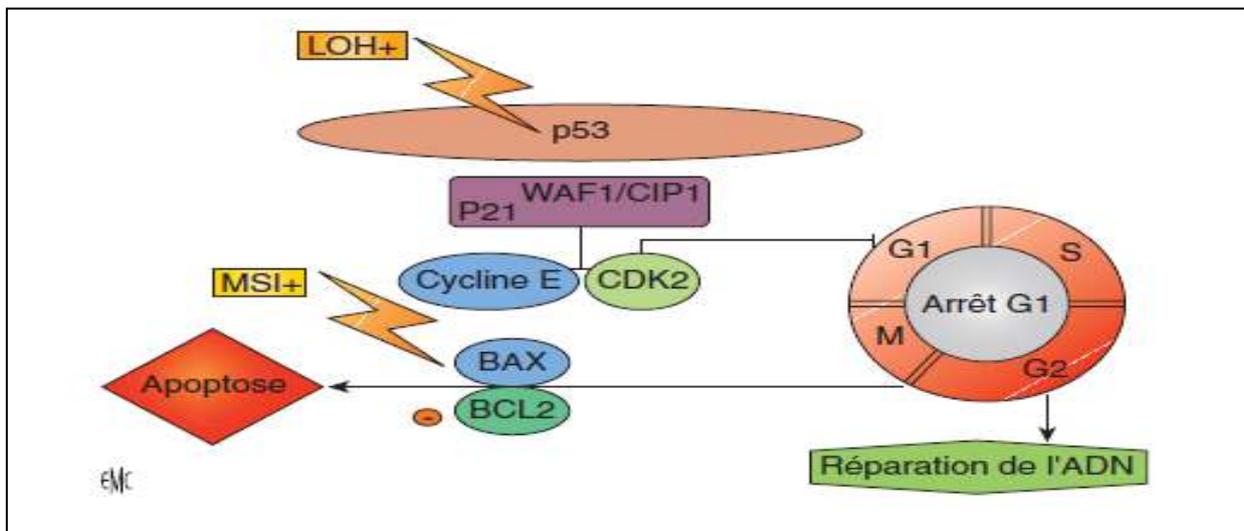


Figure 08 : La Voie de p53 (Aparicio ,2007).

Chapitre I : Etude bibliographique

I.6 Les facteurs pronostique et prédictifs du cancer colorectal :

Sont des facteurs de prévision ou d'une prédiction de l'évolution probable de la maladie, de l'issue du traitement et du risque de récurrence.

Facteurs pronostiques : Témoin dont l'état initial est associé à la survie sans rechute ou à la survie globale indépendamment de la thérapeutique utilisée (Giacchetti S, 2010).

Facteurs prédictifs : Témoin dont l'état initial est associé avec la réponse ou l'absence de réponse à un traitement donné. Une démonstration d'interaction est nécessaire pour le valider (Giacchetti S, 2010).

I.6.1 Les facteurs pronostiques :

➤ **La surexpression d'EGFR**

L'EGFR est exprimé dans toutes les cellules de l'organisme, ainsi que dans de nombreuses tumeurs, notamment d'origine épithéliale. Ainsi, l'EGFR est exprimé dans 60 à 80 % des cancers colorectaux (Goldstein et al. ,2009).

La surexpression d'EGFR est observée dans de nombreuses tumeurs (cancers colorectaux, cancer du poumon, cancer du pancréas, cancer de la tête et du cou, cancer du sein, etc.). Cette surexpression est corrélée à un mauvais pronostic et une moins bonne réponse en chimiothérapie. Donc elle est associée à un pronostic négatif (Rougier et al. ,2009).

➤ **La surexpression p53 :**

La TP53 est un gène suppresseur de tumeur codant pour une protéine p53.

Les études récentes sont controversées sur l'intégration de la p53 comme un facteur pronostique indépendant. Les mutations du gène TP53 marquent la transition de l'adénome au cancer et sont détectées dans plus de 50% des CCR sporadiques (Chraïbi et al. ,2011).

La protéine p53 est détectée en immunohistochimie. En cas de mutation du gène TP53, la protéine p53 a une demi-vie plus longue et devient détectable par immunohistochimie

(Chraïbi et al. ,2011).

Chapitre I : Etude bibliographique

❖ Autres facteurs pronostiques dans le cas du cancer Colorectal.

La connaissance des facteurs pronostiques cliniques et histopathologique des CCR peut être utile dans la décision thérapeutique. Des nombreux facteurs pronostiques sont connus, d'autre sont en cours d'évaluation, nous citerons les plus importants.

• Variables sociodémographiques :

L'âge est un facteur indépendant de mauvais pronostic pour le cancer du colon, le risque de mortalité spécifique ajusté au stade du diagnostic est de 30% supérieur pour les malades âgées de 60 à 74 ans, par rapports aux malades plus jeunes (Roncucci et *al.* ,1996).

• Critère cliniques :

Le stade d'extension au diagnostic est le facteur pronostique majeur : les résections sont réalisées aux stades (Rochaix et *al.* ,2005).

• Le degré de différenciation :

L'histopronostique du cancer colorectal se propose d'établir une certaine estimation de son agressivité, ou degré de malignité fondée sur :

-La différenciation des cellules tumorales (peu, moyennement, bien différencié)

-L'invasion vasculaire (Rochaix et *al.* ,2005).

Envahissement ganglionnaires :

C'est le facteur pronostique majeur. La découverte de ganglion métastatiques grève le pronostic : celui-ci est d'autant plus défavorable que le nombre de ganglions envahis est élevé (Greene et *al.* ,2002).

I.6.2 Les facteurs prédictifs dans le cancer colorectal métastatique.

I.6.2.1 Le gène *KRAS* :

Le gène *KRAS* cloné chez l'être humain en 1982, localisé sur le chromosome 12 (12p12.1), code pour une protéine de 21 kD environ. Constitué de six exons et mesurant 38 kb, il code pour deux isoformes différant par leur partie C-terminale par épissage alternatif de l'exon 5 (Lamoril et al. ,2009).

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

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

❖ Parmi les facteurs prédictifs de réponse au traitement utilisés dans le cas du cancer Colorectal, la mutation du gène *KRAS* est la plus étudiée.

I.6.2.2 Les mutations *Kras* dans les cancers colorectaux :

Dans les cancers non héréditaires du côlon, 40 % des tumeurs possèdent une mutation sur le gène *KRAS* (Heinemann et al. ,2008).

Il s'agit des mutations somatiques acquises et donc non héréditaires. 40 à 90 % de ces mutations sont situées sur les codons 12 et 13 du gène codant pour *KRAS* (70 % pour le codon 12 et 30 % pour le codon 13. Dans quelques cas, on en retrouve au niveau des codons 61 et 63. Plus rarement encore, d'autres mutations sont retrouvées ailleurs sur le gène *KRAS* (par exemple, au codon 59) (Rouleau et al. ,2008).

Les types les plus fréquents des mutations de *KRAS* dans les cancers colorectaux sont des transitions de G à A et G- à -T transversions (Santini et al. ,2008).

Les mutations sur le gène *KRAS* jouent un rôle fondamental dans l'activation de la protéine *KRAS* mutée et la progression du cancer colorectal (Viguié et al. ,2013).

I.7 Prise en charge des cancers colorectaux :

1. Chirurgie :

La chirurgie représente le principal traitement du cancer colorectal. L'intervention consiste en l'ablation du segment de côlon concerné. S'il s'agit d'un cancer rectal, le chirurgien réalise l'ablation du rectum en préservant si possible le sphincter (INCa ; 2008).

2. Radiothérapie :

Il est possible d'irradier la tumeur pour tuer les cellules cancéreuses, avant ou après une intervention chirurgicale. Elle est utilisée pour un cancer du rectum (INCa ; 2008).

3. Traitement médicamenteux :

a) Chimiothérapie :

Des médicaments standards sont habituellement utilisés pour traiter les différents stades du cancer colorectal. La chimiothérapie consiste en l'utilisation des médicaments anticancéreux

Le traitement chimiothérapeutique peut être donné avant ou après la chirurgie. On peut y avoir recours :

- 1) Avant la chirurgie (chimiothérapie néoadjuvante) et on l'associe parfois à la radiothérapie. Pour réduire la taille d'une tumeur, il est bénéfique aux personnes dont la tumeur au rectum se trouve près du sphincter anal.
- 2) Après la chirurgie afin de détruire toutes les cellules cancéreuses microscopiques restant après l'intervention et de réduire ainsi le risque de réapparition du cancer (Chimiothérapie adjuvante).
- 3) Pour aider à ralentir et à contrôler le cancer lorsqu'il s'est propagé à des organes distants. Il s'agit de ce qu'on appelle une « chimiothérapie palliative » dont l'objectif est de contrôler les symptômes et de prolonger la vie, mais en définitive le cancer est incurable (INCa ; 2008).

b) Les thérapies ciblées :

Les thérapies dites « ciblées » constituent une évolution majeure de ces dernières années en cancérologie en général et en cancérologie digestive en particulier. Ces thérapeutiques sortent du cadre habituel de la chimiothérapie anticancéreuse.

Ces thérapies ciblées sont aujourd'hui des molécules incontournables dans la prise en charge du cancer colorectal métastatique (CCRM). Seuls les anticorps monoclonaux, associés à la polychimiothérapie conventionnelle, ont prouvé leur efficacité : ces molécules ciblent le vascular endothelium growth factor (VEGF) circulant et EGFR (Cacheux et *al.*, 2011).

Chapitre I : Etude bibliographique

➤ Les anticorps anti-EGFR :

Les anticorps anti-EGFR ont démontré une certaine efficacité. Sont des inhibiteurs des EGFR. En se fixant sur leur cible, ils provoquent l'internalisation d'EGFR et sa dégradation (André, 2009).

- Il existe deux inhibiteurs commercialisés pour le traitement des cancers colorectaux :
- **cetuximab (Erbix®)** : anticorps monoclonal chimérique IgG1 souris/ homme ciblé contre le domaine extracellulaire d'EGFR.

La fixation de la molécule à sa cible empêche la fixation de son ligand, induit l'internalisation du récepteur, sa dégradation et une inhibition directe du récepteur tyrosine kinase. Ce blocage inhibe la transduction du signal des voies PI3K/Akt et RAS-RAF/MAPK (Rivera et al., 2008).

- **Le panitumumab** : est un anticorps humain anti-EGFR, de type IgG2.

➤ Anticorps anti-VEGF :

Le **bévacizumab (Avastin®)** est un anticorps humanisé dirigé contre le VEGF. Il bloque la croissance des nouveaux vaisseaux et réduit la densité vasculaire tumorale.

La mutation du gène *KRAS* est en revanche validée comme facteur de non-réponse, voire comme facteur délétère, en cas d'utilisation d'inhibiteurs d'EGFR, limitant donc son utilisation aux tumeurs porteuses du gène *KRAS* sauvage (Dreyer et al., 2009).

Par cascade en chaîne, l'activation chronique de la protéine RAS active les autres voies métaboliques (PI3K et MAP kinase notamment) aboutissant à la transformation maligne (Sabourina et al., 2009).

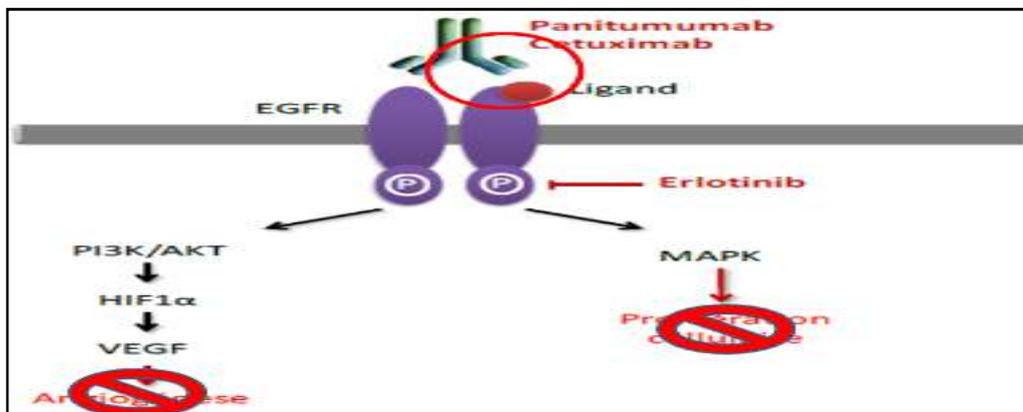


Figure 09 : Mécanisme d'action de l'inhibiteur de voie de signalisation EGFR

(Mélin, 2012).

II .1. Matériel

II .1.1 patient:

Il s'agit d'une étude rétrospective s'étendant du 01 Mars à Août 2014 réalisée au niveau de laboratoire d'anatomie pathologique et du laboratoire d'Oncologie Moléculaire Fondamentale et Appliquée (LOMFA) du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC).

Cette étude a été réalisée sur 30 échantillons tumoraux provenant des patients opérés d'un cancer colique ou rectal à des stades avancés et différentes grades de différenciations.

Une étude histopathologique et immunohistochimique ont été réalisées sur l'ensemble des cas.

- L'étude immunohistochimique avait pour but l'immunodétection de deux marqueurs tumoraux EGFR et p53.

L'étude de biologie moléculaire concerne 11 cas de cancer colorectal métastatique (CCRm).

- Elle consiste l'évaluation du statut KRAS par PCR en temps réel.

II.1 .2 Matériel non biologique :(Annexe II)

II.2.Méthodes :

Trois techniques ont été réalisées

II .2.1 Technique anatomo-pathologique :

Des pièces opératoires colique et rectales du service de chirurgie ont été réceptionnées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC, accompagnées d'une fiche de renseignements comprenant les caractéristiques suivantes l'âge des patients, le sexe, le site tumoral, et un numéro d'enregistrement leur est attribué.

II .2.1.1 Examens macroscopique:

L'étude macroscopique consiste à mesurer la taille de la tumeur et à rechercher les ganglions atteints. Les prélèvements effectués sont déposés dans des cassettes en plastique sur lesquelles est inscrit le numéro d'enregistrement accompagné d'un chiffre romain pour chaque parité prélevée.



Figure10 : pièce de résection colique gauche plus Transverse de 60cm fixé au formol (la tumeur est de couleur blanchâtre).

- **Les étapes de l'étude macroscopique :**
a) **Fixation :**

Les prélèvements sont déposés dans un liquide fixateur (solution de formaldéhyde à 10%).

La fixation a pour but la conservation des structures tissulaires et des déterminants antigéniques, une bonne fixation empêche l'autolyse et la putréfaction des tissus.

C'est une étape primordiale faisant appel à plusieurs facteurs :

- Le temps car la fixation doit s'effectuer dans les plus brefs délais,
- La quantité du fixateur doit être suffisante (10x le volume du prélèvement),
- Un temps minimum, permettant au fixateur de pénétrer dans le tissu 24 heures jusqu'à 48 heures pour les grandes pièces.

b) Circulation :(voir annexe IV)

Elle est réalisée à l'aide d'un automate en trois étapes et dure 24 heures.

b.1) Déshydratation :

Le fixateur contenant de l'eau rend l'organe mou après fixation. Ce dernier doit donc être entièrement déshydraté pour une bonne inclusion dans la paraffine et l'obtention des coupes.

L'eau est remplacée par l'alcool à raison de trois bains successifs:

- Un bain d'alcool 70° (2heure)
- Deux bains d'alcool 95° (2heure chacun)
- Trois bains d'alcool 100° (2heure chacun)

Chapitre II : Matériels et méthodes

b.2) Eclaircissement : Remplacement de l'éthanol par un solvant miscible à la paraffine dans trois bains de xylène (2heure chacun) pour l'obtention d'un tissu plus transparent.

c.3) Imprégnation à la paraffine :

Pénétration de la paraffine dans les tissus dans 3 bains chaque bain dure 2 heure de temps pour l'obtention des tissus plus rigides.

C) Enrobage et inclusion : (voir annexe IV)

L'étape de l'enrobage suit celle de la circulation, elle consiste à inclure le tissu imprégné dans un bloc fait de milieu d'inclusion

- Les prélèvements ayant séjourné dans la paraffine liquide sont inclus dans un bloc de paraffine comme suit
- Le moule préchauffé dans une console thermique (60°)
- Les fragments tissulaires places et orientés dans les moules à moitié empli de paraffine
- Les parties des cassettes numérotées sont plaqués sur les fragments tissulaires suivies par le remplissage des moules sur une plaque froide. Les blocs sont décollés facilement, conservés au congélateur au paillasse a réfrigéré de 4°C, sont prêts à être débités en coupes minces.

Confection des coupes : (voir annexe IV)

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur mis dans un bain Marie à 37C° puis étalés sur lames.

Les lames sont mises dans l'étuve à 65°C dont le but d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes.

II.2.1.2. Technique de coloration à l'hématoxyline – Eosine (HE) :

• **Principe :**

Il s'agit d'une coloration topographique de routine permettant l'identification des noyaux, du cytoplasme. Cette technique associe une coloration nucléaire en bleu grâce à l'hématoxyline de Harris (colorant basique) et une coloration rose du cytoplasme grâce à l'éosine (colorant acide).

➤ Mode opératoire :

Avant d'effectuer la coloration, les coupes subissent une étape de déparaffinage et de réhydratation.

- **Déparaffinage** se fait dans trois bains de xylène (5 minutes chaque bac), pour déparaffiner.
- **Réhydratation** dans 4 bains d'éthanol de concentration décroissante (1 min par bac) pour réhydrater.
- **Coloration à l'hématoxyline de Harris** dans 1 bain de 3min puis rinçage à l'eau courante, pour colorer les noyaux en bleu.
- **Coloration à l'éosine** 1 bain pour 1min, rincer à l'eau courante, pour colorer le cytoplasme en rose.
- **Déshydratation** un bain de éthanol de concentration croissante pour déshydrater.
- **Eclaircissement** se fait dans un bain xylène pour éclaircir les tissus.
- **Montage des lames** dépôt d'une goutte du milieu de montage Eukitt , recouvrir à l'aide d'une lamelle .

II .2.2 Technique immunohistochimique :

Cette technique a été également faite au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC.

II.2.2.1. Principe :

L'immunohistochimie consiste à mettre en évidence divers antigènes (Ag) cellulaires, ou extracellulaires, grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux, sur des coupes de tissus fixés, et inclus en paraffine. Les Ag recherchés peuvent être des Ag membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires, ou des protéines de la matrice extracellulaire

(Genton CY. 2010).

Intérêt :

- Localisation précise de certaines protéines
- Etude de leur lieu de synthèse et leur compartimentation
- Observation de leur cheminement cellulaire ou tissulaire, transport membranaire...
- Evaluation de leur expression.

Chapitre II : Matériels et méthodes

Dans notre travail, la substance antigénique recherchée l'EGFR est la protéine suppressive de tumeur p53.

Le système En Vision+HRP est une technique de révélation de marquage, extrêmement sensible et qui s'effectue en deux étapes :

- 1) Adjonction d'un polymère (Dextran), marqué à la peroxydase de **Raifort HRP** conjugué aux anticorps secondaires qui se lient à l'anticorps primaire.
- 2) Adjonction d'un substrat chromogène 3-3 diAminoBenzidine (DAB).

La peroxydase, qui a pour substrat le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), oxyde la DAB et donne un précipité brun dans le milieu de réaction.

❖ Révélation de la technique IHC

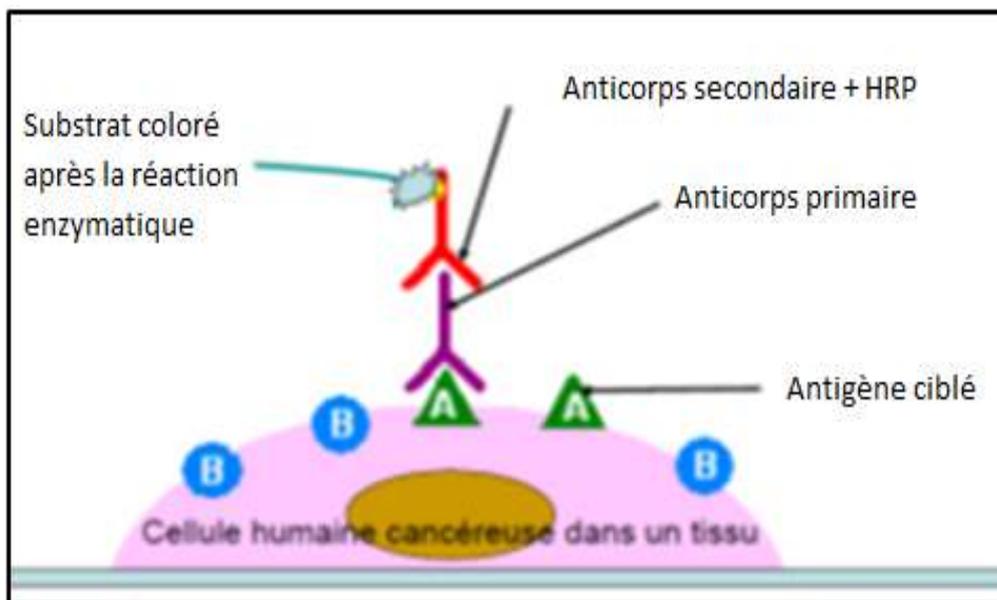


Figure 11 : Immunomarquage (système de révélation EnVision).

II.2.2.1 mode opératoire :

a) mode opératoire de la p53

- **Coupes tissulaires** : des coupes de 1 à 2 μm sont réalisées, à partir des tumeurs rectales ou coliques à l'aide d'un microtome et sont étalées sur lames silanisées pour éviter le décollement des tissus lors de la manipulation.
- **Incubation** : L'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h pour une meilleure adhésion des tissus sur lame.
- **Déparaffinage et réhydratation** :
 - Les lames sont plongées dans 3 bains (5 min chacun) de xylène pour déparaffiner, puis dans 3 bains d'éthanol de concentration décroissante (5 min chacun) pour réhydrater.
 - Les lames sont rincées par l'eau distillée.
- **Démasquage antigénique** :
 - Les lames sont plongées dans la solution TRS pH =9 préchauffée dans un bain marie entre 97 et 99°C pendant 40 minutes.
 - Puis elles sont laissées refroidies sur la paillasse à température ambiante pendant 20 minutes pour le démasquage des antigènes. Après sont rincées à l'eau distillée.
- **Blocage de la peroxydase endogène**
 - La zone étudiée est délimitée à l'aide du DAKO Pen (hydrophobe et insoluble dans l'acétone et l'alcool).
 - Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par l'action de la peroxydase block (H_2O_2) (5 minutes).
 - Les lames sont rincées à l'eau distillée puis au PBS (phosphate buffered saline) 5 minutes chacune.
- **Application de l'anticorps primaire**
 - 200 μl d'anticorps primaire Monoclonal mousse Anti-humainp53 protéine Clone Do-7 est déposé sur les tissus encadrés (30 minutes) dans une chambre humide et obscure.
 - Les lames sont rincées 2 fois par la solution de PBS 5 minutes pour chacun.

Chapitre II : Matériels et méthodes

- **Application de l'anticorps secondaire**

- Le système labellé polymère HRP RABBIT/MOUSE En Vision (DAKO) est appliqué suffisamment et incubé pendant 30 minutes.

- Les lames sont rincées au PBS (2 fois 5 minutes).

- **Révélation :**

- Le chromogène-substrat DAB est déposé et incubé pendant 5 minutes. L'enzyme dégrade le substrat DAB, le produit qui en résulte en présence de chromogène donne une coloration marron. Les lames sont rincées à l'eau distillée.

- **Contre coloration**

- Les lames sont immergées 2 minutes dans l'hématoxyline de Mayer,

- Elles sont rincées à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau devienne limpide,

- L'immersion est effectuée dans un bain d'eau ammoniaquée,

- Les lames sont rincées à l'eau distillée.

Cette étape a pour but de colorer les noyaux en bleu.

- **Montage :** Une goutte du milieu de montage (Faramount) est déposée puis recouverte par la lamelle.

- **Observation :** Elle est réalisée à l'aide d'un microscope photonique aux grossissements Gr20x et Gr40x. Les photos sont prises à l'aide d'un appareil photos Samsung.

- Localisation de la p53 est nucléaire.

b) mode opératoire de L'EGFR :

La différence entre les 2 protocoles pour l'EGFR, on ne fait pas l'étape de démasquage antigénique au TRS, mais on applique directement une enzyme sur les lames qui est **la protéinase k**

- On ajoute **la protéinase k** (5 minute), puis Rinçage à l'eau distillé

- Blocage des sites antigéniques non spécifique par l'action de la peroxydase block (5 minutes), Rincer délicatement au PBS (2 fois 5 minutes).

- Application de l'anticorps primaire (**Anti –Epidermal Growth Factor Receptor (3C6)**).

- Les autres étapes sont les mêmes que p53.

- Localisation de l'EGFR est membranaire.

II.2.3 Technique de PCR en temps réel :

Cette technique a été faite au niveau du laboratoire de biologie moléculaire fondamental et appliqué du service d'oncologie du CPMC.

II.2.3.1 : Principe :

La PCR en temps réel utilise le même principe que la PCR classique, il s'agit d'amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique. Avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel grâce à deux marqueurs fluorescentes (suppresseur et émetteur) (Dubosson. 2011)

Cette technique est basée sur une répétition de cycles et chaque cycle se compose de trois étapes :

- 1) **La dénaturation** de l'ADN double brin par une température de 95°C. A cette température les liaisons faibles qui relient les 2 brins d'ADN se rompent.
- 2) **L'hybridation** des amorces sur chacune des 2 chaînes par appariement complémentaire des bases grâce à une température de 64 °C).
- 3) **L'élongation** à partir des amorces permet de former 2 copies d'ADN. L'élongation se fait par ajout de dNTP sous l'action de Taq polymérase à une température de 72°C.

- **Le protocole expérimental divisé en 2 phases :**

- 1) **phase pré analytique :**

Préparation des coupes étalées sur des lames au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC.

- **Préparation des coupes :**

Les sections de 5 µm du tissu tumoral, étalées sur lames, peuvent être conservées à une température comprise entre 15 et 30 °C pendant 60 jours.

A l'aide d'un microscope optique, on sélectionne la zone contenant au moins 10% de cellules tumorales sur lame colorée à l'HE.

2) phase analytique :

Basée sur l'extraction puis l'amplification de l'ADN par PCR en temps réel et détection de l'ADN cible à l'aide des paires d'amorces complémentaires et de deux sondes oligonucléotidiques marquées par des fluorophores. Un dérivé de l'ADN polymérase *Thermus* species Z05 est utilisé pour l'amplification de la cible.

la PCR en temps réel sur l'analyseur *cobas z 480* déceler la présence de mutations somatiques liées aux codons 12, 13 et 61 du proto-oncogène KRAS. Un contrôle mutant et un contrôle négatif sont inclus dans chaque run pour confirmer sa validité.

A) Déparafinisation des sections FFPET :

- Mettre les lames blanches dans un bain de xylène (5 min) puis dans de l'éthanol absolu (5min).
- Effectuer une macro-dissection si l'échantillon contient moins de 10 % de contenu tumoral.
- Ajouter 180 μ L de Tampon de lyse de tissu d'ADN (**DNA TLB**) et 70 μ L de Protéinase K (**PK**) dans le tube Safe-Lock.

B) Extraction de l'ADN :

➤ Lyse des cellules et élimination des protéines :

- Placer les tubes dans le bloc chauffant à sec à 56 °C et incuber pendant 60 minutes.
- Placer les tubes dans le bloc chauffant à sec à 90 °C et incuber pendant 60 minutes.

➤ Précipitation de l'ADN :

- Ajouter 200 μ L de Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine (DNA PBB) dans chaque tube
- Ajouter 100 μ L d'isopropanol à chaque tube.
- Transférer chaque lysat dans les tubes de filtration avec bouchons (FT) et les tubes de prélèvement (CT), puis centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute.

➤ Premier lavage :(élimination des débris cellulaires)

- Ajouter 500 μ L Tampon de lavage I (WB I) de l'ADN actif à chaque tubes de filtration avec bouchons (FT) puis Centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute.

➤ Deuxième lavage :

- Ajouter 500 μ L de Tampon de lavage II (WB II) puis Centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute.

➤ Elution :(Neutralisation du milieu et récupération d'ADN)

- Ajouter 100 μ L de Tampon d'élution de l'ADN (DNA EB)

C) Quantification de l'ADN :

- A l'aide d'un spectrophotomètre Nanodrop, nous quantifions l'ADN de chaque tube avec le calcul du rapport 260nm/ 280nm
- Le DNA EB est utilisé comme blanc.
- Deux lectures de mesure sont faites et c'est la moyenne qui est prise en compte.

D) Calcul des volumes de dilution : (Annexe)

Les ADN des échantillons extraits peuvent être conservés au réfrigérateur ($>4^{\circ}\text{C}$) ou utilisés immédiatement pour l'amplification et la détection.

Le volume de l'ADN et celui du tampon de dilution sont calculés en fonction de la concentration de l'ADN.

E) Dilution de l'échantillon :

Pipeter délicatement le volume calculé de chaque stock d'ADN d'échantillon dans le tube respectif contenant le Diluant échantillon d'ADN (DNA SD).

F) Préparation des mélanges réactionnels actifs : (MMX)

Préparer deux MMX actifs en vrac, un avec **KRAS 12/13 OM** et l'autre avec **KRAS 61 OM**.

Remarque : La détermination du volume de chaque réactif nécessaire pour la préparation du MMX actif en fonction du nombre d'échantillons inclus dans le run, se fait selon le tableau XXIII (Annexe V).

G) Préparation du milieu réactionnel dans la microplaque : (Annexe 5)

- Ajouter 25 μ L de Contrôle mutant KRAS (**KRAS MC**) dans les puits **A1** et **A2** de la plaque à micropuits.
- Ajouter 25 μ L de contrôle négatif (**NEG CT**) dans les puits **B1** et **B2** de la plaque à micropuits.
- Ajouter 25 μ L de Calibrateur KRAS (**KRAS CAL**) dans les puits **C1** et **C2** de la plaque à micropuits
- Pipeter pour chaque échantillon dilué d'ADN 25 μ L.
- Couvrir la microplaque à l'aide du film d'étanchéité.

A) Amplification par PCR en temps réel :

L'étape d'amplification est totalement automatisée. Les résultats sont affichés sur l'ordinateur lié au *cobas z 480* après 1h 50 minutes.

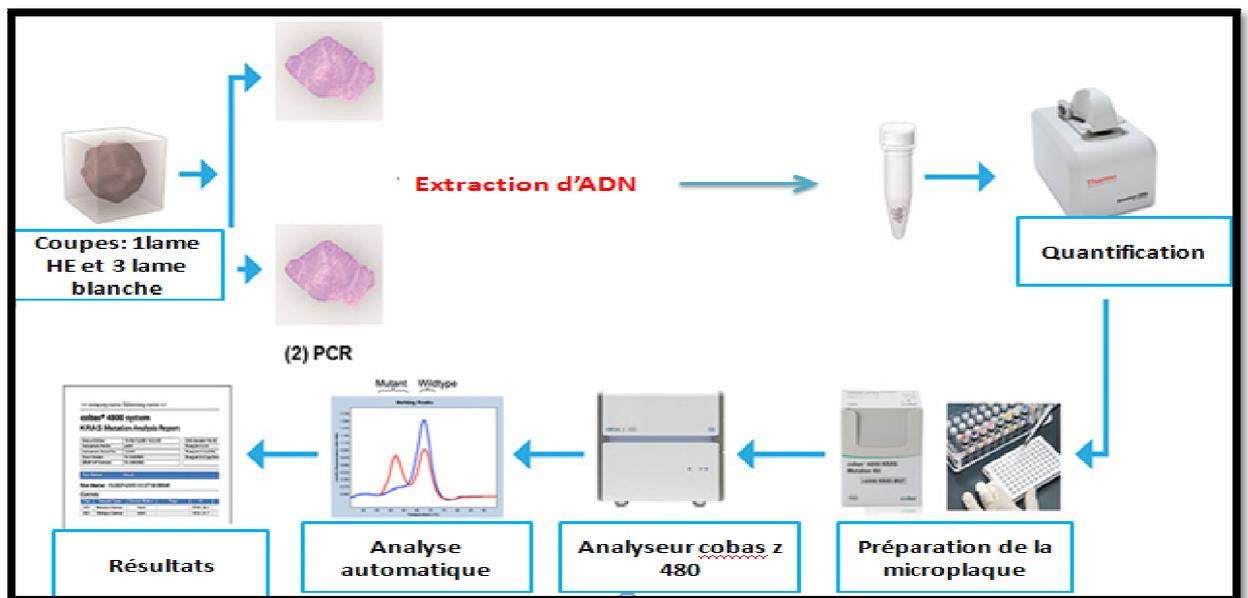


Figure 12 : Schéma récapitulatif de l'expérimentation PCR en temps réel *Cobas z 480*.

➤ Détection automatisée des mutations par PCR en temps réel :

L'analyseur **cobas z 480** est capable de mesurer en temps réel la quantité de fluorescence générée par certains produits de PCR.

- Dans la réaction, chaque sonde oligonucléotidique spécifique à la cible est marquée par un fluorophore servant de rapporteur et par une molécule quencher qui absorbe les émissions fluorescentes du fluorophore rapporteur quand la sonde est intacte.
- Au cours de chaque cycle d'amplification, une sonde complémentaire de la séquence d'ADN monocaténaire dans l'amplicon se lie et est ensuite clivée par l'activité nucléase 5' à 3' de l'ADN polymérase Z05.
- Une fois que le fluorophore rapporteur est séparé du quencher par cette activité nucléase, une fluorescence d'une longueur d'onde caractéristique peut être mesurée lorsque le fluorophore rapporteur est excité par un spectre de lumière approprié.

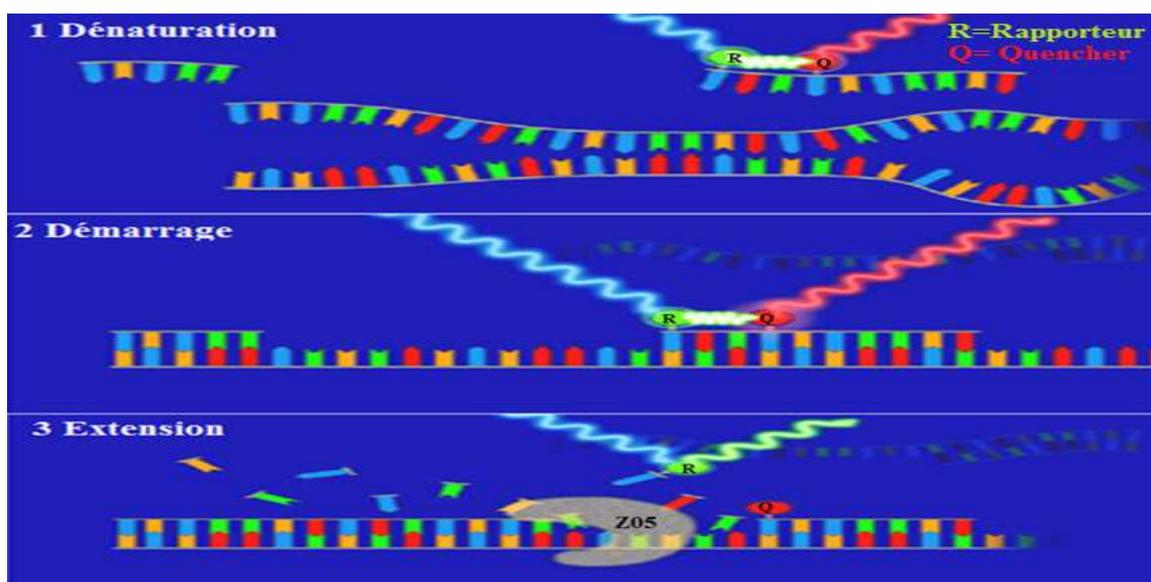


Figure 13 : Principe de la sonde Taqman.

II.2.4 Etude Statistique :

Les différents paramètres cliniques et histopathologique sont examinés avec les résultats d'immunohistochimie (EGFR, p53). Le test Chi² de Pearson a été utilisé pour l'étude statistique. La *p*-value permet de déduire, s'il existe une relation entre chaque paramètre et l'expression de trois différents biomarqueurs (*p*-value < 0.05 résultat significatif), la valeur *p* est obtenue par le logiciel « STATISTICA ».

III.1 : Caractéristiques des patients :

Il s'agit de 30 patients atteints de cancer colorectal (CCR) de moyenne d'âge 61ans (31-83).

Tous ces patients ont subit une résection colique ou rectale, Selon les cas, les malade ont été traités par radiothérapie pré-opératoire suivie d'une chimiothérapie pour les tumeurs de bas et moyen rectum, Soit par chimiothérapie uniquement ou bien une chimiothérapie associés à des Thérapies ciblées (Cetuximab).

III .1.1 Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome selon le sexe :

Dans notre étude la répartition en fonction du sexe montre une légère prédominance féminine le sexe radio = 0 ,76 . Femme n=17 ; Homme n= 13.

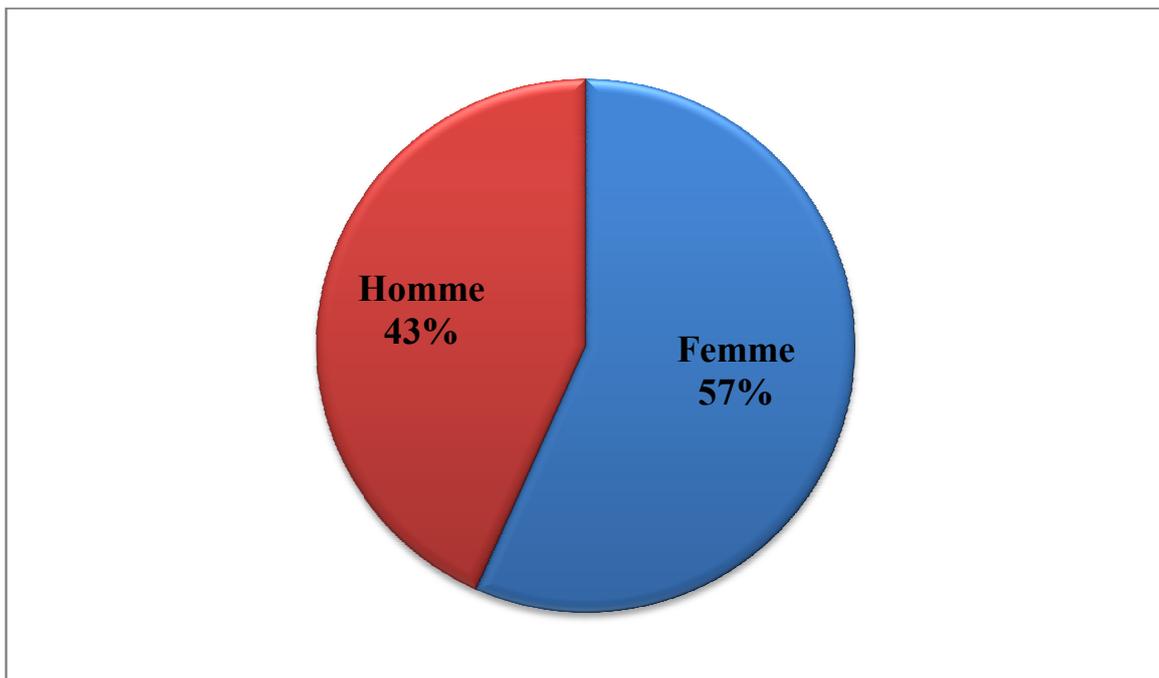


Figure 14: répartition des patients porteurs d'adénocarcinome en fonction du sexe

III .1.2 Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome en fonction de l'âge :

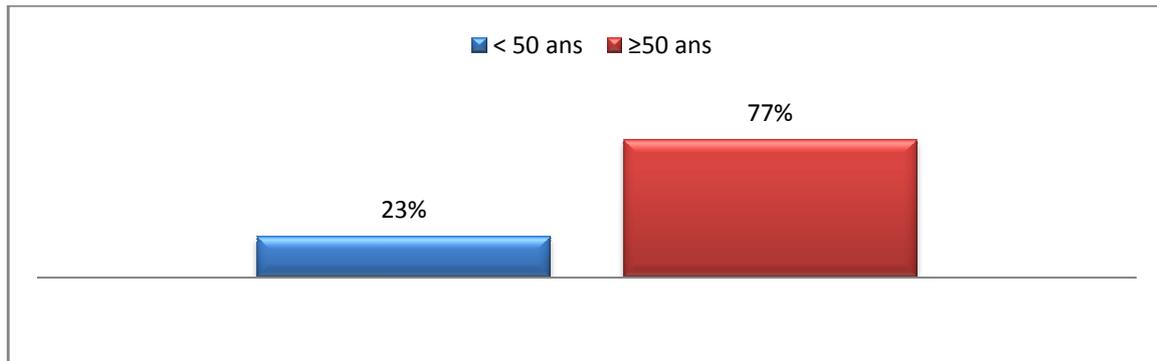


Figure 15: Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome en fonction de l'âge

Une répartition par tranche d'âge, montre un pic important pour l'intervalle d'âge ≥ 50 ans, n=23 cas (76,66 %).

- < 50 ans, n= 7 cas (23, 33 %).

III .1.3 Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome selon la localisation de la tumeur

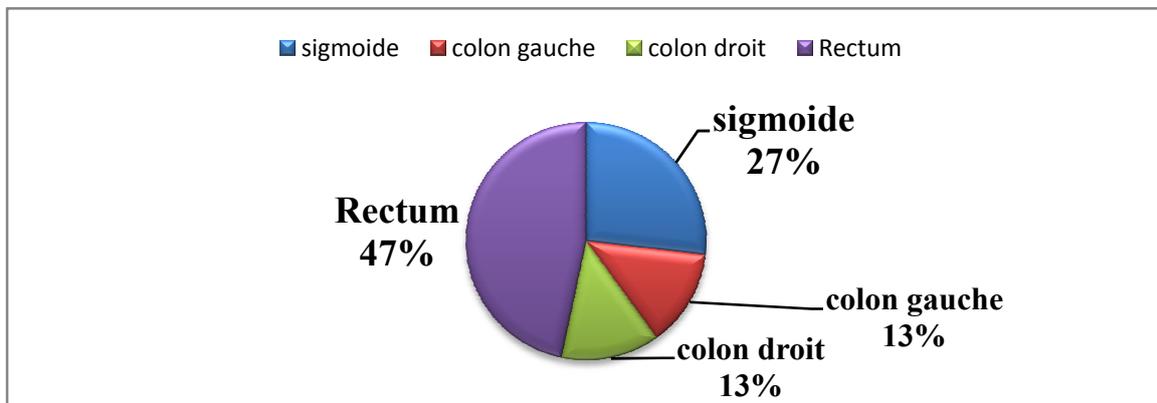


Figure 16: Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome selon la localisation de la tumeur

Concernant la répartition selon la localisation de la tumeur nous notons :

La localisation colique, n= 16 cas (53,33%) répartis comme suit :

- 8 cas au niveau du sigmoïde (27%).
- 4 cas au niveau du colon gauche (13,33%).
- 4 cas au niveau du colon droit (13,33%).
- La localisation rectal : n=14 cas (46,66%), parmi les quels 4 cas localisé au niveau de la charnière rectosigmoïdienne.

III .1.4 Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome on fonction de stade pTNM (AJCC, 7^{ème} édition 2009).

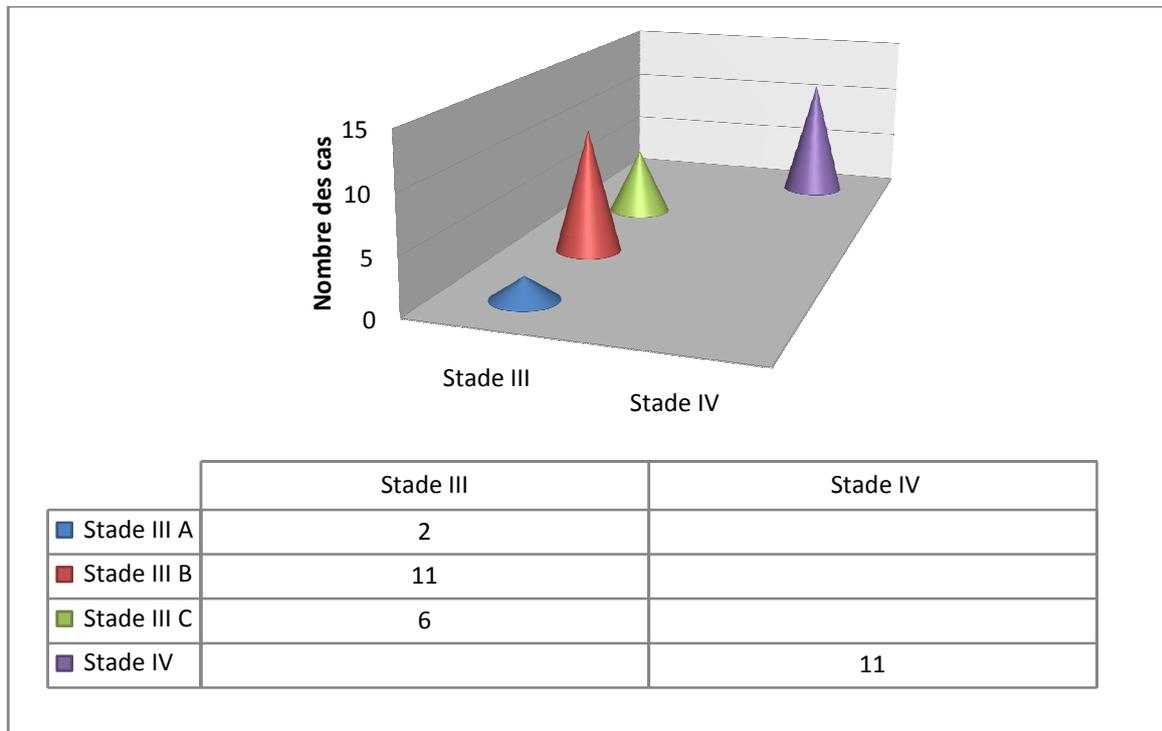


Figure 17: Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome on fonction de stade.

Dans notre série on a **19 cas de stade III (63,33%)** nous notons :

- IIIA 2cas (10,52%).
- Stade IIIB 11 cas (57,89%).
- Stade IIIC 6 cas (31,57%).
- stade IV 11 cas (36,66%).

III.1.5 Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome selon le grade de différenciation :

Les adénocarcinomes représentent la majorité des types histologiques des cancers colorectaux avec un pourcentage de 100%.

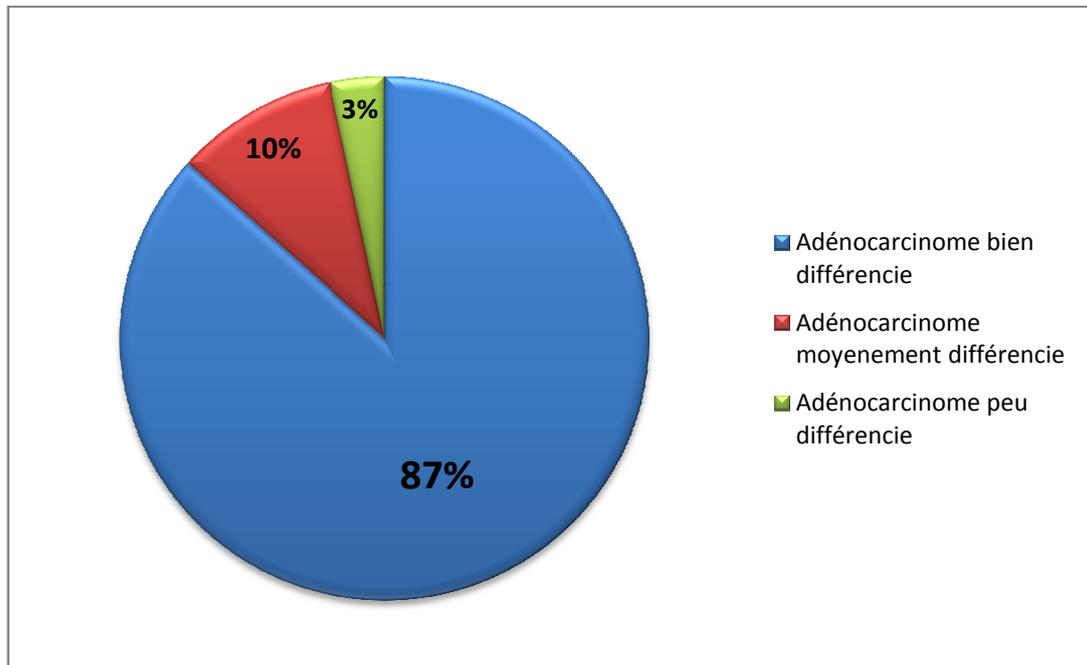


Figure 18: Répartition des patients porteurs d'adénocarcinome selon le grade de différenciation

Concernant la répartition selon le grade de différenciation de la tumeur nous notons :

- Adénocarcinome bien différencié n= 26 cas (86,33%) sont les prédominants.
- Adénocarcinome moyennement différencié n= 3 cas (10%).
- Adénocarcinome peu différencié n= 1 cas (3,33%).

III.2 Etude histopathologique :

III.2.1. Aspect macroscopique

L'aspect macroscopique des résections des pièces coliques ou rectales montre une masse tumorale bourgeonnante, arrondie et consistante, avec un centre ulcéré par rapport à la muqueuse saine qui est plane. Les masses tumorales sont dotées d'une coloration légèrement plus foncée que le tissu sain avoisinant.

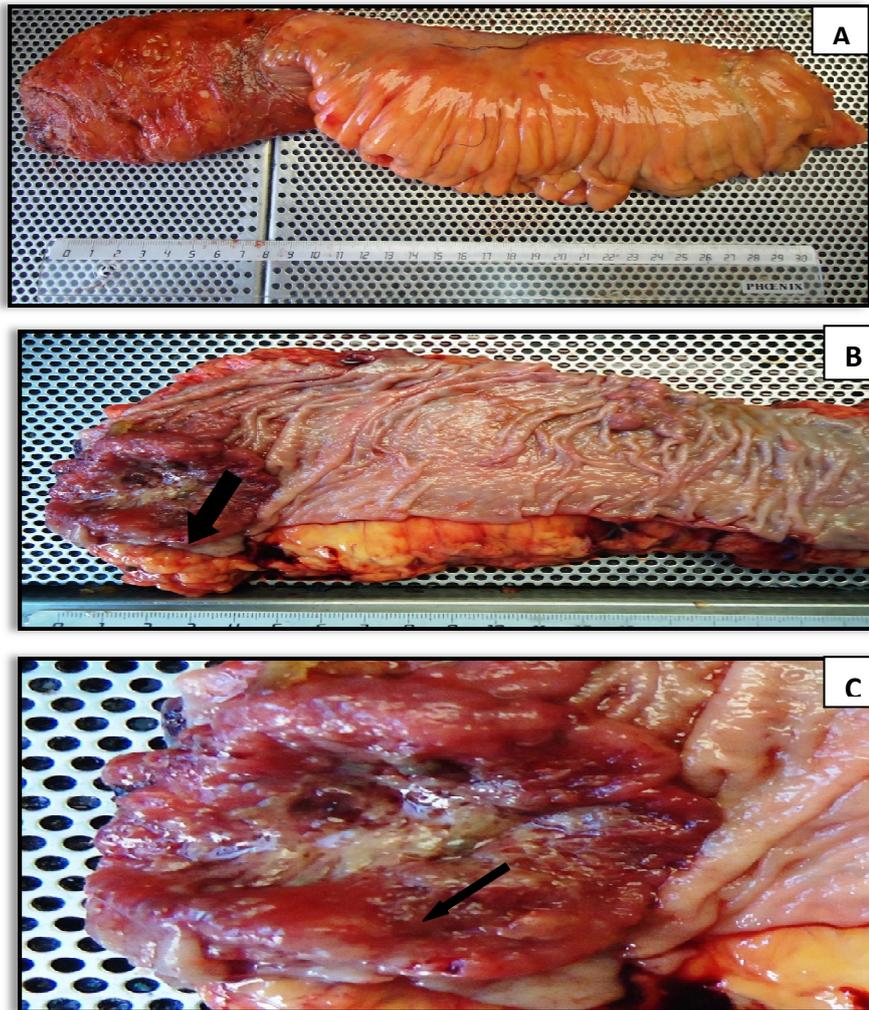


Figure 19 : Aspect macroscopique d'une tumeur du colon. (A) : pièce fermée (B et C) : à l'ouverture présence d'un foyer tumoral.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.2.2. Aspect microscopique

Elle se fait par comparaison avec le tissu sain coloré à l'Hématoxyline – Eosine (HE) et qui présente quatre couches de la lumière vers l'extérieur :

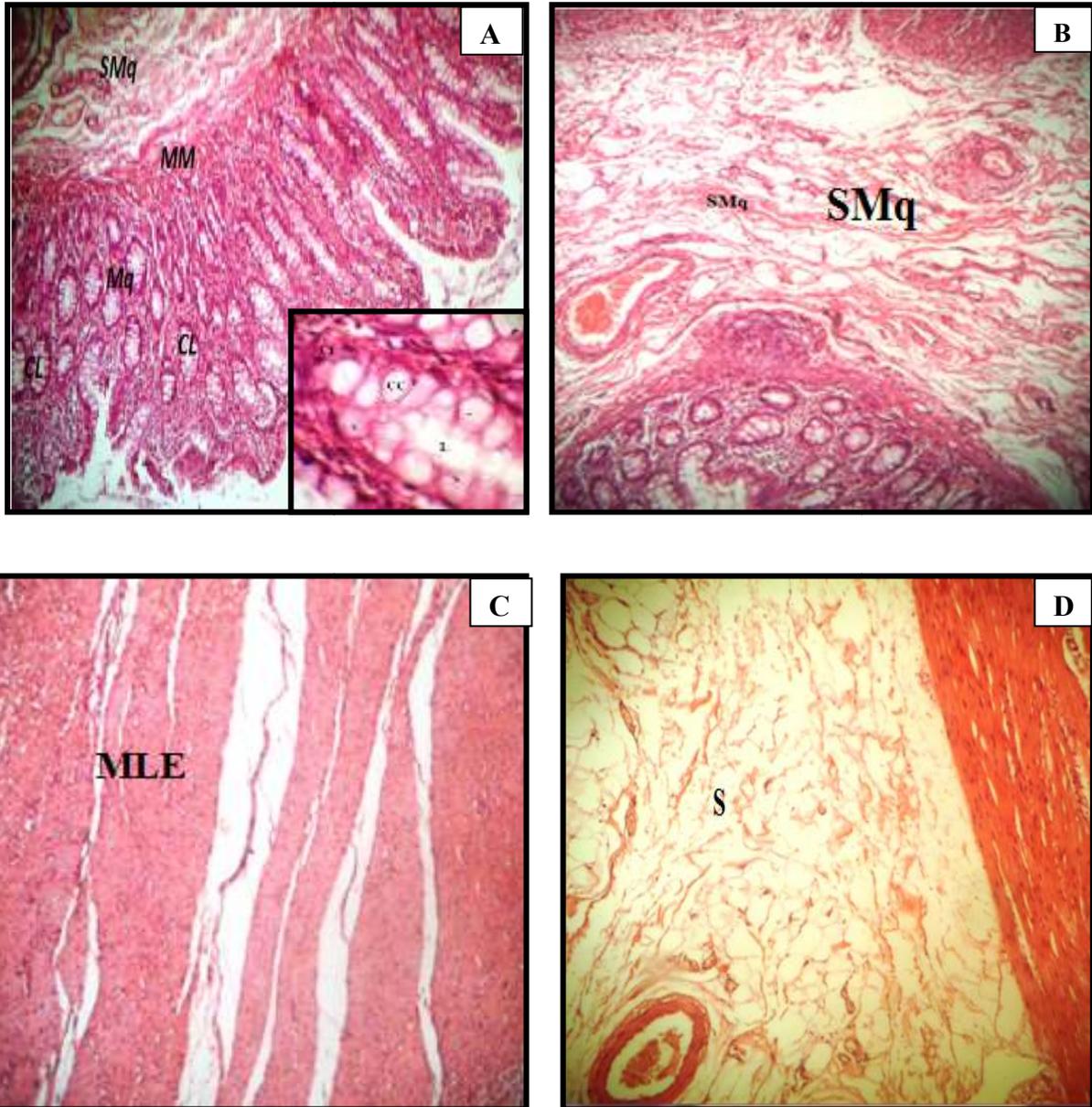


Figure 20 : Aspect microscopique de la muqueuse colique saine après coloration HE (Gr 20X).

Mq : Muqueuse, **CL** : Crypte de Lieberkühn, **MM** : Musculaire muqueuse, **Ch** : Chorion

(B) SMq : Sous muqueuse, **GC** : cellule caliciforme, **L** : Lumière, **MLE** : Musculeuse Longitudinale Externe, **S** : Séreuse

Chapitre III : Résultats et discussion

Figure 20 :

- **La muqueuse (Mq) :** Elle présente des glandes tubuleuses droites serrées (cryptes de lieberkühn (CL) qui comprennent de nombreuses cellules caliciformes sécrétrices de mucus dont la base repose sur une couche fine de cellules musculaires lisses ou **musculaire muqueuse (MM)**. Des entérocytes sont également présents. Elles sont soutenues par un chorion (Ch) parsemé de leucocytes (**Figure 20A**).

- **La sous muqueuse (SM) :** C'est un tissu conjonctif lâche qui renferme des vaisseaux sanguins (VS) et lymphatiques, des follicules lymphatique et des neurofibres. (**Figure20B**).

- **La musculuse (M) :** Elle est composée d'une couche de muscle lisses circulaire interne (MCI) et d'une couche longitudinale externe (MLE) discontinue (**Figure 20 C**).

- **La séreuse (s) :** C'est la couche la plus externe, elle a un rôle protecteur et est formée par le péritoine viscéral. Elle se compose de tissu conjonctif lâche aréolaire recouvert de mésothélium (**Figure 20D**).

Chapitre III : Résultats et discussion

➤ Aspects histologiques du CCR :

Dans notre série, la majorité des tumeurs sont des adénocarcinomes bien différenciés ou la prolifération est faite de structures tubuleuses reproduisant le tissu d'origine et rappelant les glandes de lieberkühn. Les autres adénocarcinomes sont bien à moyennement différenciés, moyennement différenciés et peu différencié.

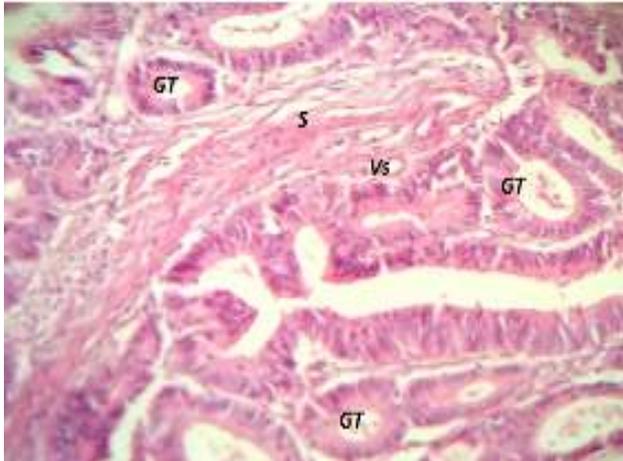


Figure 21 : Aspect d'un adénocarcinome bien différencié, coloration HE, Gr X 20

S: stroma, GT: glande tumoral, Vs: vaisseau

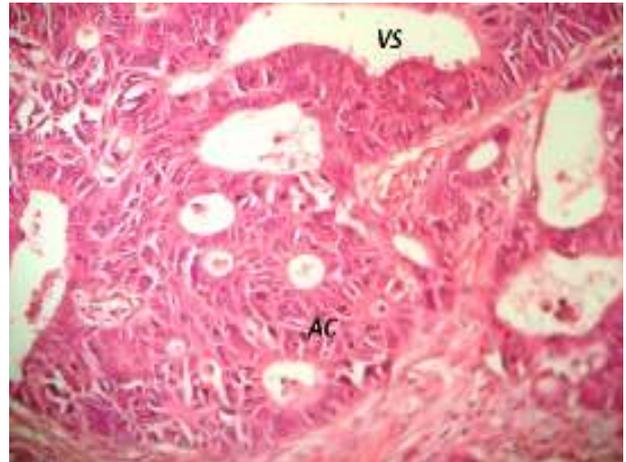


Figure 22: Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié, coloration HE, Gr X 20

AC : Amas creusés de multiples cavités, Vs : vaisseau

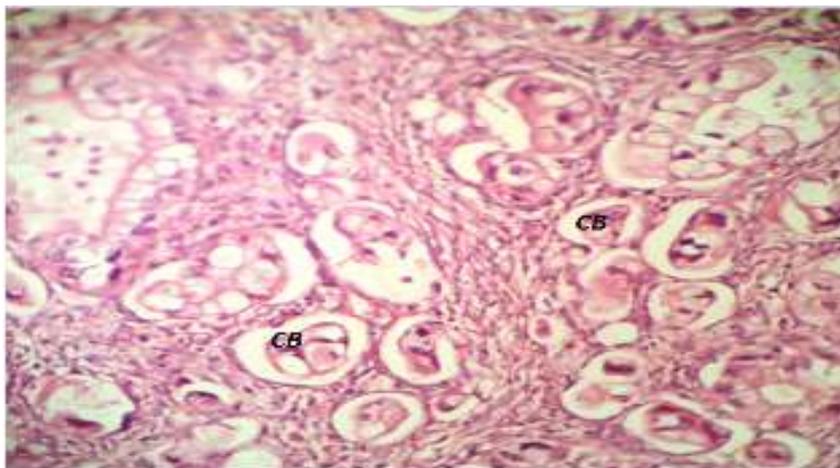


Figure 23 : Aspect d'un adénocarcinome peu différencié, coloration HE, Gr X 20

CB : cellule en bague à chaton.

Chapitre III : Résultats et discussion

- **Figure 21 : Adénocarcinome bien différencié.**

L'aspect microscopique des adénocarcinomes bien différencié montre que les glandes tumorales se disposent en tube glandulaire. Les cryptes de Lieberkuhn perdent leur organisation normale elles deviennent irrégulières avec des cellules cylindriques. les cellules caliciformes avec pole muqueux ne sont pas présentes.

- **Figure 22 : Adénocarcinome moyennement différenciés.**

L'aspect microscopique des adénocarcinomes moyennement différencié montre une diminution de la fréquence de l'aspect glanduliforme de la muqueuse par rapport à l'aspect normal .Une prolifération tumorale est présente au niveau de cette dernière les cellules sont groupées en lobules creusés de multiples cavités.

- **Figure 23 : Adénocarcinome peu différenciés.**

L'aspect microscopique des adénocarcinomes peu différencié montre une prolifération tumorale très importante est présenté riche en cellules en bague à chaton (cellule à noyau reflété au périphérique et un cytoplasme mucineux) ces cellules sont isolées ou groupées en lobules pleins ou en travées.

III.3. Etude immunohistochimique de la P53, EGFR :

Une approche semi-quantitative se basant sur la quantification du pourcentage des cellules marquées ainsi que sur l'intensité et la distribution de la coloration, a été utilisée pour scorer l'immunoréactivité des deux marqueurs.

- **Immunodétection de p53 :**

Dans la détection de la p53 par IHC les cellules tumorales présentent une expression nucléaire plus ou moins hétérogène (Figure 25).

Six scores ont été attribués pour l'expression de la protéine nucléaire P53 :

Les scores 2, 3, 4 et 5 sont considérés positifs par référence à (*Gurzu et al ; 2007*) et (*Bukhari et al ; 2008*).

Tableau I : Expression de p53 en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage nucléaire par IHC.

	Expression de p53					
Score	0	1	2	3	4	5
Nombre des cas	5	1	6	3	7	8
proportions	16,66%	3,33%	20%	10%	23,33%	26,66%

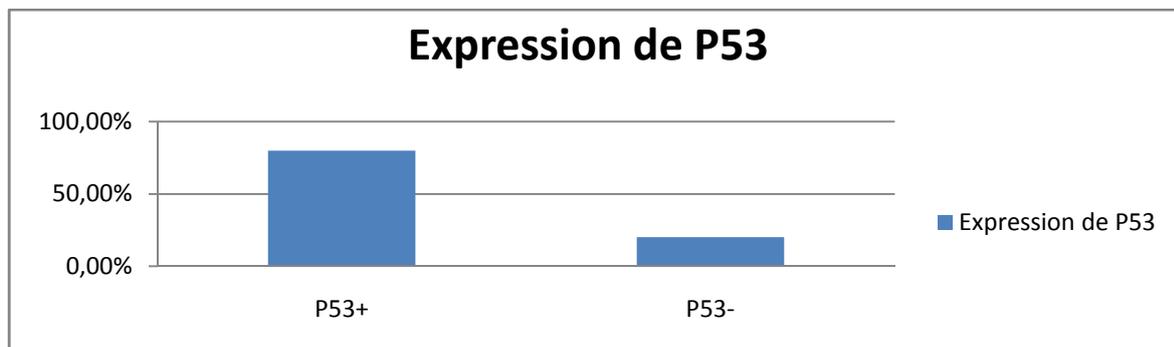


Figure 24 : Evaluation de l'expression de p53

L'immunomarquage de la p53 des 30 cas adénocarcinome étudié on note :

- 6 cas sont négative (20%) parmi les quels : 5 cas de score 0 (16,66%) et 1 cas de score 1 (3,33%).
- 24 cas positifs (80%) parmi les quels : 6 cas de score 2 (20%) ,3 cas de score 3 (10%) et 7 cas de score 4 (23,33%) et 8 de score 5 (26,66%).

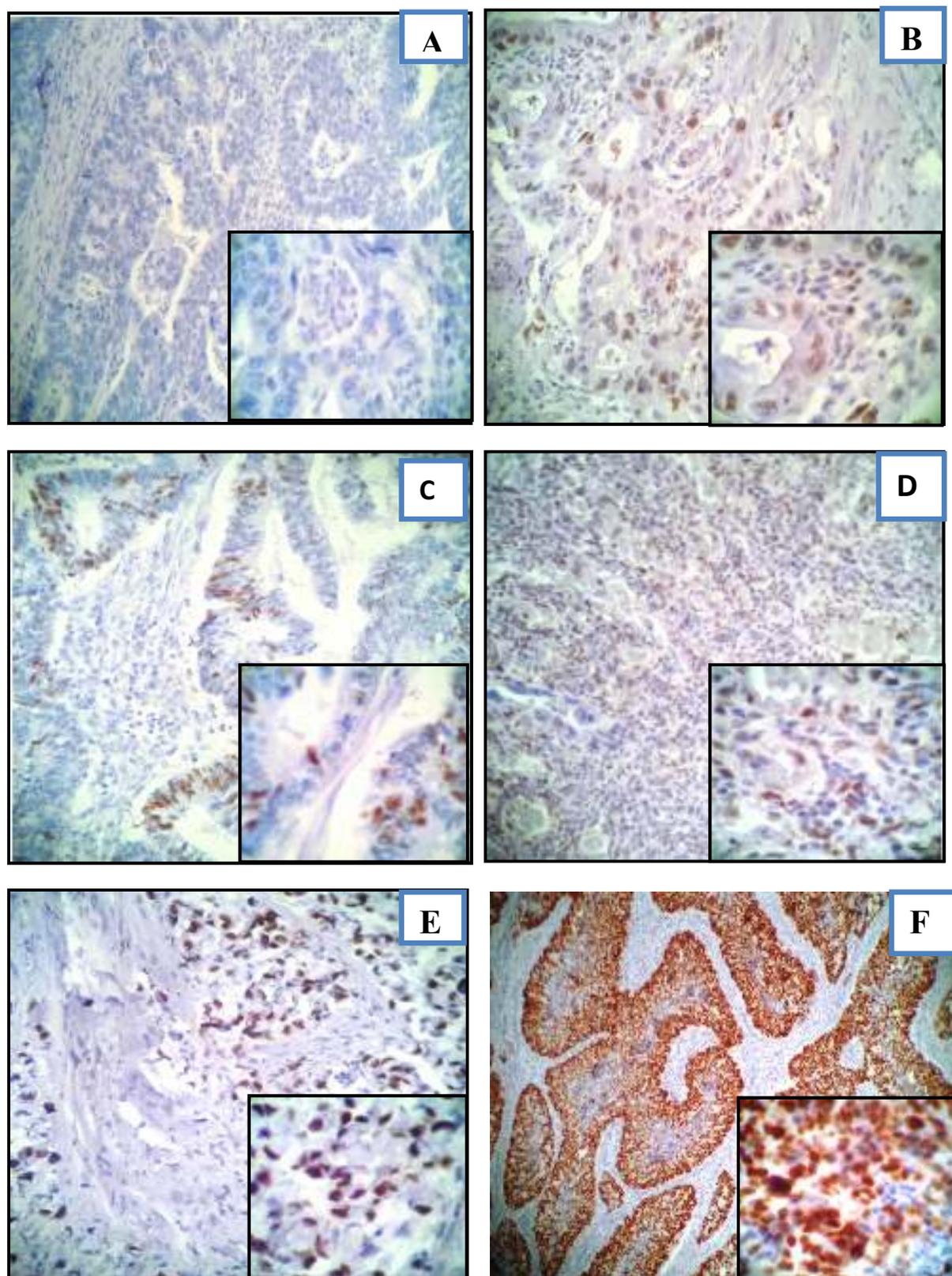


Figure 25 : Profil IHC de l'expression nucléaire de la p53. Gr 20x et Gr 40x.
(A) : Score 0 : 0-5%, (B) : Score 1 : 6-10%, (C) : Score 2 : 11-30%, (D) : Score 3 : 30-50%, (E) : Score 4 : 31-50%, (F) : Score 5 : >50%.

Chapitre III : Résultats et discussion

Figure 25 :

A) Score 0 (Patient 4) : Aucune cellule n'a présenté un marquage nucléaire de la p53 après IHC.

B) Score 1 (Patient 28) : Un marquage nucléaire de la p53 compris entre 6 et 10 %, avec une coloration fine.

C) Score 2 (Patient 28) : Un marquage nucléaire de la p53 compris entre 11 et 30 %, avec une coloration foncée.

D) Score 3 (Patient 10) : Un marquage nucléaire de la p53 compris entre 30 et 50 %, avec une coloration hétérogène.

E) Score 4 (Patient 7) : De 31 à 50 %, des cellules montrent une immunoactivité pour la p53, coloration homogène.

F) Score 5 (Patient 15) : >50 % des cellules montrent une immunoactivité pour p53 avec une coloration homogène.

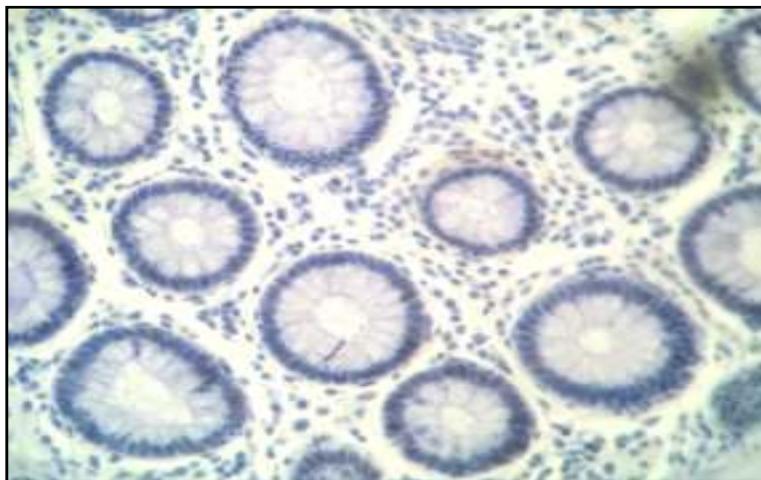


Figure 26 : Profil IHC de l'absence de l'expression nucléaire de la protéine suppresseur de tumeur p53 dans la muqueuse saine. Gr 20x

Chapitre III : Résultats et discussion

- **Immunodétection d'EGFR :**

Il existe une surexpression relative d'EGFR dans les tumeurs colorectales par rapport à la muqueuse normale. L'immunohistochimie (IHC) permet la mise en évidence de la protéine EGFR à la surface de la cellule (marquage membranaire), sur des coupes tissulaires.

Actuellement, un immunomarquage est considéré comme positif lorsque l'on observe un marquage membranaire complet ou incomplet. L'intensité est cotée de 0 à 3+. (Penault-Illorca et al ; 2005)

Les scores d'EGFR d'un adénocarcinome colorectal :

- a) intensité 1+, marquage membranaire incomplet, intensité faible.
- b) intensité 2+, marquage membranaire incomplet, intensité moyenne.
- c) intensité 3+, marquage membranaire complet, intensité forte.

Tableau II: Expression d'EGFR en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage membranaire par IHC.

	Expression d'EGFR			
Score	0	1	2	3
Nombre des cas	7	16	3	4
proportions	23,33%	53,33%	10%	13,33%

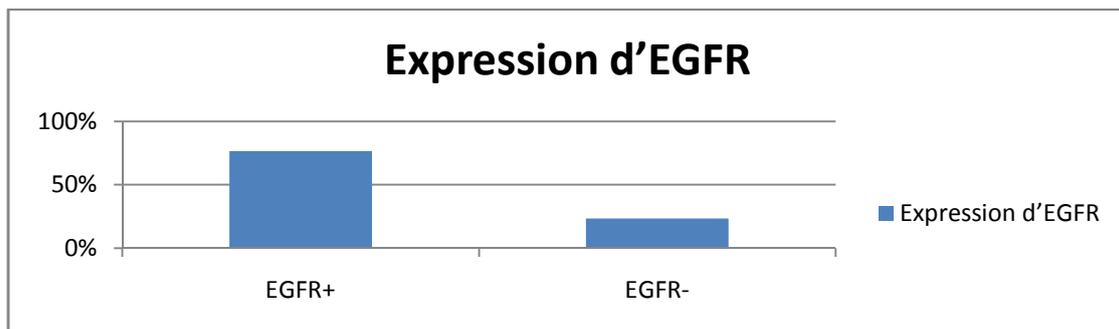
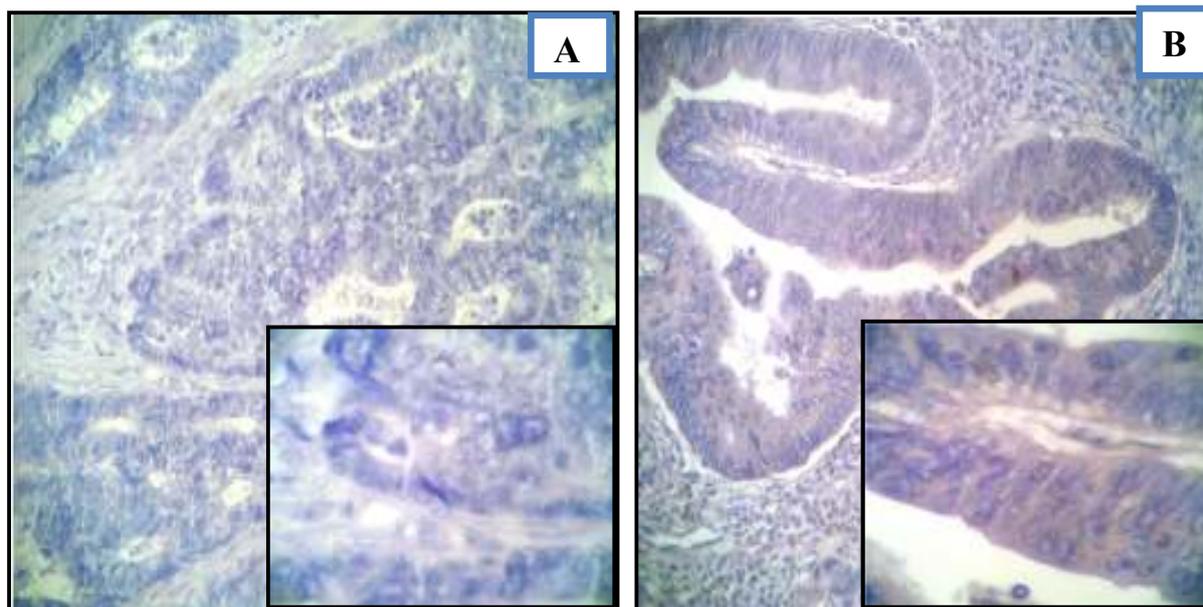


Figure 27 : Evaluation de l'expression d'EGFR.

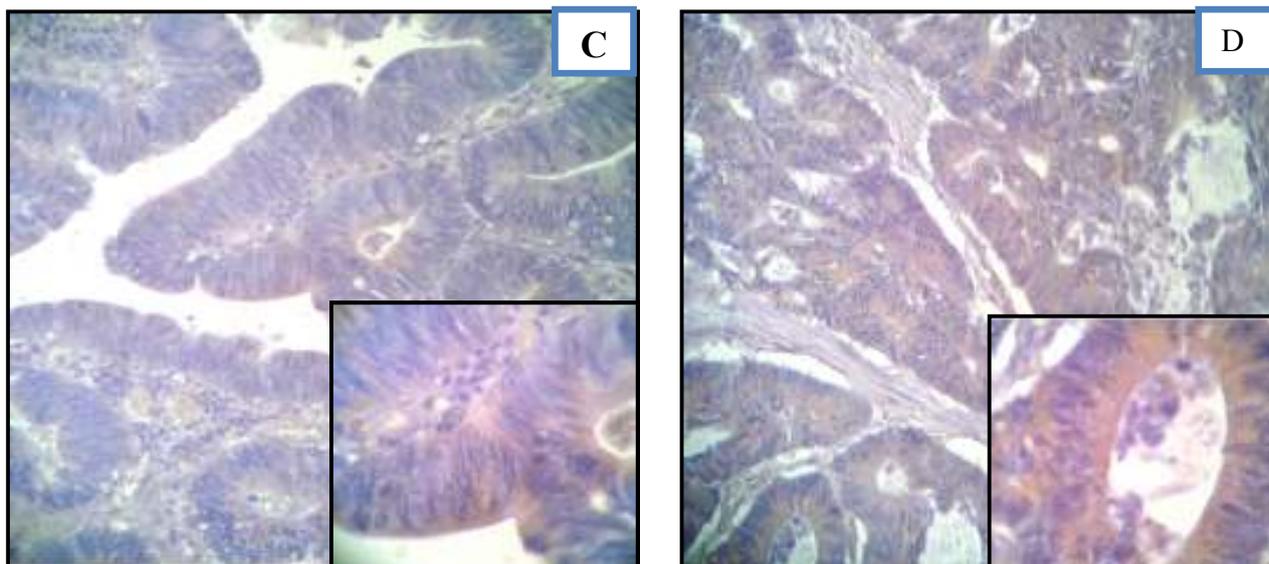
L'immunomarquage d'EGFR des 30 cas adénocarcinome étudiés a révélé :

- 7 cas sont négative score 0 (23,33%).
- 24 cas positifs (76,66%) parmi les quels : 16 cas de score 1 (53,33%) ,3cas de score 2 (10%) et 4 cas de score 3 (13,33%).



Patient 21: Score 0 Gr 20x et Gr 40x

Patient 24: Score 1 Gr 20x et Gr 40x



Patient 16: Score 2 Gr 20x et Gr 40x

Patient 12: Score 3 Gr 20x et Gr 40x

Figure 28 : Profil IHC de l'expression membranaire d'EGFR. Gr 20x et Gr 40x.

(A) : Score 0 (B) : Score 1, (C) : Score 2, (D) : Score 3

Chapitre III : Résultats et discussion

Figure 28 :

A) Score 0 : Absence de marquage membranaire, l'expression d'EGFR est nulle (Patient 21).

B) Score 1 : Intensité faible du marquage membranaire, un nombre très restreint des cellules présentes une coloration de couleur brune au niveau membranaire (Patient 24).

C) Score 2 : Intensité moyenne du marquage membranaire, avec une coloration brune au niveau de la membrane d'un nombre importants de cellules (Patient 16).

D) Score 3 : Intensité élevée du marquage membranaire avec toutes les cellules présente tumorales présente une coloration brune au niveau de la membrane (Patient 12).

Chapitre III : Résultats et discussion

III.4. Etude des corrélations entre l'expression de la p53, EGFR avec les différents paramètres clinicopathologiques :

III.4.1 Corrélation entre l'âge et l'expression de p53, EGFR :

Tableau III : Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de l'âge

Tranche d'âge		p53		EGFR	
		Positive	Négative	Positive	Négative
≤ 50 ans n= 6	Effectifs	6	0	5	1
	%	100%	0%	83,33%	16,66%
>50 ans n= 24	Effectifs	19	5	17	7
	%	79,16%	20,83%	70,83%	29,16%
X²		1,50		0,383	
d.d.l		1		1	
P-value		0,220		0,535	
Significativité		Non significative		Non significative	

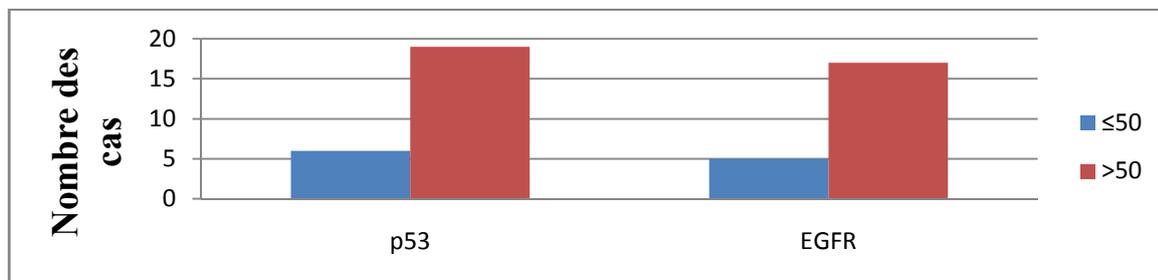


Figure 29 : Expression d'EGFR, P53 en fonction de l'âge.

Quelque soit la tranche d'âge considéré (≤ 50 ou > 50) l'expression de p53 et EGFR peut être positive ou négative.

➤ **Chez les patients d'âge ≤ 50 ans (6 cas):**

- La surexpression de p53 est observée dans 6cas (100 %).
- La surexpression d'EGFR est observée dans 5 cas (83,33 %),
- L'absence de la surexpression d'EGFR est retrouvée dans 16,66 % (n=1).

➤ **Chez les patients d'âge > 50 (24 cas) :**

- La surexpression de p53 est retrouvée dans 19 cas (79,16%) et 5 cas négatifs (20,83%),
- L'expression d'EGFR est observée dans 17 cas (70,83%), et 7 cas négatifs (29,16%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et l'EGFR avec l'âge, $p > \alpha$ ($\alpha = 0,05$).

Chapitre III : Résultats et discussion

III.4.2 Corrélation entre le sexe et l'expression de p53, EGFR :

Tableau IV: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de sexe.

sexe		p53		EGFR	
		Positive	Négative	Positive	Négative
F n= 17	Effectifs	15	2	14	3
	%	88,24%	11,76%	82,35%	17,64%
H n= 13	Effectifs	10	3	8	5
	%	76,92%	23,07%	61,54%	38,46%
X²		0,678		1,632	
d.d.l		1		1	
P-value		0,410		0,201	
Significativité		Non significative		Non significative	

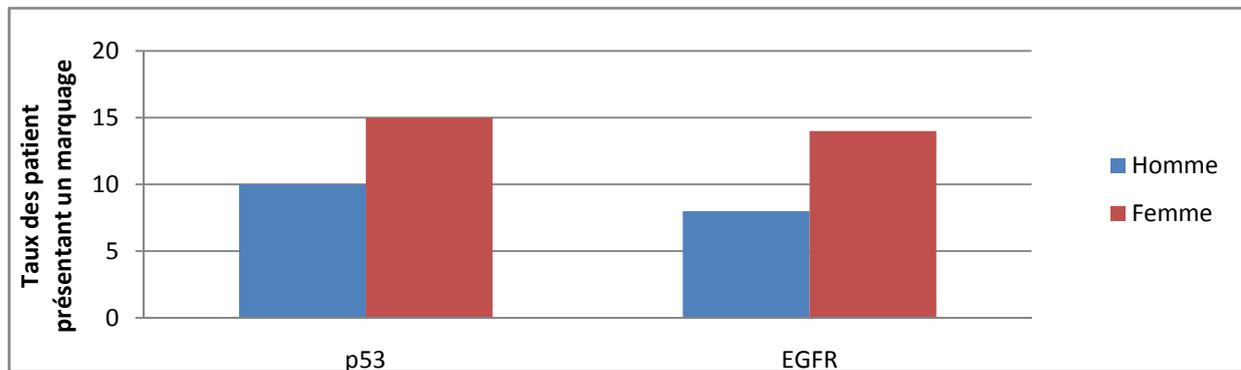


Figure 30 : Expression d'EGFR, P53 on fonction du sexe.

Sur nos 30 patients nous notons que :

- La surexpression de p53 est observé dans 15 cas chez les femmes (88,24%) est 10cas chez les hommes (76,92%) versus 2cas négatifs chez les femmes (11,76%) et 3cas chez hommes (23,07%).
- A lors que l'expression d'EGFR est retrouvée dans 14 cas chez les femmes (82,64%) et 8 cas chez les hommes (61,54%), Tandis que 3cas sont négatifs chez les femmes (17,64%) et 5 cas chez les hommes (38,46%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et l'EGFR avec le sexe.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.4.3 Corrélation entre la localisation tumorale, et l'expression de p53, EGFR :

Tableau V : Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de la localisation tumorale

la localisation tumorale		p53		EGFR	
		Positive	Négative	Positive	Négative
colon n= 16	Effectifs	12	4	11	5
	%	75%	25%	68,75%	31,25%
Rectum n= 14	Effectifs	13	1	12	2
	%	92,86%	7,14%	85,71%	14,29
X²		1,714		1,201	
d.d.l		1		1	
P-value		0,190		0,273	
Significativité		Non significative		Non significative	

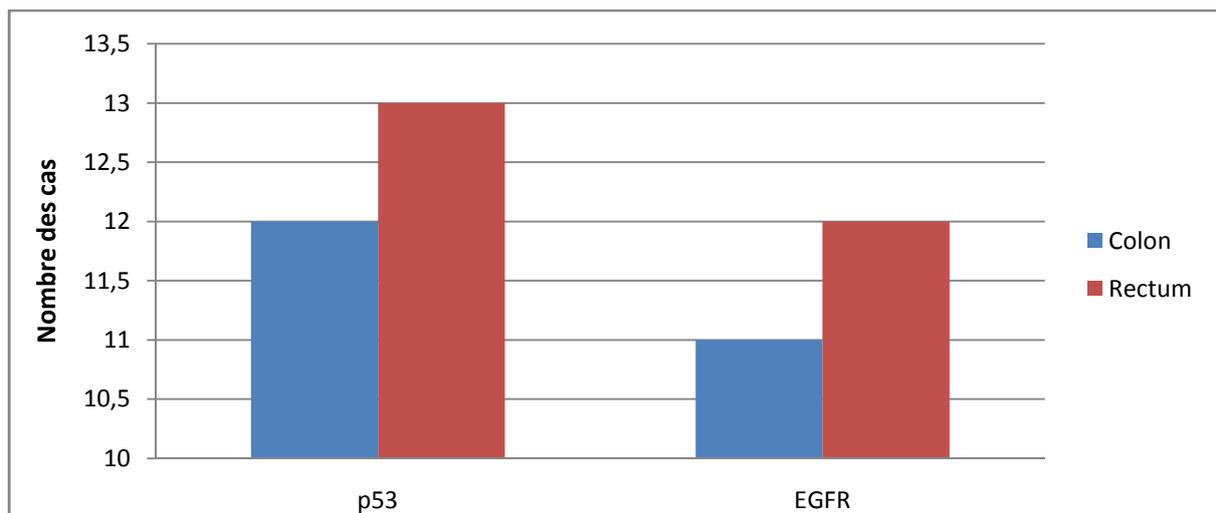


Figure 31 : Expression d'EGFR, P53 on fonction de la localisation tumorale.

- Sur les 16 patients atteints du cancer du colon : 12 cas (75%) expriment p53 et 4 cas (25%) sont négatifs, on a 11 cas (68,75%) expriment EGFR et 5 cas 31,25% sont négatifs.
- Dans les 14 cas au niveau du Rectum : la surexpression de p53 est observée dans 13 cas (92,86%) versus 1 cas négatifs (7,14%), Tandis que la surexpression d'EGFR est observée dans 12 cas (85,71%) et 2 cas (14,29%) sont négatifs.
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et l'EGFR avec la localisation tumorale.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.4.4 Corrélation entre le stade pTNM/ AJCC et l'expression de p53, EGFR :

Tableau VI: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction de stade pTNM/

AJCC

stade pTNM/ UICC		p53		EGFR	
		Positive	Négative	Positive	Négative
Stade III n =19	Effectifs	15	4	13	6
	%	78,94%	21,05%	68,42%	31,57%
Stade IV n =11	Effectifs	10	1	10	1
	%	90,90%	9,09%	90,90%	9,09%
X²		0,717		1,969	
d.d.l		1		1	
P-value		0,396		0,160	
Significativité		Non significative		Non significative	

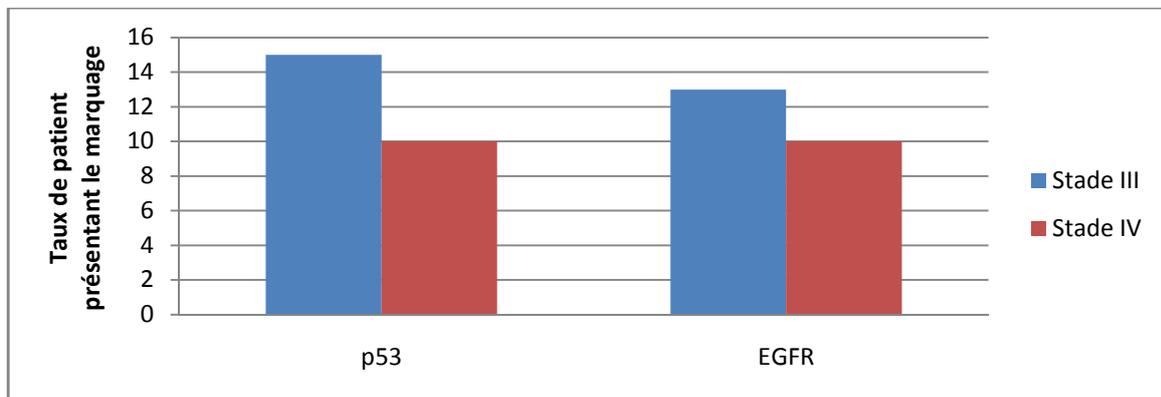


Figure 32: Expression d'EGFR, P53 on fonction stade pTNM.

Notre série comprend les 2 stades III et IV, stade évolués de la maladie, nous notons que :

- La surexpression de p53, dans le stade III est 78,94% (15cas) et 90,90% (10cas) dans le stade IV.
- Alors que la surexpression d'EGFR est de 68,42%(13cas) dans le stade III, et 90,90% (10cas) dans le stade IV.
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et l'EGFR avec le stade pTNM.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.4.5 Corrélation entre le grade de différenciation, et l'expression de p53, EGFR :

Tableau VII: Répartition de l'expression de p53, EGFR en fonction du grade de différenciation

grade de différenciation		p53		EGFR	
		Positive	Négative	Positive	Négative
ABD N= 26	Effectifs	21	5	19	6
	%	75%	25%	70%	30%
AMD N=3	Effectifs	3	0	3	0
	%	100%	0%	100%	0%
APD N=1	Effectifs	1	0	0	0
	%	100%	0%	0 %	0%
X ²		0,923		0,916	
d.d.l		2		1	
P-value		0,630		0,338	
Significativité		Non significative		Non significative	

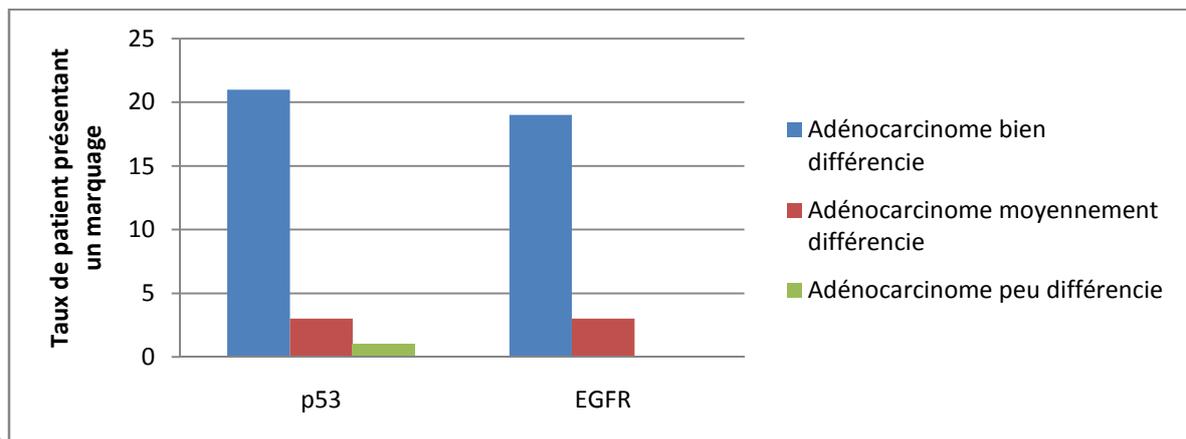


Figure 33 : Expression d'EGFR, P53 on fonction du grade de différenciation.

Sur nos 30 patients nous notons que :

- L'expression de p53 est de 75% (21cas) dans les adénocarcinomes bien différencie, 100% (3cas) dans les adénocarcinomes moyennement différenciés et 100% (1cas) respectivement avec l'adénocarcinome peu différenciés.
- Tandis que la surexpression d'EGFR est de 70% (19 cas) dans les adénocarcinomes bien différencie, 100% (3cas) dans les adénocarcinomes moyennement différenciés, et absente dans les adénocarcinomes peu différenciés.
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et l'EGFR avec le grade de différenciation.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.5 Détection des mutations du gène KRAS par PCR en temps réel :

III.5.1 Résultats de la phase analytique donnée par l'automate cobas Z 480

Tableau VIII : Résultats du KRAS.

Sample ID	Test Result	Start of Run	Test Type	Operator	Position	Flags	Comment
7442/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6074/13	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	G01:G02	R299	
1080/14	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	E01:E02	R291	
Run Name: 19-AUG-2014 10:12 KRAS							
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A01:A02		
6074/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B03:B04		
74/14	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	E03:E04		
1080/14	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	F01:F02		
7495/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A03:A04		
280/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6993/13	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	E01:E02		
2292/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C03:C04		
2848/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	D03:D04		
1321/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	F03:F04		

Run Name: 17-AUG-2014 12:35 KRAS							
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	A01:A02		
5001/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	F01:F02		
7442/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6074/13	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	G01:G02	R299	
1080/14	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	E01:E02	R291	
Run Name: 19-AUG-2014 10:12 KRAS							
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A01:A02		
6074/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B03:B04		

Chapitre III : Résultats et discussion

III .5.2 Evaluation de statut KRAS :

Tableau IX : Génotypage du gène KRAS et des codons mutés

Statut KRAS	Nombre de patient (n=11)
KRAS+	7 (63,63%)
KRAS-	4 (36,36%)

Dans notre série d'étude, on retrouve :

- 63,63% (7 cas) présentant une mutation du gène KRAS, et 36,36% (4cas) le statut KRAS non muté.
- Les mutations retrouvées au niveau des codons 12/13 85,71% (6 cas)

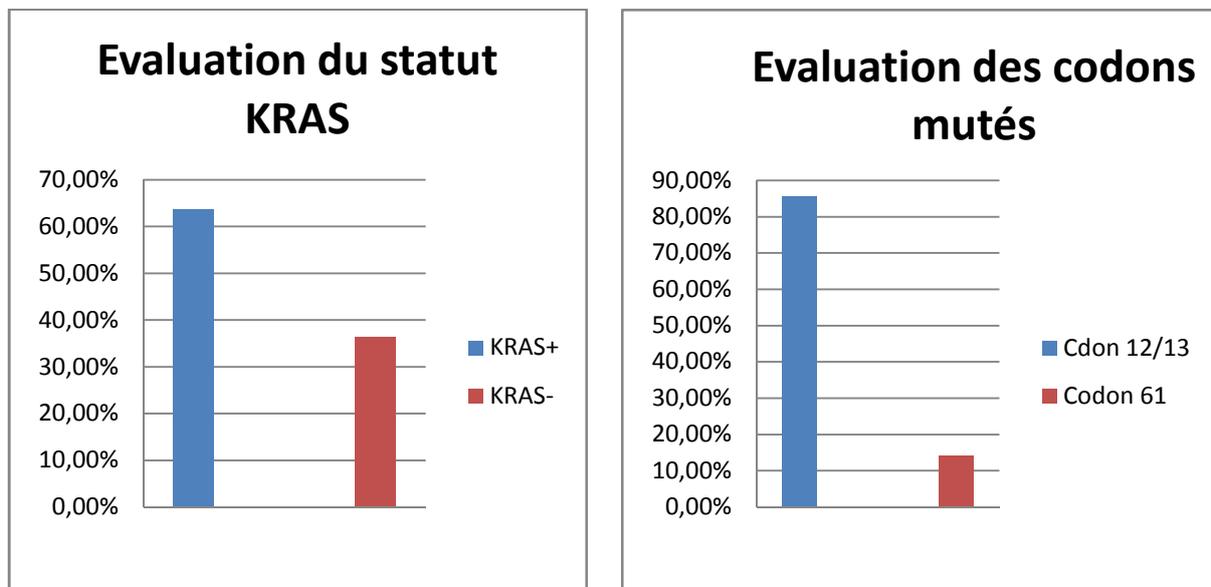


Figure 34 : Evaluation du statut KRAS et des codons mutés.

- Sur les 7 patients dont le statut KRAS est muté, 6 cas présentant une mutation sur le codon 12/13 (85,71%), et 1 cas présente une mutation sur le codon 61.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.5.3 Corrélation entre le statut KRAS et les différents paramètres clinicopathologiques :

Dans cette partie de notre étude, nous avons effectué une étude statistique des corrélations entre le statut KRAS en rapport et les différents paramètres : l'âge, le sexe, la localisation de la tumeur les résultats sont reportés dans les tableaux (X, XI, XII).

La mutation de KRAS est représentée par le signe (+) et leur absence par le signe (-).

III.5.3.1 Corrélation entre l'âge et le statut KRAS :

Tableau X : Corrélation entre l'âge et le statut KRAS :

Tranche d'âge		KRAS+	KRAS-
≤ 50ans n=2	Effectifs	1	1
	%	50%	50%
>50 ans n= 9	Effectifs	6	3
	%	66 ,66%	33 ,33%
X ²		0,19	
Valeur P		0,65	
significativité		Non significative	

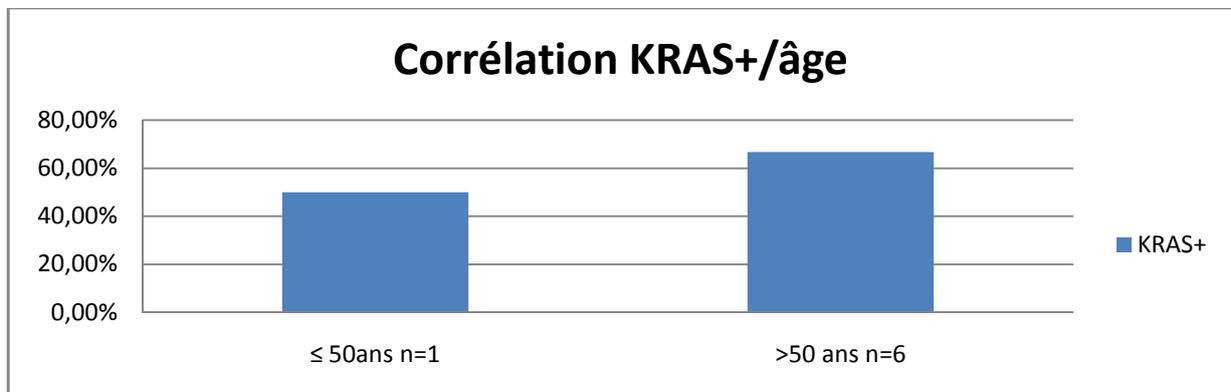


Figure 35 : La mutation de KRAS en fonction de l'âge.

Quelque soit la tranche d'âge considérés (≤ 50 ou > 50) la mutation du gène KRAS peuvent être présente (+) ou absente (-).

- **Chez les patients d'âge ≤ 50** : on observe 1 cas non muté pour le KRAS (50%)
Versus 1cas muté (50%).
- **Chez les patients d'âge > 50** : on observe 3 cas non mutés pour le KRAS (33,33%)
Versus 6 cas mutés (66,66%).

Chapitre III : Résultats et discussion

III.5.3.2 Corrélation entre le sexe et le statut KRAS :

Tableau XI : Corrélation entre le sexe et le statut KRAS :

sexe		KRAS+	KRAS-
F n=10	Effectifs	6	4
	%	60%	40%
H n= 1	Effectifs	1	0
	%	100%	0%
X ²		0,63	
Valeur P		0,43	
significativité		Non significative	

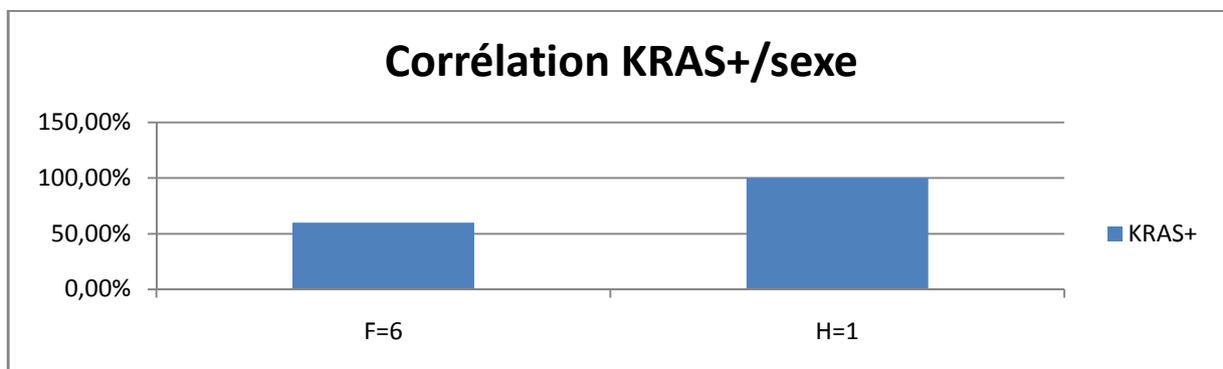


Figure 36 : La mutation de KRAS en fonction du sexe.

Sur nos 11 patients (10 femmes et 1 seul homme), 6 cas (60%) sont mutés pour le KRAS versus 4 cas (40%) non mutés pour le gène KRAS chez les femmes. Une mutation du gène KRAS est retrouvée chez le patient de sexe masculin.

Chapitre III : Résultats et discussion

III.5.3.3 Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS :

Tableau XII : Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS :

Localisation tumorale		KRAS+	KRAS-
Colon n=7	Effectifs	5	2
	%	71,43%	28,57%
Rectum n= 4	Effectifs	2	2
	%	50%	50%
X ²		0,51	
Valeur P		0,47	
significativité		Non significative	

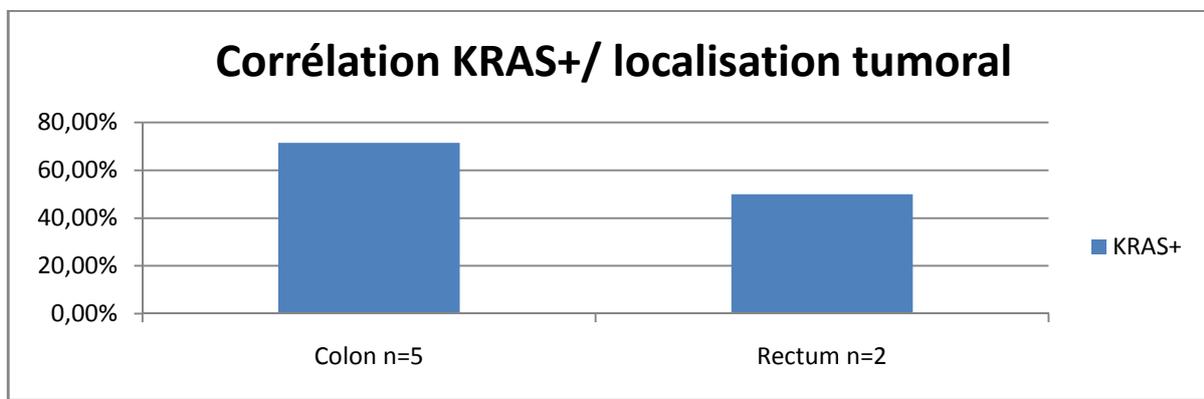


Figure 37 : La mutation de KRAS en fonction de la localisation tumorale.

Colon : Mutation KRAS, n= 5 (71,43%).

Absence de mutation, n=2 (28,57%).

Rectum : Mutation KRAS, n=2 (50%).

Absence de mutation, 2 cas (50%).

Chapitre III : Résultats et discussion

III.5.4 Répartition de l'expression de p53, EGFR, avec le statut KRAS :

Tableau XIII : Répartition de l'expression de p53, EGFR, avec le statut KRAS

	N = 11	Pourcentage (%)	Valeur p
KRAS+/EGFR+	6	54,54%	p=0,21
KRAS+/EGFR-	1	9,1%	
KRAS-/EGFR-	0	0%	
KRAS-/EGFR+	4	36,36%	
KRAS+/p53+	5	45,54%	p=0,21
KRAS+/p53-	2	18,18%	
KRAS-/p53+	3	27,27%	
KRAS-/P53-	1	9,09%	

Il n'existe pas de corrélation significative entre l'expression d'EGFR et le statut KRAS en tant que facteur indépendant (p = 0,21).

Aucune corrélation significative n'existe entre l'expression de la protéine p53 et le statut KRAS en tant que facteur indépendant (p = 0,24).

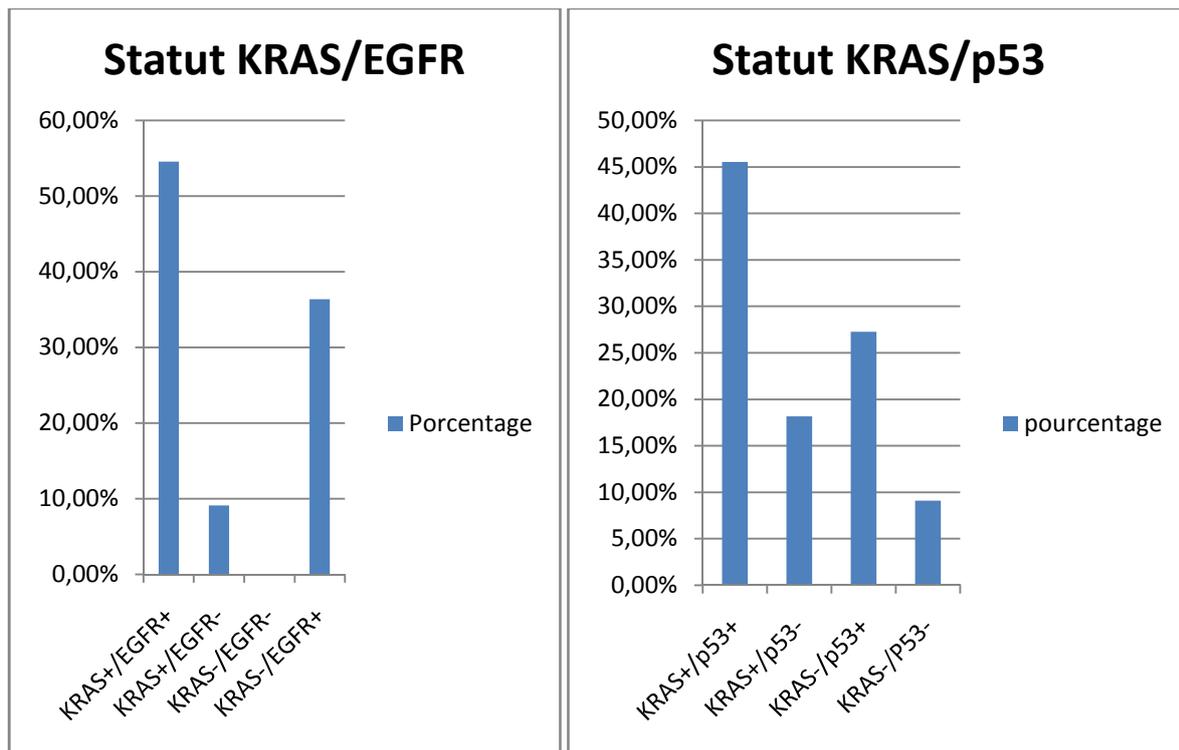


Figure 38 : L'expression d'EGFR et p53, avec le statut KRAS.

Chapitre IV : Discussion

Le cancer colorectal (CCR) est l'un des cancers les plus fréquents et représente une cause principale de mortalité par cancer.

La prédominance masculine habituellement rapportée dans la littérature occidentale avec un sex-ratio compris entre 1,5 et 2 selon Mallem, (2001).

Nos résultats enregistrés dans une série de 30 patients atteints de cancer colorectal montrent une prédominance féminine : 17 femmes (57%) et 13 hommes (43%) avec un sex-ratio (homme /femme) de 0,76. L'étude de Sekal, (2012) trouvait une prédominance féminine.

Dans la littérature occidentale, le CCR est rare avant 50 ans (6% des cas) mais son incidence augmente avec l'âge. L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 chez la femme (Riguier et *al.*, 2003).

Nos résultats montre l'incidence du CCR est très importante à l'âge > 50ans, n =23cas (77%), et 23% ,7cas < 50ans.

Dans notre série le diagnostic du cancer colorectal est fait tardivement chez la majorité des patients : 19 cas (63,33%) de stade III et 11cas (36,66%) de stade IV.

Mallem (2012), retrouve dans sa série 66,7% au stade III et 28,4% au stade IV.

Selon Arafa et al, (2006) en Tunisie, 6 patients (4%) sont au stade I, 61 stade II (40,7%), 51 de stade III (34%) et 32cas stade IV (21,33%).

Sur le plan histologique ; les adénocarcinomes bien différenciés sont prédominants dans 26 cas (86,33%), 10% de nos patients avait des adénocarcinomes moyennement différencié et 3% des adénocarcinomes peu différencié. Ces proportions sont voisines de celles Riguier et *al.*, (2003), où 85% des CCR étaient bien différenciés, 10% moyennement différencié et 5% peu différencié.

Les mutations du gène TP53 marquent la transition de l'adénome au cancer et sont détectés dans plus de 50 % des CCR sporadiques.

En cas de mutation du gène TP53, la protéine p53 a une demie vie plus longue et devient détectable par Immunohistochimie, la protéine est ainsi surexprimée Charaibi et *al.*, (2011).

Concernant l'expression de la p53, selon nos résultats, 80% des adénocarcinomes ont surexprimé cette protéine. Ceci est en accord avec les résultats retrouvés par Chraïbi et *al.*,

Chapitre IV : Discussion

(2011) qui indiquent que la moyenne d'expression de la p53 dans les adénocarcinomes est de 86% et très augmentée par rapport à celle des adénomes qui est de 36%.

Dans notre étude il n'existe pas de corrélation entre l'expression de p53 et les différents paramètres notamment le sexe ($p=0,41$), l'âge ($p=0,22$) le site de la Tumeur ($p=0,19$), le type histologique ($p=0,63$).

Nos résultats sont en accord avec les données de Nussrat et *al.*, (2001) ; et Ghavam et *al.*, (2007) qui montrent qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre l'expression de p53 et le sexe ($p=0,34$) ; l'âge ($p=0,74$), le site de la tumeur ($p=0,26$) et le type histologique ($p=0,63$). Ainsi, Meedea et *al.*, (1997) dans une série de 101 patients ne retrouvent pas de corrélation significative.

Par contre pour Theodoropoulou et *al.*, (2009) et Paluszkievicz et *al.*, (2004) il existe dans leurs études une corrélation entre l'expression de p53 et le stade tumoral. Cette discordance des résultats pourrait être due à la différence entre l'effectif d'échantillons.

Le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) apparaît comme un élément clé de la cancérogénèse colorectale de par son fort niveau d'expression et les phénomènes qu'il régule via ces voies de signalisation : division cellulaire, angiogénèse, métastase et inhibition de l'apoptose (Penault-Ilorca et *al.*, 2005).

Dans le cancer colorectal, L'expression d'EGFR apparaît comme un facteur de mauvais pronostic Nicolson et *al.*, (2001).

Sur les 30 tumeurs analysées dans notre série ; 77% sont positives pour l'immunomarquage de l'EGFR parmi lesquelles 16 cas (53,33%) score 1, 3 cas (10%) score 2 et 4 cas (13,33%) de score 3. Cette surexpression serait corrélée à un mauvais pronostic et une moins bonne réponse en chimiothérapie.

Selon Saltz et *al.*, (2004), Gunningham et *al.*, (2004) ; l'EGFR joue un rôle important dans la pathogénie du CCR, il est exprimé dans les stades avancés de cancer colorectal entre 72% et 82% des cas, ces résultats sont en accord avec les nôtres.

Dans notre série aucune corrélation n'a été retrouvée entre la surexpression d'EGFR et : l'âge ($p=0,53$), le sexe ($p=0,20$), la localisation tumorale ($p=0,27$), le grade de différenciation ($p=0,33$) et le stade tumoral ($p=0,16$).

Chapitre IV : Discussion

Dans l'étude de Mohamadi et *al.*, (2011) menée sur 50 Tumeurs colorectales, l'expression d'EGFR n'était pas en association significative avec les différents paramètres cliniques et histopathologique. Ces études sont en accord avec les notres.

Selon l'étude de Wen-Chiuan et *al.*, (2012) sur 150 échantillons, aucune corrélation n'a été montrée entre la surexpression d'EGFR et le grade de différenciation ($p=0,15$), le stade TNM $p=0,16$ cas. Alors qu'une discordance avec nos résultats est observée dans les travaux de Cheirsipa et *al.*, (2007) et Theodropoulos et *al.*, (2009) qui ont trouvé une différence statistique significative entre l'expression d'EGFR et le stade de la maladie.

D'après l'étude de Wen-Chiuan et *al.*, (2012), le pourcentage d'échantillons à haute intensité (score3) était plus élevé dans les adénocarcinomes peu différencie (32,6%) que dans moyennement différencies (22,4%) et bien différencies (6,1%).

Par contre dans notre travail le pourcentage d'échantillon à haute intensité score 3 était dans les adénocarcinomes bien différencie, cette discordance de résultats pourrait être due à la différence entre l'effectif d'échantillon (150 patients contre 30 patients pour notre étude).

La présence de mutation du gène KRAS était prédictive de l'absence de réponse aux thérapies ciblés anti EGFR utilisant des anticorps monoclonaux (*cetuximab*, *panitumumab*) pour le traitement des patients atteints d'adénocarcinomes colorectaux (Sabourin et *al.*, 2012).

Les mutations activatrices de KRAS rendent la tumeur insensible à un blocage en amont par un anticorps, dont l'action principale est d'interrompre la voie de transduction du signal en empêchant la fixation du ligand sur son récepteur (Lamoril et *al.*, 2009)

Selon Sabourin et *al.*, (2009), la présence de mutation KRAS étant prédictive de l'échec du traitement par anticorps anti-EGFR, il est devenu obligatoire de s'assurer l'absence de mutation avant d'instaurer un traitement par les anticorps monoclonaux.

En juillet 2013, l'autorisation de mise sur le marché (AMM) du *panitumumab* a été modifiée suite aux résultats d'une étude clinique montrant que les patients porteurs d'une mutation sur l'exon 4 de KRAS ou sur les exons 2, 3,4 de NRAS présentent également une résistance du traitement anti-EGFR.

Une étude de Lievre, (2008) a recherché chez 89 patients traités pour un cancer colorectal métastatique la mutation KRAS, ces patients étaient traités par l'anticorps monoclonal (cétuximab), 26 des 89 patients ont répondu au cétuximab et n'étant pas porteur de la

Chapitre IV : Discussion

mutation. La mutation Kras a été retrouvée au niveau de la tumeur de 24 patients et ce traitement n'avait pas fonctionné, la mutation kras entraîne donc la résistance au cétuximab.

Dans notre série ; sur les 11 patients atteints de cancer colorectal métastatique, 7 cas présentent une mutation sur le gène KRAS avec 6 cas (85,71%) située sur le codon 12 et 13, 1/7 cas porte la mutation sur le codon 61.

En effet, ces résultats obtenus auront un impact sur la décision thérapeutique pour ces 07 malades qui ne pourront pas bénéficier d'un traitement anti-EGFR.

Selon Lamoril et al., (2009) et Sabourin, (2012), dans les cancers colorectaux sporadiques 20 à 50 % des tumeurs possèdent une mutation sur le gène KRAS. Il s'agit de mutation somatique acquise et donc non héréditaire, 90% de ces mutations sont situées sur les codons 12 et 13.

Selon les travaux de Magali et al., (2010), les mutations affectant surtout le codon 12 de l'exon 2 (70% des cas), moins fréquemment le codon 13 de l'exon 2 (30%), dans quelque cas on retrouve au niveau de codon 61 de l'exon 3 et plus rarement le codon 59. Ceci concorde avec notre résultat 1/7 cas porte la mutation sur le codon 61.

D'après Marchoudi et al., (2013), les mutation du gène KRAS correspondant à la substitution d'une base par une autre, conduisant à la substitution d'un acide aminé de la protéine codée par un autre, selon ces études les mutations les plus fréquemment entraînent la substitution de glycine (GGT) par l'aspartate (GAT) au G> transition A au niveau du codon 12 (P .G12D), de la glycine par la valine (GTT) G>T transversion au niveau du codon (p.G12V) ou de la glycine par l'aspartate au niveau du codon 13 (P.G 13D) .

Dans notre étude il n'existe pas de corrélation entre la mutation KRAS et les différents paramètres clinicopathologique. Nos résultats sont similaires avec ceux de Li et al., (2012).

Moerkerk et al., (1994) a rapporté que le taux de mutation est plus fréquent à des stades avancés du CCR expliquant que le potentiel d'invasion tumorale est étroitement lié au taux de mutation de ce gène ainsi qu'au type de mutation ponctuelle. En revanche, d'autres auteurs dont Brink et al., (1998) et Li et al., (2012) ne retrouvant aucune corrélation significative entre le stade tumoral et le statut KRAS.

Chapitre IV : Discussion

La surexpression d'EGFR et le statut KRAS ne sont pas corrélés dans notre travail ($p= 0,21$). Milano et ses collaborateurs indiquent que le niveau de l'EGFR (nombre de copies du gène) dans les tumeurs colorectales ; était indépendant de la présence de mutation KRAS.

L'étude de Magali et al., (2011) a rapporté qu'il n'y a pas de corrélation entre l'expression Immunohistochimique de l'EGFR, soit en matière de pourcentage de cellules tumorales expriment l'EGFR, soit en matière d'intensité maximale du marquage et la réponse aux traitements (*cetuximab*).

Ainsi, dans notre étude aucune corrélation n'a été retrouvée entre la surexpression de la p53 et le statut KRAS ($p= 0,21$) ce qui est en accord avec les résultats de Scott et al., (1993) et Tortola et al., (1999) qui rapportent que ces altérations génétiques sont deux événements indépendants qui coopèrent dans l'initiation et la progression du processus de l'invasion tumorale et que la p53 à elle seule n'était pas suffisante pour provoquer la transformation maligne.

Conclusion

La cancérogénèse colorectale est un processus multi étapes porté sur une succession d'altérations génétiques dont les mutations ou délétions du gène suppresseur de tumeur TP53 et la forte expression du récepteur de facteur de croissance épithélial EGFR sont des éléments de mauvais pronostic.

Notre travail a porté sur une immunodétection de ces 2 facteurs et l'étude de leurs éventuelles corrélations avec différents paramètres clinicopathologique afin d'évaluer leur valeur pronostique chez 30 malades atteints de CCR. Ainsi qu'une détection des mutations du gène KRAS en vue d'une prescription thérapeutique dans 11 CCRm.

Au terme de notre étude, nous avons pu confirmer d'une part, l'intérêt et l'importance :

- De l'examen histologique dans le diagnostic de la maladie.
- De l'analyse immunohistochimique dans la détection de l'expression membranaire d'EGFR et l'expression nucléaire de la protéine suppressive de tumeurs p53.
- De l'étude de biologie moléculaire par la PCR en temps réel dans la recherche des mutations du gène KRAS sur les codons 12 et 13 ,61 .

Notre étude a révélé des résultats voisins de ceux de la littérature, ainsi la corrélation entre la surexpression de p53 et EGFR avec la mutation KRAS est non significative. La recherche de la mutation de KRAS est devenue un test important dans la prise en charge des patients.

Chez nos malades ayant un CCR métastatique, seule une fraction des patients sans mutation de *KRAS* bénéficieront d'une thérapie anti-EGFR.

D'autres facteurs de résistance au traitement seront probablement identifiés dans un proche avenir. Des mutations ont déjà été détectées dans les voies de signalisation de l'EGFR (par exemple *BRAF* et *MEK1*) et de multiples altérations génétiques impliquées dans la carcinogénèse colorectale font l'objet de recherches intenses. Ceci permettra de mieux moduler les choix thérapeutiques, permettant aux patients de bénéficier de nouvelles thérapies toujours plus ciblées.

Références bibliographiques

1. **Abboud R., Pai R., Hall-Daniels L.E, James J., Gilmore C. et Tan B. R.**(2010). Demographic factors on KRAS mutation in colorectal cancers. *Washington University in St. Louis, St. Louis, MO; Barnes Jewish St. Peters Hospital, St. Peters, MO Gastrointestinal Cancers Symposiu.*, P: 303.
2. **André T.** (2009). Thérapies ciblées en cancérologie. Une terminologie ambiguë, *La Revue de médecine interne* 30 ,391–392 .
3. **Aparicio T.** (2007). Carcinogénèse colique, données fondamentales. *Elsevier Masson SA*, 1- 9.
4. **Arafa N.,Hamdani .,Ben Abid S., Ghariani B., Mannai S.,Mestiri H.,Khalfallah MT. et Mazabi SR.** (2006). Survie et facteurs pronostiques des adénocarcinomes colorectaux étude analytique uni et multifactorielle de 150 cas ,131 ,104-111.
5. **Artru P., Guiu M., Laurent-Puig P., J.L Merlin., J.C Sabourin., LiuW., Dong X., Mai M., Seelan RS.,Taniguchi K. et Krishnadath KK .**(2000). Mutations in AXIN2 cause colorectal cancer with defective mismatch repair by activating beta catenin/TCF signalling. *Nat Genet*;26, 146-7.
6. **Astrid Lièvre., Pierre Laurent-Puig.** (2010). La voie de signalisation RAS/MAPK. *Cancéro dig*, Vol. 2 N° 1, 38-42.
7. **Blanchard P., Levy A., Breunot J., Michaud S., Delmasc V et Hennequin C.** (2010). Le cancer du rectum. *Cancer/Radiothérapie 14 Suppl*, 1 S111-S119.
8. **Bos JL., Fearon ER., Hamilton SR., Verlaan-de Vries M., van Boom JH., van der Eb AJ et Vogelstein B.** (1987). Prevalence of RAS gene mutations in human colorectal cancers. *Nature*, 327,293-7.
9. **Breivik J., Meling G. I., Spurkland A., Rognum T. O et Gaudernack G.** (1994). Kras mutation in colorectal cancer: relations to patient age, sex and tumour location.
10. **Buecher B, de Pauw A.** (2012). Formes héréditaires des cancers colorectaux. *La Revue de médecine interne*, 33, 471–474.
11. **Bukhari MH., Niazi S et Naseer A.**(2009). Relationship of immunohistochemistry scores of altered p53 protein expression in relation to patient's habits and histological grades and stages of squamous cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology, J Cutan Pathol*, 36, 342–349.
12. **Cacheux W., Tourneau W., Baranger B., Mignot L et Mariani P.** (2011). Thérapies ciblées dans le traitement des cancers colorectaux métastatiques : place actuelle. *Elsevier Masson SAS*, Page : 12-19.

Références bibliographiques

13. **Chraibi M ., Elfatemi H., Chbani L., Znati K., Harmouch T., Bennis S., Amarti A., Elabkari M. et Ibrahimi A.** (2011). Profil immunohistochimique du ki67 et de la p53 dans les adenomes et les adenocarcinomes colorectaux ; vol. 3, n°4, 31-35.
14. **Christèle M.** (2008) .Les 5 fonctions vitales du corps humain anatomopathologie, page 269.
15. **Di Fiore F ., Michel P.**(2009). Pronostic role of KRAS mutation in colorectal cancer. *Unité d'oncologie urodigestive, pôle viscéra*, Page : 23-30.
16. **Dolisi G.** (2013) .Anatomie du colon.
17. **Dreyer C ., Raymond E. et Faivre S.** (2009). La voie de signalisation PI3K/AKT/mTOR , *Cancéro dig*, Vol. 1 N° 3, 187-18.
18. **Dreyer C., Raymond E. et Faivre S.** (2009). Les thérapies ciblées et leurs indications dans les tumeurs solides. *La Revue de médecine interne*, 30, 416-424.
19. **Dubosson M.** (2011).Mise au point d'une PCR en temps réels pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba SPP*.*Mémoire de doctorat*, Grenoble.
20. **Faivre J., Lepage C. et Viguier J.** (2009). Cancer colorectal : du diagnostic au dépistage. *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 33, 660-671.
21. **Faivre J.** (2003). Epidémiologie des métastases hépatiques des cancers colorectaux, vol.187, n05, p 815-823.
22. **Fearon E.R., Vogelstein,B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis *Cell*, 61,759-767.
23. **Finkelstein SD., Sayegh R., Christensen S. et Swalsky PA.** (1993). Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. Biologic behavior correlates with K-RAS-2 mutation type. *Cancer*;71 ,3827-38.
24. **Genton CY.** (2010) .L'immunohistochimie : son principe, ses applications et ses limites. *Clinics in Mother and child Health* , Vol.3(1) ,477-481.
25. **Giacchetti S.** 2010. Facteur pronostique dans le cancer du sein. *Centre des maladies du sien hopital saint louis*.
26. **Goldstein NS., Armin M.**(2001). Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system. *Cancer*; 92, 1331-46.
27. **Grady WM, Carethers JM.** (2008). Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*,135, 1079-99.

Références bibliographiques

28. **Gurzu S., Jung J., Mezei T. et Pávai Z.** (2007). The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors in colorectal carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology*, 48(2), 95–99.
29. **Heinemann V., Stintzing., Kirchner T, Boeck S. et Jung A.** (2008). Clinical relevance of EGFR- and KRAS-status in colorectal cancer patients treated with monoclonal antibodies directed against the EGFR. *Cancer Treat Rev*, 35(3), 262-71.
30. **INCa ;** 2008. GUIDE Tumeur maligne, affection maligne du tissu lymphatique ou hématopoïétique Cancer colorectal.
31. **Jimeno A., Messersmith WA., Hirsch FR., Franklin WA. et Eckhardt WA.**(2009). KRAS mutations and sensitivity to epidermal growth factor receptor inhibitors in colorectal cancer: practical application of patient selection. *J Clin Oncol*, 27, 1130-6.
32. **Lamoril J., Ameziane., Deybach J.C., Bouizegarène P. et Bogard M.** (2009). KRAS et cancer colorectal : un pas de géant vers la médecine personnalisée. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, Volume 24, Issue 4, Pages 196-209.
33. **Lamoril J., Deybach J.-C. & Bouizegarène P.** (2006). L'instabilité des microsatellites dans les cancers du côlon, *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, 21, 211–222.
34. **Laurent-Puig P., Lecuru F., Millat B., Sobol H., Thomas G. et Eisinger F.** (2005). HNPCC syndrome (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer): identification and management. *La revue de médecine interne*, 26 ,109-118.
35. **Lee Goldman., Pierre Masson.** (2013). Ceci Médecine Cancérologie. *Elsevier Masson*, 336.
36. **Li Z., Chen Y., Wang D., Wang G., L He et J Suo.** (2012). Detections of KRAS Mutations and their association with clinopathological features and survival in chinees colorectal cancers patients. *The journal of International Medical Research*, 40, 1589-1598.
37. **Lüllmam R, Rauch.** (2008). Histologie. *De Boeck Supérieur Amazon ; France*.
38. **Mallem D.** (2012). Les cancers colorectaux dans les wilayas de Batna étude épidémiologique clinique et thérapeutique. *Batna*.
39. **Michael M., Henrey., Thompson.** (2001). Chirurgie clinique. *De boeck 1ère édition anglaise*.
40. **Michel Greff,** 2009. POST'U-FMC- HGE. *Springer-verlag France, Paris*.
41. **Mohammdi G., jamialahmadi k., Lary S. et Ghaffarzagdegan k.** (2011). Expression of membranous Epidermal Growth factor receptor In colorectal Adenocarcinoma and It's

Références bibliographiques

- Correlation with Clinicopathological Features. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 14, 357-362.
42. **Morère J.F., Mornex f. et Demis Soulières.** (2011).Thérapeutique du cancer. 2eme édition Springer-verlag ; France.
43. **Nancy YA., MA. Kandil. et Mokhtar NM.** (2000). Prognostic value of cyclin D1 and P53 protein in colorectal cancinoma. *Journal of the Egyptien Nat. Cancer Inst*, Vol 12, No 4, 283-292.
44. **Nasiri G., Reza M., Rezaei E., Kamran Ghafarzadegan., Seilanian-Toosi M. et Malekifard M.** (2010). Expression of p53 in Colorectal Carcinoma: Correlation withClinicopathologic Features. *Arch Iranian Med*, 10 (1), 38 – 42.
45. **Olschwang S., Bonaïti C., Feingold J., Frébourg T., Grandjouan S. et Lasset C.** (2004) .Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon,cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas. *Bull Cancer*, 91, 303-315.
46. **Paluszkiwicz P., Berbe H., Pawłowska-Wakowicz B., Cybulski M. et Paszkowska A.** (2004). *Cancer Detection and Prevention* 28. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours,252–259 .
47. **Parsons R., Myerof L., Liu B., Willson JK., Markowitz SD .et Kinzler KW.** (1995). Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor beta type II receptor gene in colorectal cancer. *Cancer Res*, 55, 5548-50.
48. **Penault-Illorca F., Bibeau F., Arnould L., Bralet M-P., Rochaix P. et Sabourin J-C.** (2005) .Expression du récepteur du facteur de croissance épidermique dans les carcinomes colorectaux et rôle dans la cancérogenèse colique. *Bull Cancer*, 92, S5-11.
49. **Rivera F., Vega-Villegas ME., Lopez-Brea MF. et Marquez R.** (2008). Current situation of panitumumab, matuzumab, nimotuzumab and zalutumumab. *Acta Oncol*, 47 ,9-19.
50. **Roock De., Claes W., Bernasconi B., De Schutter D., Biesmans J. et Fountzilias J.** (2010). "Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacyof cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis." *Lancet Oncol*, 11(8), 753-62.
51. **Rougier P., Mitry E. et Dominguez S.** (2006). les cancers digestifs, page 381.
52. **Rougier P., Mitry E.** (2009). Cancers colorectaux avant et après les biothérapies : une révolution dans la prise en charge des patients, *Gastroentérologie Clinique et Biologique*, 33, 672-680.

Références bibliographiques

53. Rouleau E., Spyrtos F., Dieumegard B., Guinebretière JM., Lidereau R. et Bièche I. (2008). KRAS mutation status in colorectal cancer to predict response to EGFR targeted therapies: the need for a more precise definition. *Br J Cancer*; 99, 2100.
54. Sabourin J.C., Lamya A., Le Pessota F., Sesbouïéb R. et Frébourg T. (2009). Pathologie moléculaire tumorale : à propos du génotypage de *KRAS* dans les carcinomes colorectaux. *revue francophone des laboratoires* - janvier 2010, N°418.
55. Santini D., Loupakis F., Vincenzi B., Floriani I., Stasi I. et Canestrari E. (2008). High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *Oncologist*;13,1270-5.
56. Scott N., Sagar P., Stewart J., Blair G.E., Dixon M.F. et Quirke P. (1991). p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance, 63, 317-319.
57. Sieber OM., Lipton L., Crabtree M., Heinemann K., Fidalgo P. et Phillips RK. (2003). Multiple colorectal adenomas classic adenomatous polyposis and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med*, 348, 791-9.
58. Simms LA., Radford-Smith G., Biden KG., Buttenshaw R. et Cummings M. (1998). Reciprocal relationship between the tumor suppressors p53 and BAX in primary colorectal cancers. *Oncogene*, 17, 2003-8.
59. Souza RF., Appel R., Yin J., Wang S., Smolinski KN. et Abraham JM. (1996). Microsatellite instability in the insulin-like growth factor II receptor gene in gastrointestinal tumours. *Nat Genet*;14, 255-7.
60. Sparks AB., Morin PJ., Vogelstein B. et Kinzler KW. (1998). Mutational analysis of the APC/beta-catenin/Tcf pathway in colorectal cancer. *Cancer Res*, 58,1130-4.
61. Starzynski T., Bromley M., Ghosh A P.L. Stern Br. J. (1992). Cancer Prognostic significance of p53 overexpression in gastric and colorectal.
62. Svrceka M., Cervera P., Hamelin R., Lascol O., Alex Duvalb. et Fléjoua J-F. (2011). Cancer colorectal : les nouveaux rôles, du pathologiste à l'ère de la biologie moléculaire et des thérapies « ciblées ». *revue francophone des laboratoires*, n°428.
63. Tazi M., Benjaafar N. et Rki Er. (2009). Registre des cancers de Rabat, incidence des cancers à rabat, *Edition 2009*.
64. Tortola S., Marcuello E., González I., Reyes G., Arribas R., Aiza G., Francesc J. Sancho., Miguel A., Peinado . et Capella G. (1999). P53 and K-ras Gene Mutations

Références bibliographiques

- Correlate with Tumor Aggressiveness but Are Not of Routine Prognostic Value in Colorectal Cancer. *by American Society of Clinical Oncology.*
- 65. Tournigand C., Bengrine-Lefevre L.** (2009). Quelles nouvelles stratégies dans le traitement du cancer colorectal métastatique avec les biothérapies. *La Revue de médecine interne*, 30, 411–415.
- 66. Viguier J., Bastie A., Seronde A. et Ducreux M.** (2013). The KRAS mutation detection within the initial management of patients with metastatic colorectal cancer. *European Journal of Cancer*, 49, 2126-2133.
- 67. Viguier J., Bourlier J., karsenti D., De calanl. et Danque chin Dorval E.** (2003). Cancer du colon, p18.
- 68. Vogel S., Weijenberg MP., Herman JG., Wouters KA., de Goeij AF. et PA van den Brandt.** (2009). MGMT and MLH1 promoter methylation versus APC, KRAS and BRAF gene mutations in colorectal cancer: indications for distinct pathways and sequence of events. *Ann Oncol*, 20(7), 1216-22.
- 69. Wade S., Samowitz., Karen Curtin., Donna Schaffer., Margaret Robertson. et Mark Leppert.** Relationship of Ki-ras Mutations in Colon Cancers to Tumor Location, Stage, and Survival: A Population-based Study.
- 70. Westra JL., Schaapveld M., Hollema H., de Boer JP., Kraak MM. et de Jong D.** (2005). Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. *J Clin Oncol*, 23, 5635-43.

Annexe I

Classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 7^{ème} édition 2009)

1. Extension de la tumeur

TIS = Carcinome in situ. Tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria sans extension à la sous-muqueuse.

T1 = Tumeur infiltrant la sous-muqueuse sans la dépasser.

T2 = Tumeur infiltrant la musculature sans la dépasser.

T3 = Tumeur envahissant toute la paroi sans la dépasser.

T4 = Tumeur dépassant la séreuse.

2. Envahissement ganglionnaire (N)

N0 = Absence de métastase ganglionnaire régionale.

N1 = Métastase dans un à trois ganglions régionaux.

- **N1a** = 1 ganglion envahi.

- **N1b** = 2 ou 3 ganglions envahis.

- **N1c** = présence d'embolies tumorales dans la sous-séreuse sans métastase ganglionnaire.

N2 = Métastase dans 4 ganglions régionaux ou plus.

- **N2a** = 4 à 6 ganglions envahis.

- **N2b** = 7 ganglions envahis ou plus.

Nx = Statut ganglionnaire inconnu.

3. Métastases (M)

M0 = Absence de métastase.

M1 = Présence de métastases à distance.

- **M1a** = limité à un site ou organe.

- **M1b** = touchant plusieurs organes ou le péritoine.

Mx = Statut métastatique inconnu.

Annexes

Tableau XV : Stades regroupés

Stade 0	Tis	N0	M0
Stade I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
Stade IIA	T3	N0	M0
Stade IIB	T4a	N0	M0
Stade IIC	T4b	N0	M0
Stade IIIA	T1	N1	M0
	T1, T2	N2a	M0
Stade III B	T1, T2	N1	M0
	T3, T4	N2a	M0
	T2, T3	N2b	M0
Stade IIIC	T4a	N2a	M0
	T 3, T4	N2b	M0
	T4b	N1, N2	M0
Stade IV	Tout T	Tout N	M1a
Stade IV	Tout T	Tout N	M1b

Annexes

Annexe II

Matériels non biologiques

1. Technique d'histopathologie

Tableau XVI: Les réactifs utilisés dans l'histopathologie

Réactifs	Références
Formol à 10%	SIGMA ALDRICH Réf : 4N2203
Ethanol	CARLO-ERBA
Xylène	SIGMA ALDRICH Réf : 16 446
Paraffine	Panreac CE 232-315-6
Hématoxyline de Mayer	CRESCENT DIAGNOSTICS
Eosine	SIGMA life science 45 240
Eukit	FLUKA 03989

Equipement médical

Petit matériel

Cassettes, Lames (deltalab D100002), Lamelles (deltalab D102440), Moules d'incubation.

Porte lame, Pince, Bistouri, Lame de dissection.

Tableau XVII : Les appareillages utilisés dans l'histopathologie

Appareil	Référence
Automate d'incubation	TISSUE-TNK'III
La station d'enrobage	LEICA TP 1020
Microscope photonique	Zeiss AXIOSTAR Plus
Microtome	LEICA RM 2235
Bain marie	OSI MH 85148
L'étuve	SAKURA/Memmert
Automate de coloration	LEICA ST 4040

Annexes

2. Technique d'immunohistochimie

Tableau XVIII : Les réactifs utilisés dans l'immunohistochimie

Réactif	Référence
Monoclonal mouse antihumain p53 protein clone Do-7	IS 616
Anti –Epidermal Growth Factor Receptor (3C6)	
TRS à pH=9 (Solution Target Retrieval high pH 50x)	k8000
DAKO Real™ Antibody Diluent	S 2022
Solution PBS Wash buffer (20×)	K 8000
DAKO REAL™ Peroxidase-Blocking solution	S 2023
Dako REAT™ HRP anti RABBIT/MOUSE (ENV)	K 5007
DAKO DAB+CHROMONGENE (substrat chromogène contenant le 3,3'-dibenzidine) (DM827)	K 8000
DAKO SUBSTRATE BUFFER (SM803)	K 8000
Eau distillée (Distillateur)	ELGA
Eau oxygénée (DAKO Real™)	S2023
Eau ammoniacquée (Flux BOIX)	R36/37/38
DAKO Faramount aqueous mounting medium ready to use	S 3025
Hématoxyline de Mayer's DAKO	S3309

Equipement médical

Petit matériel

Lames silanisées /lamelles (deltalab D102440), Micropipettes, Pipettes, Bac en verre, Bac en plastique, Bac en plastique avec couvercle. Porte-lames en verre, Porte-lames en plastique, Erlenmayer, Mircotubes (tube eppendorf), Embouts micropipette, DAKO pen S2002.

Tableau XIX: Les appareillages utilisés dans l'immunohistochimie.

Appareillages	Références
Etuve	Sakura
Agitateur magnétique (Stuart)	stu SB161
Agitateur magnétique pour tube	Janke et Kunkelika-werk
Bain marie	Memmert
Microtome	Leica RM 2235
Microscope photonique	Zeiss AXIOSTAR Plus
Appareil photos	SAMSUNG LENS HD 1 :2.5-6.3

Annexes

3. Technique de la PCR en temps réel :

Tableau XX: Les appareillages et les kits utilisés dans la technique de la PCR en temps réel

Les kits	Les appareillages
Tampon de lyse de tissu d'ADN (DNA TLB)	Analyseur (Cobas z 480)
Protéinase K(PK)	Lecteur de code-barres ext USB.
Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine (DNA PBB)	Imprimante canon laser
Tampon de lavage I de l'ADN (WB I)	Unité de contrôle du système Cobas® 4800 avec image Windows XP
Tampon de lavage II de l'ADN (WB II)	Micro-centrifugeuse (8000 x g et de 16000 à 20000 x g)
Tampon d'éluion de l'ADN (DNA EB)	Blocs à chaleur sèche.
Mélange réactionnel KRAS (KRAS MIX)	Spectrophotomètre Nanodrop
Acétate de magnésium(MGAC)	Mélangeur Vortex
Mélange oligo de codon 12/13 du KRAS(KRAS 12/13 OM)	Bain-marie
Mélange oligo de codon 61 du KRAS (KRAS 61 OM)	Agitateur
Contrôle mutant KRAS (KRAS MC)	Thermomètres étalonnés pour bloc à chaleur sèche
Calibrateur KRAS (KRAS CAL)	Congélateur
Diluant échantillon d'ADN (DNA SD)	
Xylène	
Éthanol absolu	
Isopropanol	

Petit matériel

- Tubes de filtration avec bouchons(**FT**). Tubes de prélèvement(**CT**). Microplaque (plaque AD) et film d'étanchéité. Pipettes sérologiques jetables et stériles. Lame d'étalement. Panier pour lames. Micropipettes.

Annexes

Les kits du KRAS

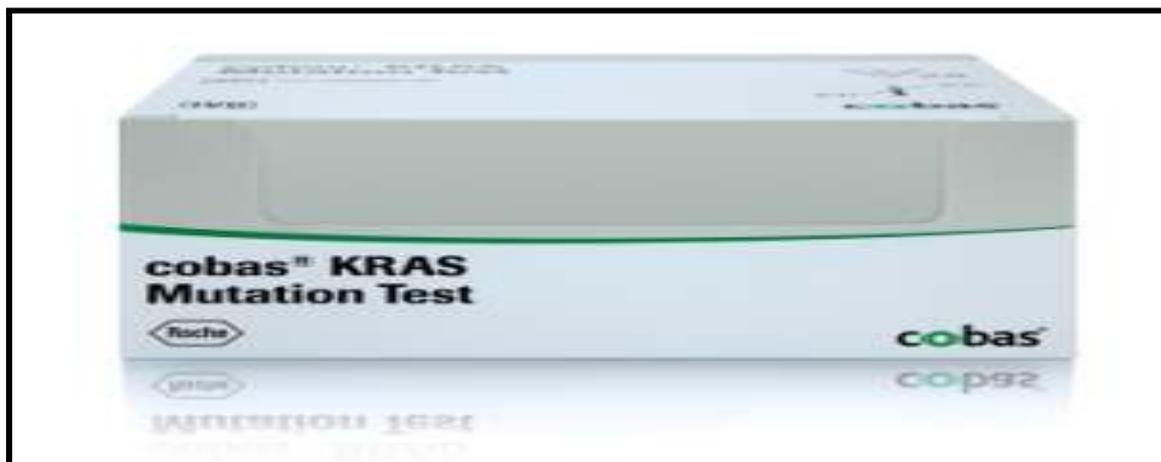
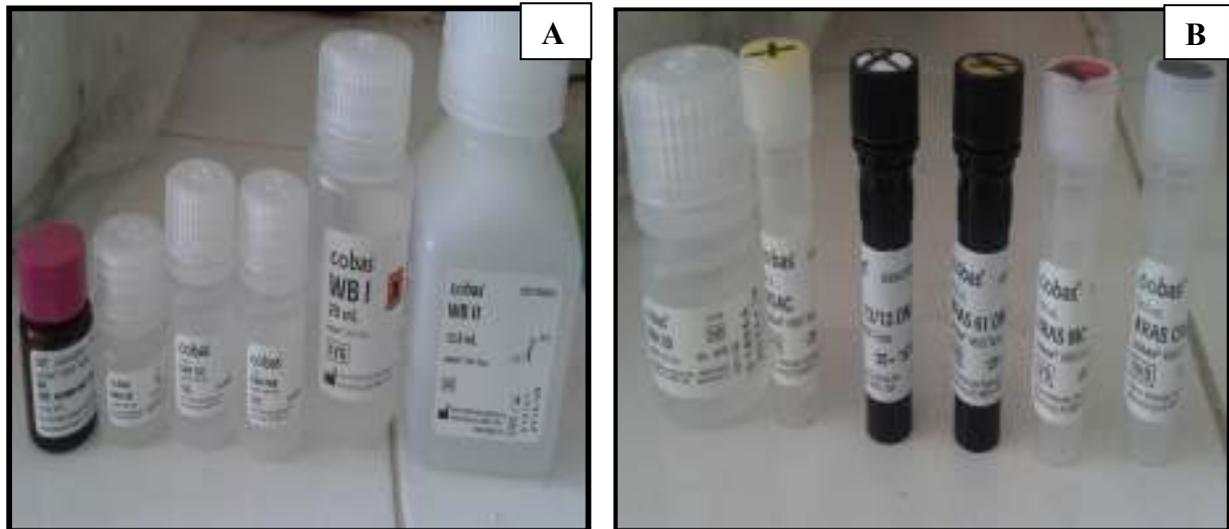


Figure 39: Les kits du KRAS

A : kits d'extraction du l'ADN

B : Kit de détection des mutations

Annexes

Annexe III

Tableau XXI : Caractéristiques des patients

N°	Sexe	Age (an)	Localisation	Type Histologique	Taille	Stade	Score P53	Score EGFR
1	F	33	Colon sigmoïde	ABD	6×5×3.5 cm	pT3 N1 M1	2	0
2	F	59	Colon gauche	ABD	6.5×4.5 cm	pT3 N1 b M1	0	2
3	H	83	Rectum	ABD	6×3.5 cm	pT3 N2 b M0	0	1
4	H	51	Colon sigmoïde	ABD	5 cm	pT2 N1 a M0	0	1
5	F	70	Colon droit	ABD	3.6×3.5 cm	pT2 N1 B M0	3	0
6	H	77	Colon gauche	ABD	4 cm	pT3 N1 c M0	5	0
7	H	56	Colon sigmoïde	ABD	3.5 cm	pT3 N1 c M0	4	0
8	F	57	Rectum	AMD	7.4 cm	pT3 N1 M0	5	1
9	F	68	Rectum	ABD	4.5×4×0.5 cm	pT3 N2 a M0	5	0
10	F	43	Recto-sigmoïdien	ABD	2.5×2 cm	pT3 N1 M0 R0	3	3
11	F	70	Colon sigmoïde	ABD	2.5×2.5 cm	pT3 N1 M1	1	1
12	H	71	Colon sigmoïde	ABD	2×2.5 cm	pT3 N1 M0	4	3
13	F	82	Colon droit	ABD	10 cm	pT3 N1 M0	0	1
14	H	61	Colon gauche	ABD	6×6 cm	pT3 N1 b M0	4	1
15	H	79	Rectum	ABD	7.5×5 cm	pT3 N2 a M0	5	1
16	F	43	Rectum	ABD	1.5×1 cm	pT3 N2 b M1a	4	2
17	F	75	Colon gauche	ABD	5×3.5 cm	pT3 N1a M1a	4	1
18	H	43	Rectum	ABD	12×1.5 cm	pT3 Nb1 M0	2	3
19	F	31	Colon sigmoïde	AMD	5×3 cm	pT4 N2b M1	5	1
20	H	73	Colon sigmoïde	ABD	3.5 cm	pT3 N1b M1	5	0
21	H	72	Colon droit	APD	6.5×5cm	pT3 N1b M0	4	0
22	F	64	Rectum	ABD	5×3.5 cm	pT3 N1a M1a	5	2
23	F	62	Rectum	ABD	4×3.5 cm	pT3 N1 M1	2	3
24	F	71	Colon droit	ABD	12×1 cm	pT3 N0 M1	5	1
25	F	46	Recto-sigmoïdien	ABD	3.5×3.5 cm	pT1 N1 M1	4	1
26	H	55	Recto-sigmoïdien	ABD	7 cm	pT4a N2a M0	2	0
27	F	41	Recto-sigmoïdien	ABD	3×2.5 cm	pT3 N2a M0	2	1
28	F	54	Rectum	ABD	4 cm	pT3 N2 M1a	2	1
29	H	77	Colon droit	ABD	4 cm	pT3 N1 M0	0	1
30	H	68	Rectum	AMD	3 cm	pT3 N1 M0	3	1

ADK : Adénocarcinome. **ABD** : Adénocarcinome Bien Différencié. **AMD** : Adénocarcinome Moyennement Différencié. **APD** : Adénocarcinome Moyennement Différencié.

Annexes

Annexe IV



Figure 40:Automate de circulation



Figure 41 : Remplissage des tissus par la paraffine



Figure 42 : le remplissage des moules sur la plaque froide



Figure 43 : les blocs



Figure 44 : Confection des coupes



Figure 45 :L'étalement du ruban sur la lame



Figure 46 : Automate de coloration



Figure 47 : Lame HE

Annexes

Annexe V

Calcul de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon :

- ❖ Calcul de la dilution du stock d'ADN à des concentrations comprises entre 4 ng/μL et 28 ng/μL

A. Pour chaque échantillon, calculer le volume (μL) de stock d'ADN nécessaire :

$$\text{Volume de stock d'ADN} = (70 \mu\text{L} \times 2 \text{ ng}/\mu\text{L}) \div \text{concentration du stock}$$

B. Pour chaque échantillon, calculer le volume (μL) de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD) nécessaire :

$$\text{Volume de DNA SD} = 70 \mu\text{L} - \mu\text{L de stock d'ADN}$$

- ❖ Calcul de la dilution du stock d'ADN à des concentrations > 28 ng/μL

A. Si les concentrations du stock d'ADN sont > 28 ng/μL, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de diluant

D'échantillon d'ADN (DNA SD) nécessaire pour préparer au moins 70 μL de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μL de stock d'ADN.

B. Pour chaque échantillon, calculer le volume (μL) de DNA SD nécessaire pour diluer 5 μL de stock d'ADN à 2 ng/μL :

$$\text{Vol. de DNA SD nécessaire en } \mu\text{L} = [(5 \mu\text{L de stock d'ADN} \times \text{concentration du stock d'ADN en ng}/\mu\text{L}) / 2 \text{ ng}/\mu\text{L}] - 5 \mu\text{L}$$

Tableau XXII : les calculs de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon

Les patients	1ere lecture	2eme lecture	concentration du stock	stock d'ADN	DNA SD
7442 /13	38	35	36,5	5 μL	86,25 μL
5001/13	20	15	17,5	8 μL	62 μL
6074/13	13	8	10,5	13,33 μL	56,67 μL
74/14	20	15	17,5	8 μL	62 μL
1080/14	15	10	12,5	11,2 μL	58,2 μL
7495/13	20	15	17,5	8 μL	62 μL
280/14	38	38	38	5 μL	90 μL
6993/13	25	13	19	7,4 μL	62,6 μL
2292/14	5	5	5	28 μL	42 μL
2848/14	18	13	15,5	9,03 μL	60,97 μL
1321/14	8	5	6,5	21,5 μL	48,5 μL

Annexes

Tableau XXIII : Volumes de réactifs nécessaires pour les mélanges réactionnels actifs MMX 12/13 et MMX 61

		Volumes de réactifs nécessaires pour le mélange réactionnel actif									
		Nombre d'échantillons*									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
KRAS MIX	10 µL	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
KRAS 12/13 OM ou KRAS 61 OM	10 µL	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140
MGAC	6 µL	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84
Volume total (µL)		130	156	182	208	234	260	286	312	338	364

Tableau XXIV : Disposition de la plaque d'échantillons

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	KRAS MC 12/13	KRAS MC 61	Echant. 6 12/13	Echant. 6 61	Echant.14 12/13	Echant.14 61	Echant.22 12/13	Echant.22 61				
B	NEG CTL 12/13	NEG CTL 61	Echant. 7 12/13	Echant. 7 61	Echant.15 12/13	Echant.15 61	Echant.23 12/13	Echant.23 61				
C	KRAS DAL 12/13	KRAS DAL 61	Echant. 8 12/13	Echant. 8 61	Echant.16 12/13	Echant.16 61	Echant.24 12/13	Echant.24 61				
D	Echant. 1 12/13	Echant. 1 61	Echant. 9 12/13	Echant. 9 61	Echant.17 12/13	Echant.17 61						
E	Echant. 2 12/13	Echant. 2 61	Echant.10 12/13	Echant.10 61	Echant.18 12/13	Echant.18 61						
F	Echant. 3 12/13	Echant. 3 61	Echant.11 12/13	Echant.11 61	Echant.19 12/13	Echant.19 61						
G	Echant. 4 12/13	Echant. 4 61	Echant.12 12/13	Echant.12 61	Echant.20 12/13	Echant.20 61						
H	Echant. 5 12/13	Echant. 5 61	Echant.13 12/13	Echant.13 61	Echant.21 12/13	Echant.21 61						

Tableau XXV : Caractéristiques des 11 patients atteints le CCRm.

Les patients	L'âge	sexe	Localisation tumorale	Type histologique	Stade pTNM	P53	EGFR	Résultats du KRAS
7442 /13 (1)	33	F	Colon	ABD	IV	2	0	Mutation codon12/13
5001/13 (22)	64	F	Rectum	ABD	IV	5	2	Mutation Codon 61
6074/13 (28)	54	F	Rectum	ABD	IV	2	1	Pas de mutation
74 /14 (74)	42	F	Rectum	ABD	IV	4	1	Pas de mutation
1080 /13 (17)	75	F	Colon	ABD	IV	4	1	Pas de mutation
7495/13 (2)	59	F	Colon	ABD	IV	0	2	Pas de mutation
280 /14 (11)	70	F	Colon	ABD	IV	1	1	Mutation codon12/13
6993/13 (13)	82	F	Colon	ABD	IV	0	1	Mutation codon12/13
2292 /14 (20)	57	F	Colon	ABD	IV	5	1	Mutation codon12/13
2848/14 (24)	69	F	Colon	ABD	IV	5	1	Mutation codon12/13
1321/14 (16)	58	F	Rectum	ABD	IV	4	2	Mutation codon12/13

Annexes

Annexe VI

Les appareillages utilisés



Microtome



Etuve



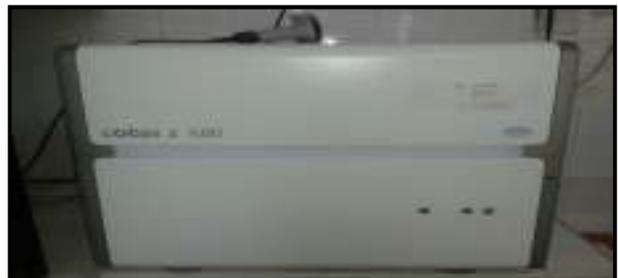
Bain marie



Micro-centrifugeuse



Spectrophotomètre Nanodrop



PCR en temps réel (Cobas z 480)



Analyseur (Cobas z 480)

Annexes

ملخص

إن سرطان القولون و المستقيم يعتبر مشكلا كبيرا بالنسبة للصحة و هذا بسبب كثرته و خطورته فهو يمثل النسبة الثانية في الجزائر و يحتل المركز الثاني بالنسبة للوفيات بسبب السرطان.

لقد حاولنا في دراستنا تقييم تعبير عوامل التنبؤ p53 و EGFR بواسطة الكشف المناعي النسيجي الكيميائي شمل 30 مريضا مصابون بسرطان القولون و المستقيم إما منتشرا أو غير منتشر ، و الكشف عن المتغيرات و الطفرات لجينات كيراس من أجل الدواء اللانق (الدواء الموجه) بتقنية البيولوجيا الجزيئية PCR في الوقت الحقيقي شمل 11 مصابا .

P53 معبرة في 24 حالة (80%) و EGFR 23 حالة (73.33%).

إن الدراسة الإحصائية كشفت أنه لا توجد أي صلة ملحوظة بين التعبير لهذين العاملين التنبؤيين مع الجنس ، السن ، موقع المرض و درجة تطوره ($p>0.05$) ، و هناك دراسات أثبتت نتائج دراستنا.

إن وجود المتغير الجناي كيراس كان متوقع من حيث غياب الاستجابة للأدوية المقصودة ضد EGFR مستعملين الأجسام المضادة وحيدة النسيلة ، من بين 11 مصابا توجد 7 حالات تظهر وجود طفرة لجينات كيراس ، من بين 6 حالات (85.71%) الطفرة موجودة في تسلسل معلومات النظام الجيني 12/ 13 و حالة فريدة (9.09%) تحمل الطفرة على تسلسل معلومات النظام الجيني 61.

الدراسة الإحصائية بينت أنه لا توجد أي صلة إحصائية ملحوظة بين متغير كيراس و باقي المعطيات الكلينيكوباتولوجية ($P>0.055$) و التعبير على P53 و EGFR.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون و المستقيم , الكشف المناعي النسيجي الكيميائي , كيراس ,

Introduction

Chapitre I :
Etude bibliographique

Chapitre II :
Matériels et méthodes

Chapitre III :
Résultats et discussion

Chapitre IV :

Discussion

Conclusion

Références bibliographiques

Annexe