



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Blida 1
Faculté de sciences biologiques
Département de biologie-physiologie cellulaire

Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme de Master
Filière : Sciences Biologiques
Spécialité : Génétique-Physiologie

Profil comparatif entre les marqueurs immunohistochimique et moléculaire de la mutation du gène N-Ras dans le cancer colorectal métastatique

➤ Présenté par : El Robrini Fatma Zohra
LERADJ Iméne

Soutenue le :

Devant le jury :

Mme HERKAT Souhila	MAA	USBD-1-	Présidente
Mme BENAZZOUZ Falla	MAA	USDB-1-	Examinatrice
Mme KHALIFA Samia	MAA	EHS Franz-Fanon	Promoteur
Mr BESSAAD Med el Amine	MCB	USDB-1-	Co- promoteur

2015-2016

Remerciements

Nous remercions le Seigneur pour la persévérance, le courage, la santé, l'ouverture d'esprit et l'inspiration dont il nous a gratifié. Aussi, le présent mémoire n'aurait pas vu le jour sans l'aide bienveillante, la compréhension et le dévouement d'un certain nombre de personnes qui, par leur présence et leurs conseils, nous ont apporté leur soutien. Nous les en remercions et nous excusons de ne pouvoir toutes les citer.

*Au terme de ce travail, Nous voudrions exprimer nos sincères remerciements à madame la promotrice de ce mémoire **Khalifa Samia**, maître assistante et médecin anatomopathologiste au CHU FRANTZ FANON Blida, et d'accepter de nous encadrer tout au long de l'élaboration de ce mémoire. Veuillez trouver ici l'expression de toute notre considération.*

*Nous tenons à remercier madame le professeur **W.OUAHIOUN**, professeur anatomopathologiste et chef de service d'anatomo-pathologie au CHU FRANTZ FANON Blida, pour nous avoir accueillie au sein de son équipe, d'avoir mis à notre disposition les moyens matériels et scientifiques et de nous avoir permis la réalisation de ce travail.*

Nous présentons notre sincère gratitude et notre profonde reconnaissance au docteur maître de conférence monsieur Bessaad Mohamed El Amine, qui par son aide précieuse, ses conseils, ses critiques constructives et ses précieuses directives données avec une extrême générosité durant notre encadrement, nous a permis d'avancer et de mener à bien ce modeste travail. Ses valeurs humaines, sa disponibilité, son sérieux et sa générosité nous servent d'exemple dans notre vie professionnelle. Son expérience et sa compétence ne cessent de susciter notre admiration. Que ce travail soit le gage de notre profonde reconnaissance et de notre admiration.

*Nous remercions vivement le chef de département de BPC madame **Saadi. L** et monsieur le chef d'option de génétique de USD Blida monsieur **Mohammed Said .R.***

*Nous remercions vivement la présidente de jury, madame **Herkat. S**, à la faculté de biologie de Blida, d'avoir accepté de juger ce travail.*

*Nous remercions madame **Ben Azzouz ; F**, à la faculté de biologie Blida, d'avoir accepté de juger ce travail et d'être l'examinatrice*

Au terme de ce travail nous remercions tous les professeurs pour nous ont encouragé et aidé tout au long de mes années d'études pour leur confiance et encouragement et dont nous serions toujours reconnaissantes.

*Nos remerciements s'adressent aussi au docteur **Saidi** et docteur **Zemmouri** médecins anatomopathologistes, pour leur patience, leur disponibilité et leurs explications au cours de la réalisation de la partie pratique de ce travail.*

Nous souhaitons exprimer notre affection et notre immense reconnaissance au biologistes de services d'anatomopathologie pour leur gentillesse et surtout pour leur haute qualité humaine.

*Merci à tout le personnel du laboratoire service d'anatomopathologie à **FRANTZ FANON** Blida, qui nous ont aidé à réaliser ce travail et pour l'ambiance agréable sans laquelle aucun travail serein n'est envisageable.*

*A nos camarades de ces cinq ans d'études merci beaucoup...
A tous nous exprimons notre sincère gratitude et notre reconnaissance.*

Dédicace

Je dédie ce travail

A mes parents

Qu'ils trouvent ici ma reconnaissance et mon admiration.

Aucune dédicace ne saurait exprimer les sacrifices et la patience que vous m'avez consentie .Que Dieu vous protège.

A mon frère : Belkacem

Avec toute mon affection je vous souhaite santé, prospérité et un grand avenir.

A toute ma famille

En témoignage de mon attachement, mon respect et de leur encouragement.

A mes amis

*Qui ont fait preuve d'une amitié incomparable,
qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère amitié.*

A mon cher Akram

Pour sa patience je vous souhaite santé, prospérité et un grand avenir.

*A mes très chers amis Iméne, Yasmine, Iméne, Aicha, Hania, Fethia, Lamia,
Houda, Farah, Sanaa , Fatiha, Nawel, Mahdia .*

« La science consiste à passer d'un étonnement à un autre »

Aristote

El Robrini Fatma Zohra

DÉDICACE

Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, le respect, la reconnaissance, c'est tous simplement que :

Je dédie cette thèse de master à:

*A ma tendre mère **TOBAL Razika***

Tu représente pour moi la source de tendresse et l'exemple de dévouement qui n'a pas cessé de m'encourager. Tu as fait plus qu'une mère puisse faire pour que ses enfants suivent le bon chemin dans leur vie et leurs études.

*A mon très cher Père **LERADJ Mohamed***

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

*A mes grands pères – **Bakhti et Djillali** que dieu les protège.*

*A mes chères sœurs **Ratiba, Wahiba, Hanane, et Manel.***

*A mes chers frères **Toufik, Billel, et Mohamed.***

*A **Adem** et **younes** je t'aime énormément.*

*A toutes les familles **LERADJ, TOBAL***

*A monsieur **Nadour Adel***

Cette humble dédicace ne saurait exprimer mon grand respect et ma profonde estime. et à tous mes collègues de la pharmacie surtout mon oncle nacer que dieu le protège.

*A mes très chers amis **Zahra, Yasmine, Iméne, Aicha, Ibtisem, Hania, Fethia, Lamia, Houda, Farah, Assia, Abla, Nawel, Karima, Amel, Nesrine, Djamilia.***

A tous les membres de ma promotion

A tous mes enseignants depuis mes premières années d'études.

A tous ceux qui me sens chers et que j'ai omis de citer.

LERADJ Iméne

Liste d'abréviations

ACE :	Antigène Carcinoembryonnaire
ADN :	Acide Désoxyribonucléique
AKT :	PKB protéine kinase B
APC :	Adenomatous Polyposis Coli
ARNm :	Acide Ribonucléique Messenger
BRAF :	Protéine B-Raf
CA 19-9 :	Antigène carbohydrate 19.9
CA 50	Antigène carbohydrate 50
CA 72-4	Antigène Carbohydrate
CCR :	Cancer Colorectal
CCm :	Cancer Colorectal Métastatique
CDX2 :	Caudal Type Homeobox 2
CIMP :	CpG Island Methylator Phenotype
EGF :	Epidermal Growth Factor
EGFR :	Epidermal Growth Factor Receptor
ELAM-1 :	Endothelial cell leukocyte adhesion molecule-1
ERK :	Extracellular Signal-Regulated Kinase
E-sélectine	cell surface receptor produced by endothelium
Gap :	GTPase Activating Protein
GDP :	Guanosine Diphosphate
GEF :	Guanine nucleotide exchange factor
Grb2 :	Growth Factor Receptor Bound Protein
GTP :	Typical G-Protein
GTPase :	enzyme activity that catalyzes the hydrolysis of guanosine triphosphate to guanosine diphosphate and orthophosphate.
HER :	human epidermal growth factor receptor

HNPCC :	Hereditary Non Polyposis Colon Cancer
HRM :	High Resolution Melt
HRAS :	Harvey RAS
IHC :	Immunohistochimie
KRAS :	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
MAP :	Mitogen-Activated Protein
MAPK :	Mitogen-Activated Protein Kinases
MEK :	Mitogen-Activated protein Kinase
MICI :	Maladies Inflammatoires Chroniques Intestinales
MMR :	Mismatch Repair
MMP	Métalloprotéases de la matrice
MSI :	Microsatellite Instability
mTOR :	Mammalian Target Of Rapamycin
NRAS :	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
Nf1 :	Neurofibromatosis type 1
PDK1 :	Phosphoinositide-Dependent Kinase-1
PIB :	Protein IB
PIP2 :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate or PtdIns(4,5)P ₂
PI3K :	Phosphoinositide 3-Kinase
Pkc :	Protein Kinase C
Plc :	Phospholipase C
protéine RAF :	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein
RALGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator
SOS :	Son Of Sevenless Homolog
TAG 72	Tumor associated glycoprotein 72
TGF :	Transforming Growth Factor
TIAM :	T-cell lymphoma Invasion And Metastasis-Inducing Protein
TIMP1	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases 1

TIMP2	Inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases 2
TNM :	Tumor, Nodes, Metastasis
TP53 :	Tumor Protein
TPA	Antigène polypeptidique de tissu
TPS	Antigène polypeptidique spécifique
Wnt :	Wingless-type MMTV integration site
5-FU	5-fluorouracile

Liste des figures

Figure 1 : Anatomie du côlon. (S. NGUYEN, R. BOUROUINA 2008).	3
Figure 2 : Anatomie du côlon (C. SEDKAOUI, 2015)	4
Figure 3 : Les différentes couches de la paroi du côlon. (Institut National du Cancer, 2010)	4
Figure 4 : Polype pédiculé du colon. (S. NGUYEN, R. BOUROUINA ,2008).	6
Figure 5 : Apparence de l'intérieur d'un côlon développant un carcinome colorectal invasif (INC, 2015)	6
Figure 6 : Evolution du cancer . (Association canadienne du cancer, 2016).	7
Figure 7 : Rectocolite ulcéro-hémorragique.	8
Figure 8 : Tumeur d'aspect blanchâtre et consistance dur dans le côlon droit. (CHU Blida, 2016).	9
Figure 9 : Voies RAS/RAF/MAK/MAPK et PI3K/AKT. (Johnson, S.M. et al, 2005)	11
Figure 10 : La classification TNM du cancer colorectal (Association canadienne du cancer, 2016).	12
Figure 11 : Métastases hépatiques (L'Agence Comsource, 2013).	14
Figure 12 : Voie d'activation de Ras. (J.Colicelli , 2004).	20
Figure 13 : Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval. (Shaw RJ, Cantley LC et al, 2006).	23
Figure 14 : Localisation du Nras sur le chromosome 1.	25
Figure 15 : Le résultat de séquençage représentant le cas de N-Ras muté.	31
Figure 16 : Une partie du côlon droit malade.	32
Figure 17 : Tumeur d'aspect blanchâtre.	32
Figure 18 : Des coupes dans la tumeur.	33
Figure 19 : Des ganglions a analysées.	33
Figure 20 : Automate de traitement des tissus	33
Figure 21 : Un moule contenant l'échantillon avec de la paraffine	33
Figure 22 : Le fond de la cassette sur l'échantillon dans le moule.	33
Figure 23 : Détachement du moule.	34
Figure 24 : Echantillon congelé.	34
Figure 25 : Le microtome.	34
Figure 26 : Coloration par automate de coloration : Hématoxyline Eosine (HE).	35
Figure 27 : La cocotte.	36
Figure 28 : Répartition des patients selon le sex.	39

Figure 29 : Types d'échantillons sélectionnés.....	40
Figure 30 : Siège de la tumeur.....	40
Figure 31 : Mutation du côlon gauche.....	40
Figure 32 : Répartition de grade.....	41
Figure 33 : Représentation de la répartition des résultats de séquençage.....	41
Figure 34 : Répartition des métastases chez nos patients.....	42
Figure 35 : Paroi épithéliale normale.....	43
Figure 36 : Muqueuse normal.....	43
Figure 37 : Vaisseau sanguin normal.....	43
Figure 38 : Observation microscopique d'un tissu cancérisé du côlon impliquant la mutation N-Ras (différents grossissement).....	44
Figure 39 : Observation microscopique d'un tissu cancérisé du côlon impliquant la mutation K-Ras (travées et quelques glandes).....	45
Figure 40 : Glande centrée de nécrose (gène K-Ras).....	45
Figure 41 : Adénocarcinome bien différencié (K-Ras).....	46
Figure 42 : Adénocarcinome moyennement différencié.....	46
Figure 43 : Adénocarcinome colloïde.....	46
Figure 44 : Adénocarcinome peu différencié.....	47
Figure 45 : Immunohistochimie d'une tumeur N-Ras (N-Ras+).....	48
Figure 46 : Immunohistochimie d'une tumeur N-Ras (N-Ras négatif).....	48

SOMMAIRE

A. Synthèse bibliographique

Introduction	1
I : Le côlon et le rectum	2
I-1 –Définitions	2
I-2-Anatomie du côlon	2
I-3-Histologie du côlon	3
I-4-Physiologie du côlon et du rectum	4
II : Pathologie du côlon et du rectum	4
II-1-Anatomopathologie	4
II-2-Histopathologie	5
II-2-1Les voies de dissémination	5
II-3-Maladies du côlon	6
II-3-1-Maladies héréditaires du côlon	6
II-3-1-a- Le syndrome HNPCC	6
II-3-1-b Le syndrome de Muir-Torre	7
II-3-2-Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI)	7
II -3-2-a La rectocolite ulcéro-hémorragique	7
II-3-2-b-La maladie de Crohn	7
III : Le cancer colorectal	8
III -Le cancer	8
III-1-Définition du cancer colorectal	8
III-2-Epidémiologie du cancer colorectal	8
III-3-Carcinogènèse colorectal	9
III-3-1-Les principaux mécanismes de carcinogènèse colorectale	9
III-3-1-a L’instabilité des microsatellites	9
III -3-1-b-L’instabilité chromosomique	9
III-3-1-c L’instabilité épigénétique	9
III-3-2-Principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogènèse colorectale	9

III -Les stades du cancer colorectal selon la classification TNM.....	10
III -Cancer colorectal métastatique.....	12
III-5-1 -Les métastases colorectales	12
III.5.2. -Facteurs de risques.....	13
III.5.2.a -Les principaux facteurs de risque de cancer colorectal.....	13
III.5.2.b - Les Facteurs Environnementaux.....	13
III.5.3 -Facteurs protecteurs	13
III.6 -Symptômes d'un cancer colorectal.....	13
III.6.1 -Signes et symptômes primaires du cancer colorectal	14
III.6.2 -Signes et symptômes tardifs	14
III-7 -Diagnostic	14
III.8 -Traitement.....	15
IV : Les marqueurs tumoraux et dépistage du cancer colorectal	16
IV.1 -Définition des marqueurs tumoraux.....	16
IV-2. Classification des marqueurs tumoraux.....	16
IV-3. Les marqueurs tumoraux spécifiques du cancer colorectal	16
IV-3-1 Antigène carcinoembryonnaire (ACE).....	16
IV-3-2 Antigène carbohydrate 19.9 (CA 19.9).....	16
IV-3-3 CDX-2.....	17
IV-3-4 Les autres marqueurs.....	17
IV-4- Dépistage du cancer colorectal.....	17
V : Le gène N Ras	18
V-1 Gène Ras	18
V-1-1 Fonctionnement et activation de la protéine Ras.....	18
V-1-2 Les différentes isoformes de Ras.....	19
V-1-3 Le K-Ras dans le CCR.....	20
V-1-3-1 -Les mutations somatiques de l'oncogène K-Ras.....	20
V-1-4 L'EGFR, voies de signalisation RAS/MAPK et PI3K/AKT, et carcinogenèse colorectale.....	21
V-2 La protéine oncogène RAS.....	22
V- 2-1 Rôle de Ras dans la tumorigenèse	22

II.1. Les patients	
V-3 Le gène N-Ras définition	24
V-3-2 Découverte.....	24
V-3-3 Fonction.....	24
V-3-4 Principales mutations de N-Ras et rôle dans le cancer colorectal	25
V-4 Comparaison entre N-Ras et K-Ras.....	26
V-5 Le Séquençage	26
V-6 L'immunohistochimie	26
I. Objectifs	28
II.MATERIEL	28
III.METHODES	28
III.1- Partie rétrospective (Biologie moléculaire).....	29
III.2.Partie prospective	30
III.2.1. Prélèvements	30
III.2.2. Réception des échantillons et macrotomie.....	30
III-2-3- Microtomie	32
III-2-4 Immunohistochimie	34
Résultat	36
Discussion	47
Conclusion	49
Référence	
Annexe	

Glossaire

Adénocarcinomes : Un adénocarcinome est une tumeur maligne développée aux dépens d'un épithélium glandulaire. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Angiogenèse : est le processus de croissance de nouveaux vaisseaux sanguins (néovascularisation) à partir de vaisseaux préexistants. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Cancer somatique Les cellules somatiques désignent l'ensemble des cellules de l'organisme qui ne sont pas impliquées dans la reproduction et la fécondation, autrement dit, toutes les cellules de l'organisme sauf les ovules et les spermatozoïdes. Pour cette raison, la mutation ne sera pas transmise à la descendance. On parle de forme sporadique lorsque ce sont ces mutations dites somatiques qui sont impliquées dans un cancer. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Carcinome : Un carcinome ou épithélioma est un cancer développé à partir d'un tissu épithélial. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Côlon sigmoïde : Le côlon sigmoïde (ou côlon pelvien) est une partie du côlon, c'est une boucle située entre la fosse iliaque gauche de l'abdomen et le petit bassin. Il fait suite au côlon descendant en haut, et est relié au rectum en bas. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Dysplasiques : Une dysplasie est une malformation ou déformation résultant d'une anomalie du développement d'un tissu ou d'un organe, qui survient au cours de la période embryonnaire ou après la naissance, elle se traduit généralement par une hyperlaxité des articulations concernées, elle peut aussi se situer sur n'importe quelle articulation. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Embole : embolus, petit corps de natures diverses qui, entraîné par la circulation sanguine, obture brusquement une lumière artérielle ou veineuse et provoque une embolie. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**).

Extension : En médecine, l'extension est un mouvement consistant à augmenter l'angle entre deux os. En neurophysiologique, le réflexe d'extension est un aspect du réflexe myotatique. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Gène suppresseur de tumeurs : Un gène suppresseur de tumeurs est un régulateur négatif de la prolifération cellulaire. Et dont l'absence d'expression ou la délétion peut entraîner l'apparition d'une *tumeur* cancéreuse. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

In situ : est une locution latine qui signifie **sur place** ; elle est utilisée en général pour désigner une opération ou un phénomène observé sur place, à l'endroit où il se déroule (sans le prélever ni le déplacer), par opposition à *ex situ*. L'expression comporte des significations

spécifiques dans des contextes très divers. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Métalloprotéases constituent une famille d'enzyme de la classe des peptidases, appelées ainsi en raison de la présence dans leur site actif d'un ion métallique qui participe à la catalyse de la coupure de la liaison peptidique dans les protéines(**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Nécrose : mortification de cellules ou de tissus privés de leurs apports nutritionnels et vitaux. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**).

Oncogènes : Qui est impliqué dans l'apparition d'une tumeur cancéreuse. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Polype : est une croissance anormale de tissus en saillie (adénome), ou tumeur bénigne, se développant sur les muqueuses. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Proto-oncogènes : gène impliqué dans le contrôle de la division cellulaire (stimulation) et dont la mutation est à l'origine de tumeurs (prolifération excessive des cellules). (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Sporadique : Qualifie une maladie qui touche seulement quelques individus au sein d'une population, cas par cas, sans qu'il se forme une chaîne de transmission continue. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Sténosante : Une sténose, du grec dérivé de (sténos) « étroit », est une modification anatomique qui se traduit par un rétrécissement d'une structure (canal, vaisseau). Ainsi, la sténose aortique est un rétrécissement de la valve aortique. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Le syndrome de Noonan : est un syndrome d'origine génétique qui se caractérise par un aspect particulier des traits du visage.Des malformations du coeur.et Une petite taille (nanisme). (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Syndrome lymphoprolifératif auto-immune : est une rare anomalie du fonctionnement de la production des lymphocytes(**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Thromboses : formation d'un caillot ou thrombus au niveau d'un vaisseau sanguin ou d'une cavité cardiaque. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Tumeur bénigne : Une tumeur bénigne est une tumeur sans gravité, c'est-à-dire ne pouvant donner lieu à des métastases et n'étant pas mortelle, comme une verrue, par exemple. Néanmoins, une telle tumeur peut évoluer vers une tumeur maligne, qui peut, elle, être fatale si elle n'est pas traitée. (**Dictionnaire médical de l'Académie de Médecine – version 2016**)

Résumé

Le cancer colorectal, par ordre de fréquence dans le monde, est le troisième chez l'homme après celui du poumon et de la prostate et le quatrième chez la femme après celui du sein, du col utérin et des ovaires. Il se développe dans la couche interne du côlon et / ou du rectum, croissant lentement à travers toutes ou une seule partie de ses couches

Le cancer colorectal impliquant la mutation N-Ras est rare par rapport à celui impliquant la mutation K-Ras .

Nous avons cherché à appuyer le diagnostic et le suivi du cancer colorectal par la détection de la mutation du gène N-Ras impliquée en comparant entre une méthode moléculaire, le séquençage d'ADN, et l'immunohistochimie.

En concluant, les tumeurs (N-Ras et K-Ras muté) ne montrent pas de différences significatives cliniques et pathologiques caractéristiques. Donc les analyses suggèrent que les tumeurs RAS mutées représentent un groupe homogène de patients en termes de caractéristiques cliniques.

L'étude moléculaire vient compléter l'étude immuno-histochimique et ajoute en plus de l'aspect histologique, le grade et la possibilité difficile de la détection de la mutation ; la localisation exacte de la mutation qui un facteur prédictif aux traitements anti-EGFR

Mots clés : cancer colorectal , mutation N-Ras ,mutation K-Ras , l'étude moléculaire, l'étude immuno-histochimique, traitements anti-EGFR

Summary

Colorectal cancer, in order of frequency in the world, is third for men after lung and the prostate cancers and for the women is the fourth coming after breast, cervix and ovary cancers. It develops in the inner layer of the colon and / or rectum, ascending slowly through all or only a part of its layers .

colorectal cancer involving the N- Ras mutation is rare compared to one involving the K -Ras mutation .

We sought to support the diagnosis and monitoring of colorectal cancer by detecting the mutation of the N-Ras gene involved by comparing a molecular method, DNA sequencing, and immunohistochemistry.

In conclusion, the tumors (mutated N-Ras and K-Ras) show no significant clinical and pathological differences. Therefore the analyzes suggest that mutated RAS tumors represent a homogeneous group of patients in terms of clinical characteristics.molecular study complements the immunohistochemical study and adds in addition to histology , grade and difficult possibility of detecting the mutation ; the exact location of the mutation that a predictor to EGFR treatments.

Key words :

Colorectal cancer, N- Ras mutation, K -Ras mutation, molecular study , immunohistochemical study ,EGFR treatments.

تلخيص

عالميا يحتل سرطان القولون و المستقيم المرتبة الثالثة عند الرجال بعد سرطان الرئة و البروستاتة و المرتبة الرابعة عند النساء بعد سرطان الثدي و عنق الرحم و المبيض .ينشأ في الطبقة الداخلية للقولون أو المستقيم و يسطع في جزء أو كل أجزاء طبقاته

عدة طفرات وراثية يمكن أن ينتج عنها سرطان القولون من بينها الطفرة N-ras و التي تعد نادرة مقارنة بالطفرة K-Ras

سعيانا لدعم تشخيص ورصد الإصابة بسرطان القولون والمستقيم عن طريق الكشف عن الجين N- بمقارنة الطريقة الجزيئية، تسلسل الحمض النووي، والطريقة المناعية الكمي و نسيجية .

في الختام، الأورام (الطفرات N-Ras و K-Ras) لا تظهر اختلافات كبيرة من حيث المظاهر السريرية والمرضية. لذا التحليلات تشير إلى أن RAS الأورام تمثل مجموعة متجانسة من المرضى من حيث الخصائص السريرية. تكمل الدراسة الجزية الدراسة المناعية الكمي و نسيجية و تضيف الى المظهر النسيجي الرتبة و صعوبة الكشف عن الطفرة : الموقع الدقيق للطفرة الذي يعد مؤشر هام للعلاجات Anti-EGFR

الكلمات المفتاحية

سرطان القولون و المستقيم -الطفرة N-ras- الطفرة K-Ras- الدراسة الجزية- الدراسة المناعية الكمي و نسيجية - للعلاجات Anti-EGFR

Liste des tableaux

Tableau 1 : La classification TNM du cancer colorectal. (J. LAMRANI 2008).....	11
Tableau 2 : Mutation du gène K-Ras les plus fréquentes sur les codons 12 et 13 (Lièvre A, <i>et al</i> , 2008).....	21
Tableau 3 : Activation de la voie de signalisation de Ras dans différents types de tumeurs (D'après Downward, 2003).....	23
Tableau 4 : Représentation de la répartition des résultats de séquençage.....	38
Tableau 5 : Histologie du cancer colorectal selon les mutations N-Ras / K-Ras.....	40
Tableau 6 : Représentation des résultats de l'observation microscopique après traitement par HE.....	45

Introduction

Le cancer colorectal constitue un problème de santé publique majeur dans le monde entier, notamment en Algérie. (C.SEDKAOUI, 2015)

L'identification d'anomalies génétiques au sein des cellules cancéreuses constitue aujourd'hui une information très précieuse permettant d'orienter le diagnostic, la classification, le choix et la surveillance du traitement pour un nombre croissant de cancers. Comme il est le cas au CHU de Blida Frantz Fanon. Les mutations du gène RAS sont retrouvées dans près de la moitié des cancers colorectaux et leur recherche est donc primordiale pour la prise en charge thérapeutique et le choix d'une thérapie ciblée appropriée. Ce souci est partagé par l'équipe d'anatomopathologie dans ce même CHU cité ci-dessus.

Le gène N-Ras muté se trouve impliqué dans peu de cas de cancer colorectal faisant de sa prospection dans le but de choix thérapeutique, une problématique sérieuse. Cette difficulté peut être accentuée par l'utilisation de l'immunohistochimie. De ce fait se pencher sur une méthode moléculaire est de loin d'une forte nécessité. Dans ce travail nous avons cherché à appuyer le diagnostic et le suivi du cancer colorectal par la détection de la mutation du gène N-Ras impliquée en comparant entre une méthode moléculaire, le séquençage d'ADN, et l'immunohistochimie.

Chapitre I : Etude bibliographique

Pour faire une comparaison entre la détection de la mutation du gène N-Ras impliquée dans le cancer colorectal par l'étude moléculaire et l'étude IHC on va commencer d'abord par quelques connaissances sur le côlon et le rectum traitant l'anatomie, l'histologie, la physiologie et physiopathologie. Nous aborderons dans cette partie le cancer de manière générale et le colorectal de manière spécifique et détaillée, et nous présenterons les marqueurs tumoraux exprimés dans ce type de cancer et leurs rôle dans son diagnostic, notamment les protéines oncogènes Ras arrivant au gène N-Ras.

I- Le côlon et le rectum

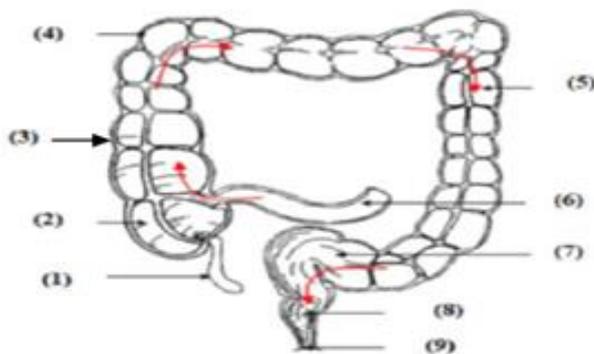
I.1. Définitions :

Le côlon ou le gros intestin c'est la partie de l'intestin entre la valvule du Bauhin (fin de l'intestin grêle) et le rectum, qui élabore et véhicule les matières fécales.

Le rectum est le segment terminal du tube digestif, faisant suite au côlon sigmoïde et s'ouvrant à l'extérieur par l'anus. Long de 15 centimètres, comporte deux segments. Le segment supérieur, dans le pelvis, constitue l'ampoule rectale. Le segment inférieur, au niveau du périnée, est le canal anal. (**Le petit LAROUSSE de la médecine** 2012)

I.2. Anatomie du côlon

La longueur du côlon varie de 1.5m à 1.8m. Son diamètre varie de 3 à 8cm. La totalité du côlon est en situation intra péritonéale, sous-méso colique. Il a la forme d'un «cadre » ou d'un «U inversé ». (**M. SEKAL** 2012).



(1) – Appendice

(2) – Cæcum

(3) - Côlon ascendant

(4) - Côlon transverse

(5) - Côlon descendant

(6) - Fin de l'intestin grêle

(7) - Côlon sigmoïde

(8) – Rectum 9) - Anus et canal anal

Figure 1 : Anatomie du côlon. (**S. NGUYEN, R. BOUROUINA** 2008).

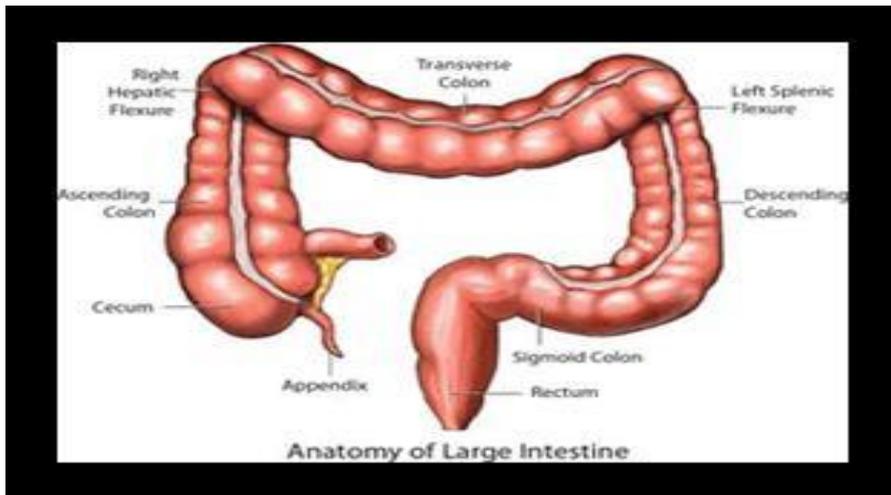
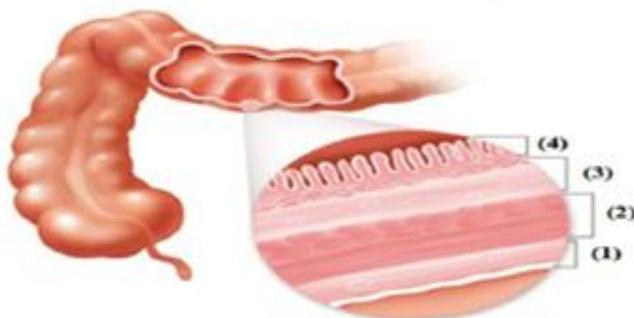


Figure 2 : Anatomie du côlon (C. SEDKAOUI, 2015)

I.3. Histologie du côlon :

La paroi du côlon est constituée de quatre couches différentes qui se superposent ;

- Une couche **séreuse**, il s'agit du péritoine viscéral entourant la quasi-totalité du côlon.
 - Une couche **muscleuse**, subdivisée en deux sous couches : superficielle et profonde.
 - Une couche **sous muqueuse**, assurant la vascularisation de la paroi digestive.
 - Une couche **muqueuse** rose pâle épouse les différentes bosselures et plis.
- (A.STEVENS *et al.* 2002)



- (1) - Couche Séreuse.
- (2) - Couche Muscleuse
- (3) - Couche Sous muqueuse.
- (4) - Couche Muqueuse.

Figure 3 : Les différentes couches de la paroi du côlon. (Institut National du Cancer 2010).

I.4. Physiologie du côlon et du rectum :

A l'état normal, le côlon remplit plusieurs fonctions :

1. **Absorption** ; le côlon absorbe l'eau des résidus alimentaires. Les ions sodium sont aussi absorbés activement avec le chlore, ainsi de petites quantités de vitamines (K et B).
2. **Synthèse** ; le gros intestin est colonisé par de nombreuses bactéries commensales : comme *Escherichia coli*. Elles se nourrissent des résidus alimentaires du rectum et synthétisent de la vitamine K et B. Elles sont aussi responsables de la fermentation des résidus alimentaires non digérés, ce qui produit des gaz ou des flatulences.
3. **Stockage** ; la plupart des résidus alimentaires traversent le gros intestin en 12 à 72 heures. L'intestin est capable de stocker des quantités de déchets qui peuvent parvenir au rectum après une semaine ou plus.
4. **Élimination, défécation** ; le côlon propulse son contenu vers le rectum par des mouvements péristaltiques puissants, appelés mouvements de masse, qui sont liés au réflexe gastro-colique déclenché par la présence de nourritures dans l'estomac. Ces mouvements conduisent à la réplétion du rectum par les matières fécales déclenchant l'envie de déféquer. (**H. GUENARD** 2001).

Concernant la physiologie du rectum c'est un réservoir et grâce à l'appareil sphinctérien de l'anus, assure le contrôle du mécanisme de la défécation et de la continence fécale. (**Le petit LAROUSSE de la médecine** 2012).

II-Pathologie du côlon et du rectum :

II.1. Anatomopathologie

Le côlon est le siège d'affections diverses, inflammatoires (colites), tumorales (polypes, adénocarcinomes) et mécaniques (volvulus, ou torsion d'une anse intestinale).

Le rectum est parfois le siège de tumeur bénigne ou maligne. Il peut également être atteint de rectites d'origine infectieuse, parasitaire ou inflammatoire. (**Le petit LAROUSSE de la médecine** 2012)

La majorité des cancers dérivent d'adénomes. D'une façon générale, les adénocarcinomes du côlon peuvent se présenter sous différentes formes macroscopiques. (**J. LAMRANI** 2008).

Macroscopiquement, l'adénome correspond à un polype (sessile ou pédiculé), faisant saillie dans la lumière colique (**Figure 4**)

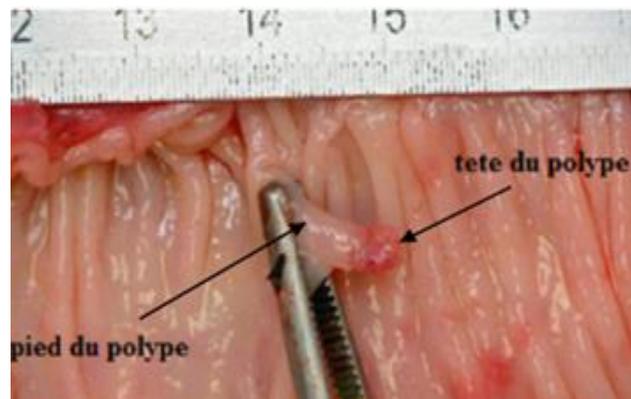


Figure 4 : Polype pédiculé du colon. (S. NGUYEN, R. BOUROUINA 2008).



Figure 5 : Apparence de l'intérieur d'un côlon développant un carcinome colorectal invasif (INC, 2015)

II.2. Histopathologie :

L'adénome, ou polype adénomateux, est une masse anormale fixée au revêtement du côlon ou du rectum. C'est un état précancéreux qui peut évoluer en cancer s'il n'est pas traité.

L'adénome est habituellement polypoïde, ce qui signifie qu'il sort du revêtement et qu'il se développe vers le centre creux du côlon ou du rectum. En général, il est aussi pédiculé, ce qui veut dire qu'il a la forme d'un champignon avec son pied, ou tige. S'il ressemble à un champignon sans son pied, on dit qu'il est sessile. Il arrive parfois que l'adénome s'étende à plat sur le revêtement du côlon ou du rectum. Ses bords peuvent aussi être dentelés, comme les dents d'une scie. (Société canadienne du cancer, 2016)

II.2.1. Les voies de dissémination

Extension locale

L'extension se fait d'abord en profondeur : le cancer est dit in situ tant qu'il n'a pas franchi la musculaires mucorale. L'extension transversale tend à devenir circonférentielle et devient sténosante notamment au niveau du côlon gauche. (J. LAMRANI 2008). (10)

Extension locorégionale

L'extension régionale se fait vers le péritoine. Pour les portions non péritonites l'extension se fait d'abord vers le tissu cellulaire puis vers les organes de voisinage de proche en proche. (J. LAMRANI 2008).

Extension lymphatique et veineuse

Le risque d'envahissement lymphatique apparaît dès l'infiltration tumorale de la sous muqueuse. L'extension ganglionnaire se fait de proche en proche, intéressant d'abord les ganglions épicoliques et paraboliques puis intermédiaires et principaux. L'extension par voie veineuse va réaliser de véritables thromboses intra et extra pariétal. Le risque d'envahissement veineux existe dès le franchissement de la membrane basale, compte tenu de la présence de vaisseaux dans le chorion. (J. LAMRANI 2008).

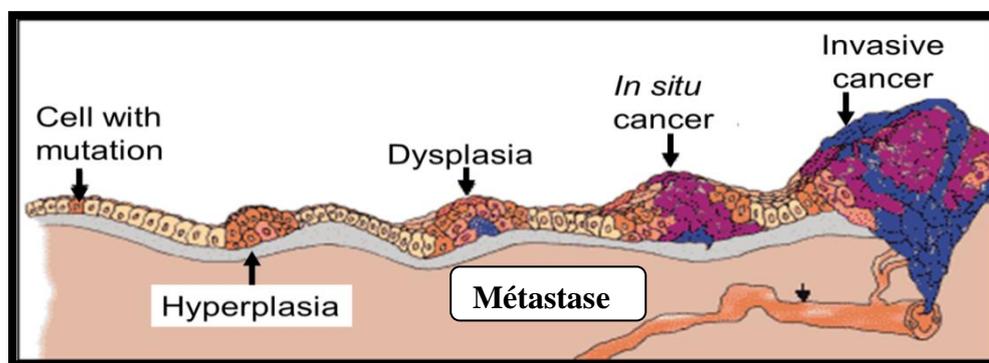


Figure 6 : Evolution du cancer . (Association canadienne du cancer, 2016).

Métastase

Les métastases hépatiques sont les plus fréquentes en cas de tumeur colique, elles représentent 15 à 20% des métastases synchrones ; le foie droit est le plus souvent envahi. Seulement 1% de tumeur pulmonaire synchrone ont été rapportés et le nombre de métastases cérébrales ou osseuses est encore plus exceptionnel. (J. LAMRANI 2008).

Elles sont très fréquentes mais seulement 20 à 30 % sont ré sécables avec, dans ce cas, une survie prolongée et la possibilité d'une guérison. Leur résection chirurgicale doit être systématiquement discutée en RCP et être réévaluée en cas de réponse à une chimiothérapie d'induction pour celles qui n'étaient pas résecables initialement. Les récives, en particulier hépatiques, sont fréquentes. (A. Lièvre et al 2012)

II.3.Maladies du côlon :

Parmi les maladies qui touchent le côlon nous avons choisie de vous parler des plus connues en prenant deux exemples de maladies inflammatoires et deux autres héréditaires.

II.3.1. Maladies héréditaires du côlon :

II.3.1.a. Le syndrome HNPCC :

Le cancer colorectal héréditaire non polyposique encore appelé syndrome de Lynch ou syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), se caractérise par une prédisposition génétique au développement des cancers colorectaux et d'autres tumeurs. Il est lié à une mutation germinale d'un des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN dont les plus fréquemment atteints sont MLH1 et MSH2, et plus rarement MSH6 et PMS2. Les malades atteints de ce syndrome ont un risque élevé de survenue de cancer du côlon et du rectum. (M. SEKAL 2012)

II.3.1.b. Syndrome de Muir-Torre :

C'est une genodermatose rare associant des tumeurs à des cancers viscéraux .En présence de lésions dermatologiques pouvant s'intégrer dans un syndrome de Muir-Torre. (F. Bibeau et al)

II.3 .2 Les maladies inflammatoires chroniques intestinales (MICI) :

II.3 .2.a. La rectocolite ulcéro-hémorragique :

Elle fait référence à une inflammation chronique du tube digestif survenante. Cette pathologie touche toujours le rectum et s'étend en amont en réalisant au maximum une pancolite. (CH. MANUELLE .2008)

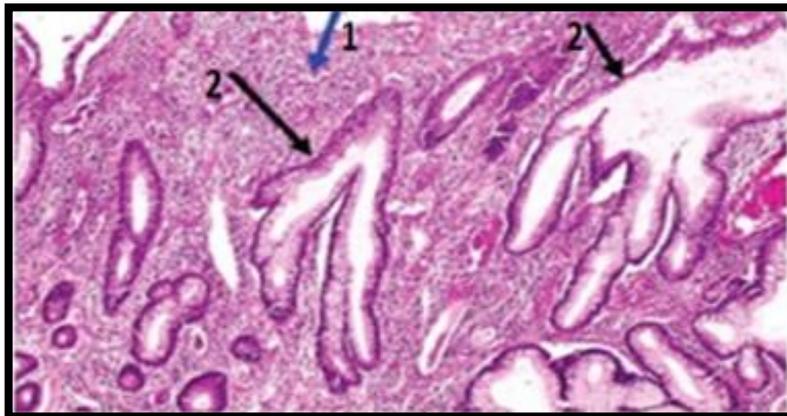


Figure 7 : Rectocolite ulcéro-hémorragique.

1-infiltrat cellulaire du chorion

2-déformations glandulaires (A. STEVENS *et al*, 2002).

II.3 .2.b. La maladie de Crohn :

C'est une maladie inflammatoire chronique du système digestif, qui évolue par poussées (ou crises) et phases de rémission. Elle se caractérise principalement par des crises de

douleurs abdominales et de diarrhée, qui peuvent durer plusieurs semaines ou plusieurs mois. (M. ABID .2012).

III-cancer colorectal

Le cancer :

Les mécanismes chargés de maintenir l'équilibre fonctionnel dans le corps humain, sont complexes et une fois sont touchés on aura de graves conséquences. Un cancer est un dérèglement de certains gènes tels que les proto-oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeurs qui entraînent la multiplication incontrôlée de certaines cellules des organes. (D. Pierre et al 1999)

En 2012 le fardeau mondial du cancer s'est élevé à 14.1 millions de nouveaux cas et à 8.2 millions de décès. Avec 1.4 millions de cas enregistrés, le CCR s'est classé parmi les cancers les plus fréquents (C. SEDKAOUI, 2015)

III.1-Définition du cancer colorectal :

Le cancer colorectal c'est le cancer qui atteint le côlon et le rectum, sous forme d'adénocarcinome développé à partir des glandes du côlon. (Le petit LAROUSSE de la médecine 2012)



Figure 8 : Tumeur d'aspect blanchâtre et consistance dur dans le côlon droit. (CHU Blida, 2016)

III.2-Epidémiologie du cancer colorectal :

Le cancer colorectal est une cause importante de décès par cancer dans le monde. Il est la cause de 10% des décès par cancer chez l'homme. Il est plus fréquent chez le sexe masculin, le sex-ratio est de 1.5 et il est également plus létal avec une surmortalité masculine estimée à 1.7. (GUERIN, 2010)

Les premiers cas apparaissent à partir de 25 ans et l'incidence augmente jusqu'à l'âge de 75 à 80 ans puis se stabilise .Ils surviennent de manière sporadique à 80 %, 15 % dans un contexte familiale et sont liés à une prédisposition génétique à 5 %. (C. SEDKAOUI, 2015)

Les CCR sont dans 70 % des cas des adénocarcinomes dérivants d'adénomes. Sa prévalence en Algérie est de 25 à 30 pour 100000 habitants. 8% pour les femmes, il est classé après celui du cancer du sein, du col utérin, et des ovaires, et pour les hommes, il est de 11% après le cancer des poumons et de la prostate. Elle augmente de 1 à 2% par an dans le monde. Ce type de cancer constitue de plus en plus un problème majeur de santé publique en Algérie. (**Registre du cancer d'Oran**, 2014)

III.3.Carcinogénèse colorectale :

La carcinogénèse est définie par une accumulation multi-étapes d'anomalies génétiques chronologiquement déterminées ; une autonomie de croissance, un échappement à l'apoptose, une insensibilité aux signaux antiprolifératifs, une angiogénèse accrue, un potentiel de réplication illimité, une invasion métastatique, et un échappement à l'immunosurveillance. (**C. SEDKAOUI**, 2015)

III-3-1-Les principaux mécanismes de carcinogénèse colorectale:

D'abord l'instabilité chromosomique ou perte d'hétérozygotie impliquée dans environ 80 % des CCR, puis l'instabilité des microsatellites impliquée dans 12 à 15 % des CCR et enfin l'instabilité épigénétique ou phénotype avec hyperméthylation de certaines régions promotrices de gènes, observée dans 20 à 40 % des CCR. (**R. GUIMBAUD** 2015)

III-3-1-a-L'instabilité des microsatellites :

La genèse de certains cancers colorectaux est liée à une instabilité génétique induite par la défaillance du système de réparation des mésappariements de l'ADN appelé système MMR (MisMatch Repair). Cela va induire son inactivation, d'une perte de la fidélité de la réplication et d'une accumulation de mutations.

III-3-1-b-L'instabilité chromosomique:

L'instabilité chromosomique est présente dans environ 85 % des cas de CCR. Elle est caractérisée notamment par la perte de matériel chromosomique, entraînant l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur, identifiés, tels APC (*Adenomatous Polyposis Coli*) sur le bras chromosomique 5q, ou TP53 sur le bras 17p, ou encore inconnus.

III-3-1-c-L'instabilité épigénétique :

Les modifications épigénétique sont transmissibles lors de la mitose. Il n'y a pas actuellement de consensus quant aux marqueurs à utiliser pour déterminer le phénotype méthylateur ou CIMP (*CpG Island methylator phenotype*). (**C. SEDKAOUI**, 2015)

III-3-2-Principales voies de signalisation impliquées dans la carcinogénèse colorectale:

Les altérations de la signalisation cellulaire sont au cœur des mécanismes de l'oncogénèse.

Toutes les voies de signalisation impliquées dans la prolifération et dans la différenciation, dans l'adhésion et dans la migration, dans la survie et dans la mort, pourront servir de support à des altérations oncogéniques. On a pu dire ainsi que le cancer était une maladie de la signalisation cellulaire.

Les principales voies de signalisation sont :

- Voie Wnt/APC/β-caténine.
- Voie du TGF-β.
- Voie RAS/RAF/MAPK.

Le récepteur de l'EGF ou EGFR (epidermal growth factor receptor) appartient à la famille des récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase. Il existe de nombreux ligands de l'EGFR qui induisent l'activation de protéines. Parmi ces protéines, grb2 active les voies RAS et PI3K. Ces voies ont de multiples fonctions cellulaires, notamment dans la prolifération, la migration et l'apoptose. L'EGFR est surexprimé dans la plupart des CCR (Akao, Y *et al* , 2005)

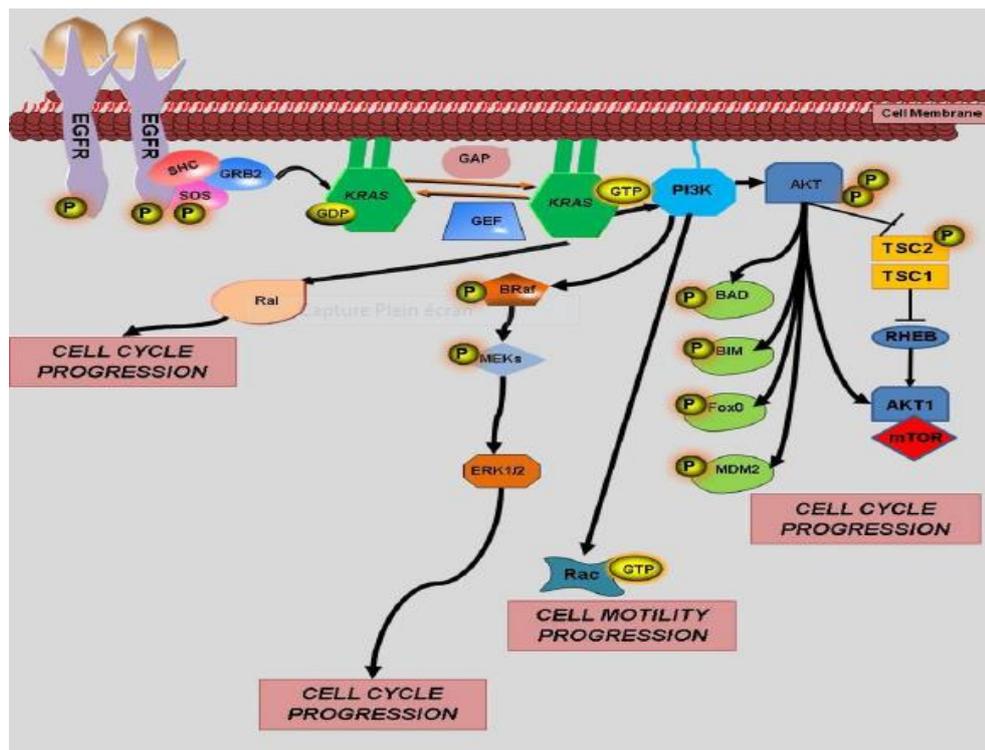


Figure 9 : Voies RAS/RAF/MAK/MAPK et PI3K/AKT. (Johnson, S.M. *et al*, 2005)

Les protéines RAS jouent un rôle majeur dans la transmission des signaux extracellulaires vers le milieu intracellulaire, la famille RAS comprend trois principaux membres : K-Ras, N-Ras et H-Ras. BRAF est une sérine thréonine kinase en aval de K-RAS.

- Voie PI3K/AKT/mTOR

-. Voie p53. (C. SEDKAOUI, 2015)

III.4. Les stades du cancer colorectal selon la classification TNM

La classification TNM « Tumor, Nodes, Metastasis » soit « tumeur, ganglions lymphatiques, métastases » définit les stades du cancer selon trois critères essentiels :
 - Taille et profondeur de la tumeur, atteinte ou non et le nombre des ganglions lymphatiques, présence ou non de métastase.

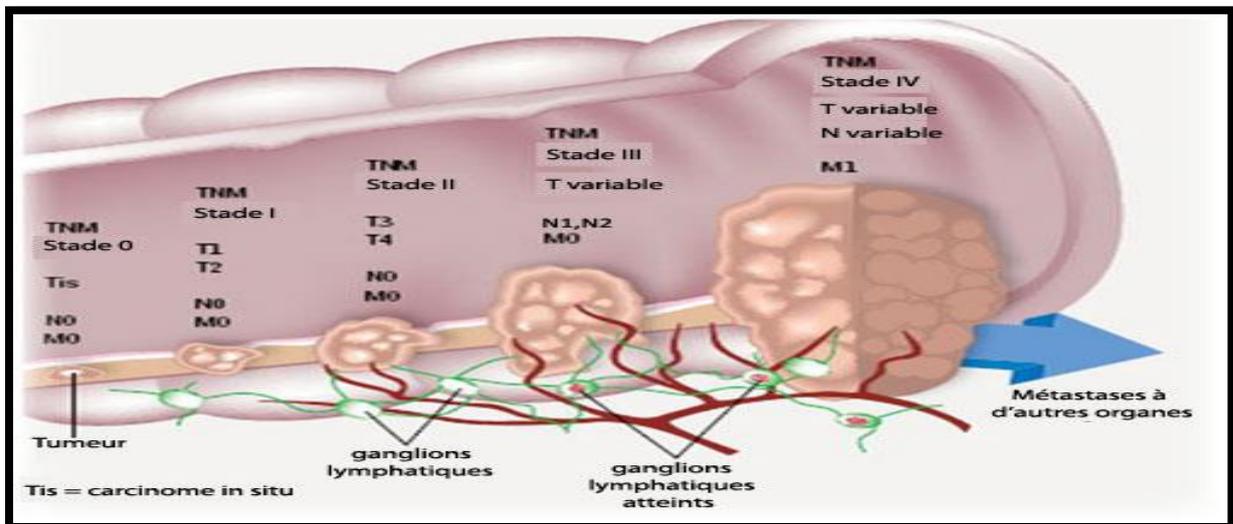


Figure 10 : la classification TNM du cancer colorectal (Association canadienne du cancer, 2016)

Tableau 1 : La classification TNM du cancer colorectal. (J. LAMRANI 2008).

Stade	T	N	M
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
IIA	T3	N0	M0
IIB	T4	N0	M0
IIIA	T1-T2	N1	M0
IIIB	T3-T4	N1	M0
IIIC	T	N2	M0
IV	T	N	M1

Le stade des cancers colorectaux au moment du diagnostic est généralement exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV.

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

-**Stade I**, la tumeur envahit la deuxième couche (sous-muqueuse) ou la couche musculaire (muscleuse) de la paroi du côlon ou du rectum, les ganglions lymphatiques ne sont pas atteints et il n'y a pas de métastase à distance.

-**Stade II**, les cellules cancéreuses ont traversé plusieurs couches de la paroi du côlon ou du rectum, mais aucun ganglion n'est atteint et il n'y a pas de métastase.

-**Stade III**, les cellules cancéreuses ont envahi les ganglions lymphatiques proches de la tumeur.

-**Stade IV**, le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum, vers des emplacements ou des organes éloignés, généralement le foie ou les poumons. (**Institut National Du Cancer**, 2010).

III.5 cancer colorectal métastatique

III-5-1 : Les métastases colorectales :

Les métastases sont des tumeurs cancéreuses qui proviennent d'un cancer situé dans un autre organe du corps. On parle aussi de tumeur secondaire. Le côlon et le rectum sont parfois envahis par des métastases issues de cancers situés dans l'ovaire, la prostate, l'estomac ou le sein. (**Institut National Du Cancer**)

On observe des métastases dans 40 à 60% des cas de cancer colorectal. Dans certains cas, ce sont les métastases précessives dont le foyer n'est pas connu et doit être identifié.

(**L'Agence Comsource**, 2013)

Environ 30 à 50% des patients atteints de cancer colorectal développent des métastases hépatiques, responsables à elles seules de deux tiers des décès par cancer colorectal (**E. Abdalla et al** 2006)

Le risque de transformation maligne dépend de plusieurs paramètres tels que la taille, l'importance de la composante villositaire ou encore le degré de dysplasie (**V. Boige et al** 2004)

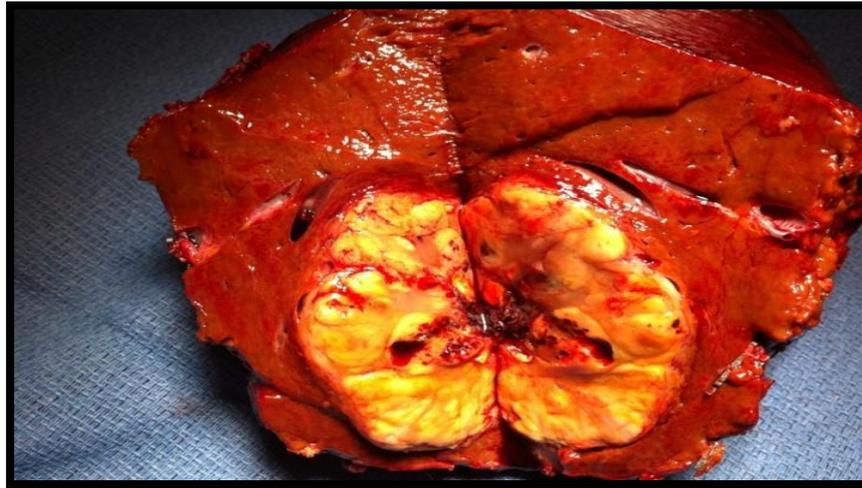


Figure 11:Métastases hépatiques (L'Agence Comsource, 2013).

III.5.2. Facteurs de risques :

III.5.2.a. Les principaux facteurs de risque de cancer colorectal :

❖ Habitudes alimentaires

L'absorption accrue de graisses et de viande rouge, les boissons alcoolisées, le tabac, charcuterie, amiante, surpoids et l'obésité augmentent le risque de cancer colorectal. (**Bueno de Mesquita HB**, 1993)

❖ Facteur génétique :

Jusqu'à 25 % des patients atteints de cancer colorectal présentent une histoire familiale de la maladie, suggérant une prédisposition héréditaire. Quelques affections héréditaires bien définies, à caractère autosome dominant, entraînent un risque plus élevé de développer un néoplasme au niveau intestinal:

- La Polypose Adénomateuse Familiale
- Plusieurs syndromes de cancer colorectal héréditaire non-polypeux. (**Ransohoff DF** et *al* 1991)

III.5.2.b .Les Facteurs Environnementaux :

Le risque de cancer colorectal est moindre en Asie, en Afrique et en Amérique du sud. Lorsqu'un individu de ces pays à faible risque émigre vers un pays à plus fort risque, il tend à avoir le même risque de cancer colorectal que les sujets du nouveau pays d'adoption. Cette observation suggère que certains facteurs environnementaux jouent un rôle dans le risque de cancer colorectal. (**M. ABID** 2012)

III.5.3 .Facteurs protecteurs :

Le calcium et la vitamine D, les vitamines A, C, E et le bêta carotène ont un rôle antioxydant, d'autres substances telles que les folates, le café, l'aspirine et les anti-

inflammatoires non stéroïdiens ont été rapportées comme produits diminuant le risque de cancer colorectal. (M. ABID 2012)

III.6. Symptômes d'un cancer colorectal :

Les cancers colorectaux se développent souvent en silence, sans provoquer de symptômes particuliers. Ils peuvent rester longtemps imperceptibles. Néanmoins, certains signes peuvent être révélateurs d'un cancer et doivent conduire à consulter son médecin traitant. (Institut National du Cancer)

III.6.1 Signes et symptômes primaires du cancer colorectal :

Changement du transit intestinal, selles rouges, noires, sanguinolentes, poisseuses, présence de mucus dans les selles, diarrhée, constipation persistantes, saignement du rectum entre les défécations, sensation d'évacuation incomplète de l'intestin, besoin pressant d'aller à la selle, malaise abdominal, douleur, crampes, gaz, ballonnement, sensation de plénitude, masse parfois sentie dans l'abdomen, changements digestifs, nausées, douleur, crampes, perte d'appétit, perte de poids, anémie, fatigue, essoufflement et faiblesse engendrées, occlusion intestinale (blocage), perforation du gros intestin accompagnée de fièvre et de douleur, faiblesse, infections urinaires fréquentes (causées par la formation d'une fistule ou une perforation dans la vessie). (D. MALLEM, 2010).

III.6.2. Signes et symptômes tardifs

Les signes et symptômes tardifs se manifestent quand la masse cancéreuse grossit ou se propage vers d'autres parties du corps, dont d'autres organes. Ce ne sont pas toutes les personnes atteintes d'un cancer colorectal avancé qui éprouveront les signes et symptômes tardifs qui suivent :

Douleur intense au niveau de l'abdomen, à la hanche ou à la fesse, accumulation de liquide dans l'abdomen (ascite), enflure du foie (hépatomégalie), des ganglions lymphatiques, perte d'appétit, jaunisse, difficulté à respirer. (D. MALLEM, 2010).

III-7-Diagnostic :

On détermine le stade du cancer après le diagnostic, les critères pour mesurer l'étendue d'un cancer colorectal sont :

1-la taille et la profondeur de la tumeur : lorsque des cellules cancéreuses apparaissent, elles sont d'abord localisées sur la surface interne de la paroi du côlon ou du rectum (la muqueuse). Puis, petit à petit, elles atteignent les couches plus profondes ; plus la tumeur est localisée et superficielle, plus elle sera facile à traiter.

2-l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques et le nombre de ganglions atteints : Les cellules cancéreuses peuvent s'échapper du côlon ou du rectum et se disséminer ailleurs. Les

ganglions lymphatiques, situés dans la graisse qui entoure le côlon ou le rectum, peuvent alors être touchés.

Pour déterminer si des ganglions contiennent des cellules cancéreuses, il faut les analyser au microscope, après les avoir prélevés. Si aucun ganglion n'est atteint, cela signifie que le cancer est à un stade précoce et qu'il est resté localisé. Le nombre de ganglions envahis permet d'en savoir plus sur le degré de propagation du cancer ; moins il y en a, meilleures sont les chances de guérison.

3-la présence ou non de métastases :

Les cellules cancéreuses peuvent envahir d'autres organes que les ganglions lymphatiques et y développer des métastases.

Les organes les plus souvent touchés par des métastases lors d'un cancer colorectal sont le foie, les poumons et le péritoine. Les cancers colorectaux qui présentent des métastases (on parle de cancer métastatique) sont plus difficiles à soigner. (**Institut National de Cancer**)

III-8-Traitement :

Le traitement adjuvant du cancer colorectal a connu de nombreuses avancées importantes au cours des dernières années. La chimiothérapie améliore le taux de survie sans récurrence à long terme chez les patients à haut risque de cancer du côlon résectionné. Les traitements combinés, en utilisant la chirurgie, la radiothérapie et la chimiothérapie, améliorent à la fois le contrôle local et la survie chez les patients avec un cancer du rectum de stade II et III.

(**K. Ciombor** et al 2015)

Le 5-fluorouracile (5-FU) est la molécule la plus anciennement utilisée dans le traitement du CCR. Son administration en perfusion prolongée nécessite le recours à une chambre implantable, exposant le patient à des complications infectieuses ou thrombotiques, en plus des coûts en matériel et en personnel et des contraintes pouvant altérer la qualité de vie des patients. Les résultats positifs des essais cliniques et la tolérance des patients à la Capécitabine ont permis cette dernière d'être une alternative valide au 5-FU intraveineux. (**C. SEDKAOUI**, 2015)

Chirurgie

La chirurgie a pour objectif d'enlever la tumeur primaire. Les patients atteints d'une maladie au stade avancé peuvent aussi subir une intervention visant à retirer les lésions métastatiques.

Lorsque le cancer se développe à partir d'un polype, tout le polype est enlevé, une procédure appelée polypectomie. Dans une résection segmentaire, le segment de l'intestin où se trouve la tumeur est enlevé chirurgicalement et les extrémités de l'intestin sont reliées

Il est nécessaire de retirer au moins 12 ganglions lymphatiques régionaux pour effectuer une détermination du stade précise. Si dans le cas du cancer rectal, l'ensemble du

rectum et du mésorectum comprenant les ganglions lymphatiques régionaux est retiré, la procédure est appelée excision totale du mésorectum (TME). Généralement, les extrémités saines de l'intestin sont reliées chirurgicalement au cours de l'opération initiale. Quand une excision totale du mésorectum est effectuée pour le cancer du rectum, une anastomose colo-anale est effectuée. Cependant, chez certains patients, le chirurgien doit créer une jonction temporaire entre le petit ou le gros intestin et la paroi de l'abdomen (respectivement, une iléostomie et colostomie. Si le cancer a provoqué une obstruction de l'intestin, il peut être nécessaire au chirurgien de libérer l'intestin et de le laisser guérir en insérant un stent ou en pratiquant une colostomie. Les stomies sont généralement temporaires, ce qui signifie que lorsque la tumeur est réséquée et que l'intestin a eu le temps de guérir, on pratique une seconde opération pour relier les deux extrémités de l'intestin (anastomose) et fermer la stomie. Néanmoins, les stomies peuvent être permanentes chez certains patients. (**Clinique de la société européenne d'oncologie médicale (ESMO)**)

Chimiothérapie

La chimiothérapie a pour but de tuer ou de léser les cellules tumorales. La chimiothérapie est administrée par voie orale ou dans une veine, et elle agit donc de manière systématique. La chimiothérapie de base pour le cancer colorectal utilise des médicaments appelés fluoropyrimidines, administrés comme traitement unique (monothérapie) ou en association avec d'autres médicaments (thérapie associée). (**Clinique de la société européenne d'oncologie médicale (ESMO)**)

IV- Les marqueurs tumoraux et dépistage du cancer colorectal :

IV-1- Définition des marqueurs tumoraux :

Les marqueurs tumoraux sont des substances de nature diverse (glycoprotéines, peptides, protéines) qui sont synthétisées par les cellules tumorales. Ces substances peuvent être libérés dans le sang et être dosés, mais elles peuvent être aussi uniquement présentes au niveau de la cellule tumorale et non reléguées dans le sang périphérique, dans ce cas elles seront détectées par des techniques immunohistochimique. Certains marqueurs tumoraux sont spécifiques à un seul type de cancer, alors que d'autres sont associés à plusieurs types différents de cancer. La qualité et l'intérêt des marqueurs sont définis par sensibilité et sa spécificité (**M. MONGE et al 2006**).

Leurs rôle est de confirmer un diagnostic clinique et de réaliser le suivi thérapeutique. Ils constituent une première manifestation d'une récurrence. (**L. Roger et al 2005**)

IV-2-Classification des marqueurs tumoraux :

- Antigènes Oncofœtaux, les Hormones et leurs métabolites, les immunoglobulines, les enzymes, les antigènes de différenciation et les antigènes spécifiques d'organe. (**M. MONGE et al, 2006**).

IV-3-Les marqueurs tumoraux spécifiques du cancer colorectal :

IV-3-1 - Antigène carcinoembryonnaire (ACE)

C'est une glycoprotéine monocaténaire (antigène de différenciation) de la surface cellulaire exprimée normalement uniquement au pôle apical de la cellule différenciée.

L'ACE joue un rôle dans les interactions intercellulaires, l'adhésion à la matrice extracellulaire, la régulation de la croissance cellulaire et l'acquisition du phénotype métastatique.

IV-3-2- Antigène carbohydrate 19.9 (CA 19.9)

Le CA 19-9 est un ligand pour la molécule endothéliale d'adhésion leucocytaire (ELAM-1, E-sélectine), molécule présente sur les cellules endothéliales activées par les cytokines. Le CA 19-9 est un marqueur tumoral exprimé par les cancers colorectaux, en particulier dans les cas avancés et qui permet l'adhésion des cellules malignes à l'endothélium vasculaire et la dissémination hématogène des cancers exprimant cet antigène. Il a été montré une corrélation entre l'intensité de son expression et la gravité du pronostic des cancers colorectaux. (**Pubmed**)

IV-3-3-CDX2

CDX-2 est un facteur de transcription. L'anticorps CDX-2 est utile pour distinguer l'origine gastro-intestinale des adénocarcinomes métastatiques et carcinoïdes. (**LEVINE PH. et al 2006**).

IV-4-4-Les autres marqueurs

Antigène carbohydrate CA 50, antigène Carbohydrate CA 72-4 ou TAG 72 (tumor associated glycoprotein 72), l'antigène polypeptidique de tissu (TPA) et son analogue l'antigène polypeptidique spécifique (TPS), métalloprotéases de la matrice (MMP) et inhibiteurs tissulaires des métalloprotéases (TIMP1 et TIMP2), cerb-B2 / Her2-neu et la clusterine (**X.CHEN, et al 2003**)

IV-5- Dépistage du cancer colorectal :

L'augmentation de l'accès aux traitements de dépistage a contribué à une réduction de l'incidence du cancer colorectal et de la mortalité de la population générale, bien que d'importantes disparités persistent. Dans le monde, les disparités sont encore plus marquées, avec très différents taux et les tendances entre les nations mortalité par cancer colorectal. Nouveaux programmes organisés de dépistage du cancer colorectal dans les pays économiquement développés avec une forte charge de cancer colorectal peut fournir des voies pour réduire ces disparités dans le temps. (**MB. Potter 2013**).

Le dépistage organisé du cancer colorectal consiste en la réalisation d'un test immunologique simple et indolore, à faire chez soi. Si le résultat de ce test est positif (4,6 % des cas), une coloscopie vous sera alors prescrite.

Ces informations destinées à vous aider ne remplacent pas la consultation médicale. En effet, chaque situation est unique et seul votre médecin peut déterminer précisément les modalités de dépistage ou de suivi adaptées à votre cas.

Le test immunologique, désormais disponible, est un test simple, pratique et efficace qui vise à déceler la présence de sang humain dans les selles. En effet, certains polypes ou cancers provoquent des saignements souvent minimes et donc, difficiles voire impossibles à détecter à l'œil nu (**Institut National de Cancer**)

V- Les gènes Ras :

V.1-Gène Ras :

Les mutations du gène ras apparaissent dans plus d'un tiers des cancers colorectaux humains, et la plupart des mutations sont au niveau du codon 12 du gène K-Ras et que les mutations précèdent habituellement le développement d'une tumeur maligne. (**L. JOHANNES BOS et al 1987**)

Le gène RAS comprend également deux autres gènes : H-Ras et N-Ras. Les protéines produites à partir de ces trois gènes sont GTP ase. Ces protéines jouent un rôle important dans la cellule ; la division, la différenciation cellulaire, et l'apoptose.

La famille ras de mammifère consiste les Ras des gènes harvey et kirsten (ras H-Ras et K-Ras), un pseudogène inactif de chaque (c-H-ras2 et c-K-ras1) et le gène N-Ras. Ils diffèrent sensiblement uniquement dans les 40 acides aminés C-terminale. Ces gènes ont une liaison ras-GTP / PIB et l'activité GTP ase, et leurs fonctions normale peuvent être aussi des protéines régulatrices G comme impliqués dans le contrôle normal de la croissance cellulaire.

V-1-1. Fonctionnement et activation de la protéine Ras

La protéine Ras est une protéine G de 21 kDa associée à la face interne de la membrane plasmique et capable d'échange entre le GTP et le GDP. Son activité est régulée par la liaison, tantôt activatrice de GTP, tantôt inhibitrice de GDP. Les GEF (Guanine Nucléotide Exchange Factors), comme SOS, catalysent le relargage de GDP alors que les GAP (GTPase Activating Proteins) catalysent l'hydrolyse du GTP.

Ras est activée en réponse à des signaux environnementaux via des récepteurs de facteurs de croissance comme l'EGFR. A la suite de la fixation de l'EGF, le récepteur à tyrosines kinases s'autophosphoryle et recrute les protéines GEF. Ras est alors activée grâce au chargement du GTP par Grb2/SOS, et active, à son tour, différents effecteurs pour réguler la prolifération cellulaire et la survie. Parmi ces effecteurs, la protéine Raf va activer la voie des MAP Kinases Mek/Erk. Ras active Raf en induisant un changement conformationnel de la

protéine. La cascade d'activation de kinases qui en découle permet l'activation de la transcription des gènes du cycle cellulaire. Ras est également capable d'activer la voie de la PI3K (PhosphoInositol-3-Kinase) qui recrute PDK1 via son domaine d'homologie pleckstrin et phosphoryle et active la kinase AKT. Cette voie sous-jacente conduit à une augmentation de la survie cellulaire et active mTOR (Mammalian Target Of Rapamycin) augmentant la biosynthèse des ribosomes et la traduction des ARNm. (J.Colicelli , 2004).

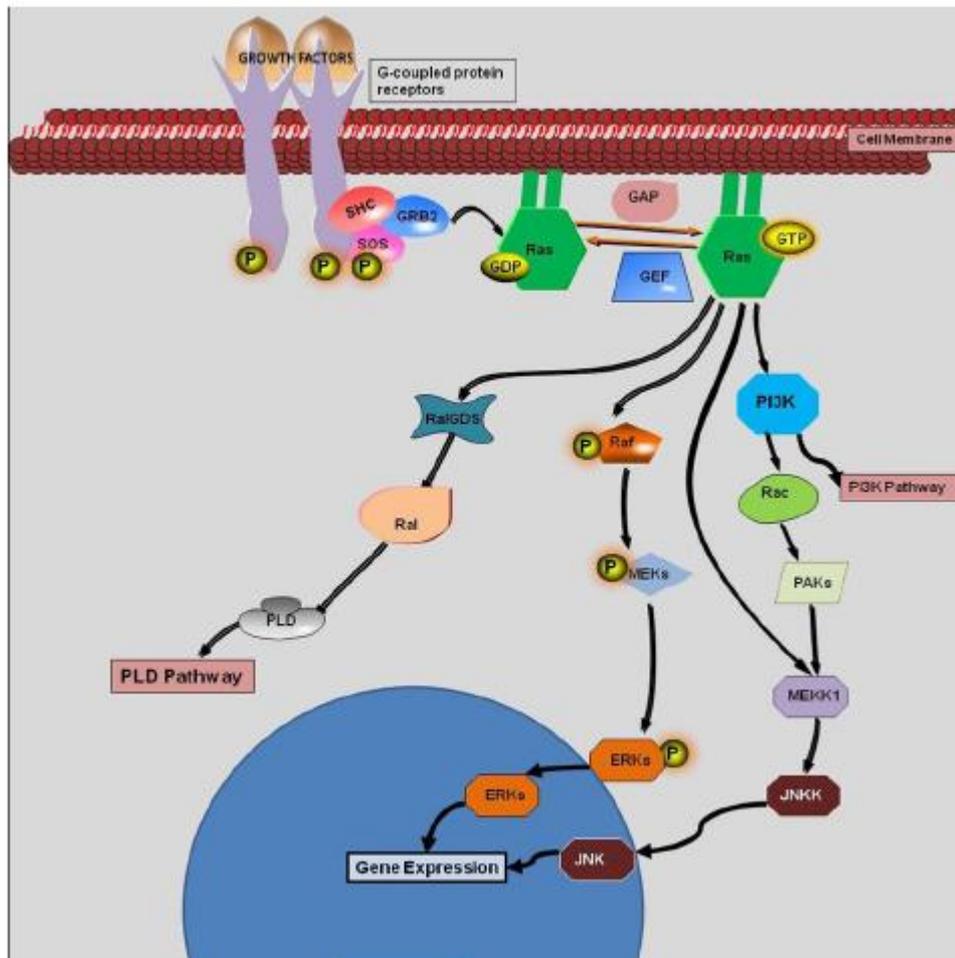


Figure 12 : Voie d'activation de Ras. (Vogelstein, B et al, 1988)

À la suite d'un signal mitogénique reçu par un récepteur (comme, par exemple, l'EGFR), Ras lie un GTP permettant son activation. Ras interagit alors avec plusieurs effecteurs conduisant à la survie cellulaire, la différenciation, le trafic vésiculaire, la prolifération, l'organisation du cytosquelette ou la signalisation du calcium (D'après Downward, 2003).

V-1-2. Les différentes isoformes de Ras :

Les séquences de ces trois isoformes sont très similaires, 85 % de leurs séquences d'acides aminés sont identiques, et aucune variabilité fonctionnelle n'a été clairement définie. Il existe, toutefois, quelques différences entre ces protéines au niveau de leur expression. Toutes trois sont largement exprimées mais K-Ras l'est dans pratiquement tous les types cellulaires. Nous pouvons aussi noter qu'à la différence de K-Ras, H-Ras et Nras possèdent un groupement palmitoyle permettant leur localisation dans l'appareil de Golgi. Les modifications post

traductionnelles de Ras sont indispensables à sa localisation sous la face interne de la membrane plasmique. Les protéines Ras qui ne se trouvent pas localisées sous la membrane sont inactives, probablement parce qu'elles sont incapables de recruter leurs protéines cibles. Le fait que la protéine Ras nécessite d'être correctement localisée pour être active conduit de nombreuses études à viser les enzymes responsables des modifications post-traductionnelles de Ras comme cibles thérapeutiques (**Ali et al**, 2010).

Dans les CCR, le gène K-Ras est fréquemment muté (40 à 50 % des cas) ; la plupart des mutations (40 %) se trouvent dans l'exon 2 du gène K-Ras, le plus souvent au niveau des codons 12 et 13. Dans moins de 10 % des cas, elles concernent l'exon 3 (codons 61 et 59) et l'exon 4 (codons 117 et 146). Le gène N-Ras est beaucoup plus rarement porteur de mutations (codons 12, 13, 61, 117 et 146) (environ 3 à 5 % des cas). Enfin, il n'est pas décrit de mutation du gène H-Ras au cours des CCR. Au total environ 50 à 60 % des CCR présentent une mutation RAS. (**Association française de formation médicale continue en hépatogastroentérologie**)

V-1-3-a- Les mutations somatiques de l'oncogène K-Ras :

Les mutations ponctuelles de K-Ras touchent dans plus de 90 %, et elles surviennent très précocement au cours de la carcinogenèse colorectale, dès le stade d'adénome. Les protéines RAS qui résultent de ces mutations du gène K-Ras sont donc constitutionnellement actives, ce qui leur confère un pouvoir oncogénique par l'intermédiaire d'une activation acquise des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans les processus de prolifération cellulaire et d'apoptose. (**JL. Bos**, 1989).

Les tumeurs K-Ras mutés ont été associée à des caractéristiques cliniques spécifiques, tels que l'apparition du métastases du poumon et de métastases cérébrales ou primaire du côté droit, elles sont maintenant reconnu comme déterminants de la résistance aux antiépidermal le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) des anticorps monoclonaux

Les mutations K-Ras semblent produire dans les stades précoces de la carcinogenèse et pour être directement impliquée dans la transition de l'adénome à adénocarcinomes (**M. Schirripa et al**, 2014)

Tableau 2 : Mutation du gène K-Ras les plus fréquentes sur les codons 12 et 13 (Lièvre A, *et al*, 2008)

Codon	Base	Mutation	Substitution d'acide aminé
12	1	GGT → CGT	G12R
12	1	GGT → IGT	G12C
12	1	GGT → AGT	G12S
12	2	GGT → GCT	G12A
12	2	GGT → GTT	G12V
12	2	GGT → GAT	G12D
13	2	GGC → GAC	G13D

A : alanine, C : cystéine, D : aspartate, G : glycine, R : arginine, S : sérine, V : valine

V-1-4-Les voies de signalisation EGFR, RAS/MAPK et PI3K/AKT, et carcinogénèse colorectale :

L'EGFR est un membre de la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase HER. L'activation de la voie de l'EGFR au cours de la carcinogénèse colorectale se fait par l'intermédiaire de la fixation de l'EGF ou d'un autre de ses ligands (TGF α , β -celluline...) à la partie extra membranaire du récepteur. Cette fixation entraîne une dimérisation de l'EGFR et ainsi son activation par phosphorylation au niveau de résidus tyrosine spécifiques situés sur son domaine intracellulaire "domaine tyrosine kinase" (**figure 12**).

Cette activation du domaine tyrosine kinase va permettre, à son tour, l'activation de voies de signalisation intracellulaire situées en aval, essentiellement la voie RAS/MAPK et la voie PI3K/AKT, toutes deux impliquées dans la prolifération, la migration, l'adhésion et la différenciation cellulaire et dans la résistance à l'apoptose et l'angiogénèse (**figure 12**).

L'activation de la voie RAS/MAPK débute par l'activation de la protéine RAS (liée au GTP en remplacement du GDP), qui, elle-même, par l'intermédiaire de phosphorylations successives, va permettre l'activation de plusieurs protéines intracellulaires : RAF, MEK, puis ERK, qui, transloque au niveau du noyau, va stimuler la transcription de gènes, et notamment des gènes impliqués dans l'initiation du cycle cellulaire (**figure 13**). L'autre grande voie de signalisation intracellulaire PI3K/AKT, qui peut être activée soit directement par l'EGFR active soit par l'intermédiaire de la protéine RAS activée. (Shaw RJ, Cantley LC *et al*, 2006)

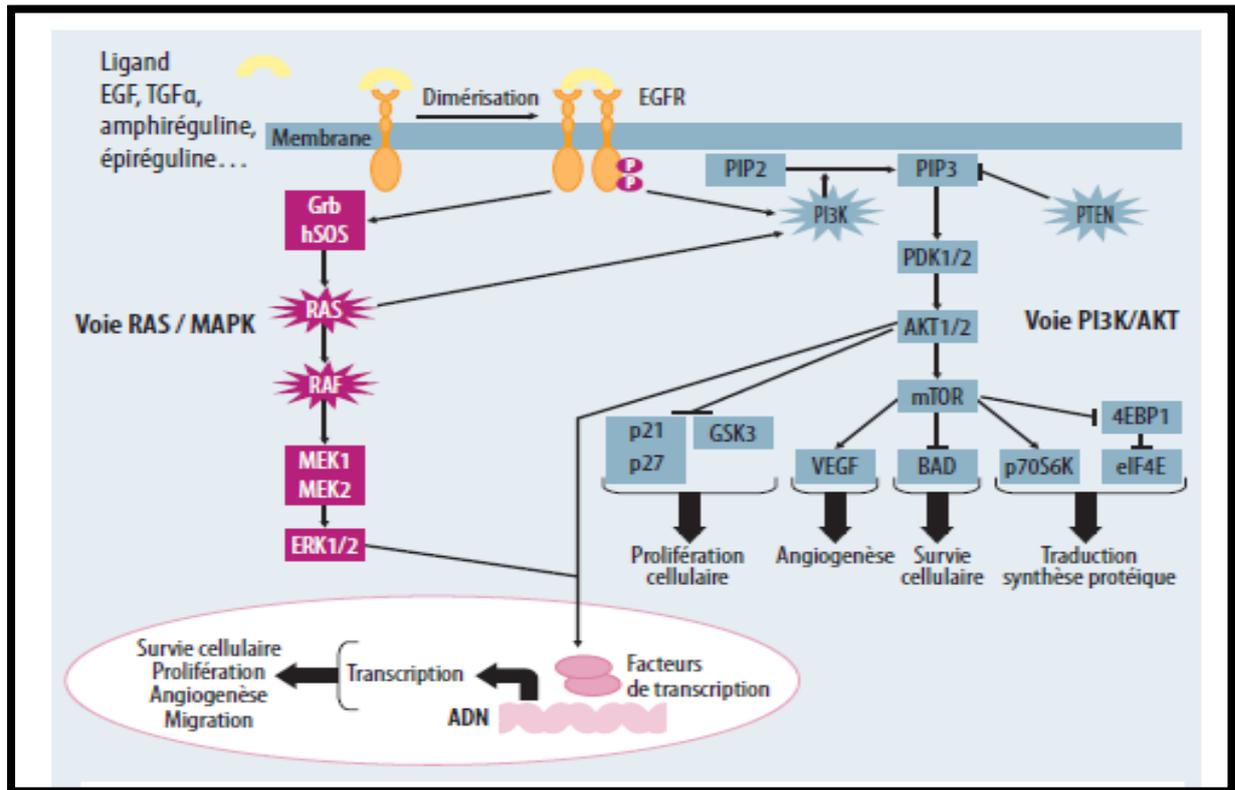


Figure 13 : Activation de l'EGFR et des voies de signalisation intracellulaire en aval. (Shaw RJ, Cantley LC *et al*, 2006).

V-2-Protéine oncogène RAS

V-2-1- Rôle de Ras dans la tumorigenèse :

Les mécanismes indirects d'activation de Ras permettent son activation chronique malgré l'absence de mutation. La protéine Nf1 par exemple est une protéine GAP responsable de l'hydrolyse du GTP en GDP. Elle est impliquée dans la régulation de l'expression de Ras et conduit donc à son inhibition. Les mutations de Nf1 empêchent la régulation négative de Ras. D'une autre manière, à un stade avancé de la maladie, l'EGFR est surexprimé dans 65 à 70 % des cancers colorectaux conduisant à l'activation constitutive de Ras. (Lockhart & Berlin, 2005)

Le fait que Ras soit fréquemment muté dans différents types de tumeurs, ou qu'elle soit activée par des mécanismes situés en amont suggère que le signal prolifératif induit par Ras joue un rôle important dans la tumorigenèse. La capacité de Ras à transformer des cellules dépend de son interaction avec ses effecteurs sous-jacents et notamment la protéine Raf et la voie des MAP Kinases (Luo *et al*, 2009).

Selon les types de cancers, différentes protéines sont touchées (tableau 3).

Tableau 3 : Activation de la voie de signalisation de Ras dans différents types de tumeurs (D'après Downward, 2003).

Défaut/Mutation	Type de tumeur	Fréquence (%)
Mutation de <i>RAS</i>	Pancréas	90 (<i>KRAS</i>)
	Adénocarcinome du poumon (non à petites cellules)	35 (<i>KRAS</i>)
	Colorectal	45 (<i>KRAS</i>)
	Thyroïde (folliculaire)	55 (<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>)
	Thyroïde (papillaires non différenciés)	60 (<i>HRAS, KRAS, NRAS</i>)
	Séminome	45 (<i>KRAS, NRAS</i>)
	Mélanome	15 (<i>NRAS</i>)
	Vessie	10 (<i>HRAS</i>)
	Foie	30 (<i>NRAS</i>)
	Rein	10 (<i>HRAS</i>)
	Syndrome myéloдисplasique	40 (<i>KRAS, NRAS</i>)
	Leucémie myéloïde aiguë	30 (<i>NRAS</i>)
	Mutation de <i>BRAF</i>	Mélanome
Colorectal		12
Surexpression de l' <i>EGFR</i>	Carcinomes	> 50
Amplification de <i>ERBB2</i>	Sein	30
Perte de <i>PTEN</i>	Glioblastome multiforme	20 - 30
	Prostate	20
	Pancréas	40
Amplification de <i>AKT2</i>	Ovaires	12
	Pancréas	10
Amplification de <i>PI3K</i>	Ovaires	40

V.3- Le gène N-Ras :

V-3-1-définition :

Le gène N-Ras est situé sur le chromosome 1. (L. Karen et al 2014)

Il appartient à une classe de gènes appelés oncogènes qui une fois mutés ils ont le potentiel de provoquer la transformation des cellules normales en cellules cancéreuses.

Le gène N-Ras code pour une enzyme qui chez l'homme est codée par le gène ARN. (L. JOHN, 2014)

Le gène N-Ras code pour une protéine membranaire qui fait la navette entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique. Cette navette est réglementée par palmitoylation et depalmitoylation par le complexe ZDHHC9-GOLGA7.

Des mutations de ce gène ont été associées à un cancer du rectum somatique, le cancer folliculaire de la thyroïde, le syndrome lymphoprolifératif auto-immune, le syndrome de Noonan, et leucémie myélomonocytaire juvénile. (NCBI) (Ref Seq, juin 2011).

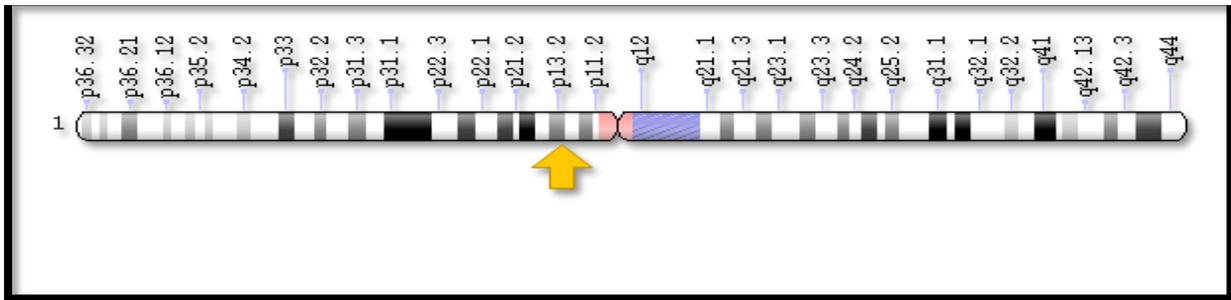


Figure 14 : Localisation du Nras sur le chromosome 1;

Position cytogénétique: 1p13.2, qui est court (p) du chromosome 1 à la position 13.2

Localisation moléculaire : paires de bases 114.704.464 à 114.716.894 sur le chromosome 1 (Homo sapiens Annotation sortie 107, GRCh38.p2) (NCBI)

V .3-2- Découverte :

Il a été découvert par une petite équipe de chercheurs dirigée par Robin Weiss à l'Institut de recherche sur le cancer à Londres. Il a été le troisième isoforme de gène RAS à découvrir, et a été nommé N-Ras, pour son identification initiale dans les cellules du neuroblastome humain (tumeur solide extra-crânienne la plus fréquente chez le jeune enfant. C'est un cancer touchant des cellules de la crête neurale qui constitue le système nerveux autonome sympathique).

V.3-3-Fonction :

La protéine N-Ras est impliquée principalement dans la régulation de la division cellulaire. Par transduction du signal, la protéine retransmet des signaux depuis l'extérieur de la cellule vers le noyau. Ces signaux instruisent la cellule de croître et de se diviser ou de mûrir et de prendre des fonctions spécialisées. La protéine N -Ras est une GTPase, ce qui signifie qu'il convertit une molécule appelée GTP dans une autre molécule appelée PIB. Les protéines actives Nras comme un interrupteur, et il est activé et désactivé par les molécules de GTP et du PIB. Pour transmettre des signaux, la protéine N- Ras doit être activée par la fixation à une molécule de GTP. La protéine N- Ras est éteinte (inactivé) quand il convertit le GTP au PIB. Lorsque la protéine est liée au PIB, il ne relaie pas les signaux au noyau de la cellule.

V .3-4- Principales mutations de N-Ras et rôle dans le cancer colorectal :

Les mutations de N-Ras sont présentes dans 3 à 5% des cancers colorectaux .A l'instar des mutations de BRAF, les mutations de N-Ras et de K-Ras sont mutuellement exclusives. (L. Karen et al 2014)

Certaines mutations génétiques dans le gène N-Ras sont acquises au cours d'une durée de vie et sont présents seulement dans certaines cellules. Ces modifications, appelées mutations somatiques, ne sont pas héritées. Les mutations somatiques dans le gène N-Ras sont impliquées

dans le développement de plusieurs types de cancer. Ces mutations vont conduire à une protéine N- Ras qui est toujours active et peut diriger les cellules à croître et se diviser sans contrôle. Des études suggèrent que les mutations du gène N-Ras sont courantes dans une forme agressive de la peau cancer appelé mélanome. Des mutations du gène N-Ras ont également été trouvées dans d'autres types de cancer.

Au moins deux mutations dans le gène N-Ras ont été trouvées pour causer le syndrome de Noonan. (**GENTOGENE**)

la mutation de RAS conduit à une GTPase défectueuse une activité qui entraîne une hyperactivation de la cascade de signalisation, déterminer une activité incontrôlée de l'aval effecteurs tels que les protéines de la RAF et MAP- kinases. Les mutations RAS se produisent dans environ 20-25% de cancers humaine ; dans cancers colorectaux mutations (CRC) (**M. Schirripa et al**, 2014)

***Rôle des mutations N-Ras comme marqueurs pronostiques et prédictifs :**

Les mutations N-Ras sont considérées comme facteurs prédictifs de résistance aux anticorps monoclonaux anti-EGFR, elles affectent le pronostic des patients atteints de CCRm et prédit le manque de réponse aux anti-EGFR. Elles sont dans 6 % des cancers colorectaux métastatiques.

Les caractéristiques cliniques et pathologiques des tumeurs N-Ras mutantes étaient similaires à ceux qui ont des mutations K-Ras

Les tumeurs N-Ras mutées peuvent être considérées comme un problème négligé, puisque jusqu'à aujourd'hui, ils ont jamais été caractérisée d'une histologie et le point de vue clinique, ainsi que par rapport à CCRm

La répartition des sites de la tumeur primaire dans N-Ras muté ne diffère pas de KRAS muté des patients, sauf pour une faible prévalence de l'histologie mucineuse qui était moins fréquente dans les tumeurs N-Ras mutées.

Les mutations N-Ras ne semblent pas affecter les premières phases de la progression tumorale et la séquence adénome-carcinome, mais ils pourraient inhiber le stress induit par l'apoptose des cellules épithéliales. Les voies intracellulaires, un effet différent de ces mutations sur la signalisation en aval des effecteurs de la cascade a été suggéré. Ces différentes mutations peuvent définir des sous-types spécifiques de CCRm. Un vaste la caractérisation moléculaire est essentiel, non seulement pour l'identification des patients qui peuvent tirer détriment de l'anti-EGFR, mais aussi dans le but d'identifier des stratégies thérapeutiques pour ces patients par le biais d'essais conçus de manière appropriée. (**M. Schirripa et al**, 2014)

V-4-Comparaison N-Ras/ K-Ras :

Concernant les mutations somatiques N-Ras dans les tumeurs colorectales, les fréquences observées sont beaucoup plus faibles, soit de 3 % à 9,6 %, dépendamment des études. Contrairement à K-Ras où ce sont les glycines 12 et 13 (G12 et G13) qui sont fréquemment mutées, pour N-Ras, il s'agit de la glutamine 61 (Q61), située dans l'exon 3, qui est le codon le plus souvent touché (**De Roock et al.** 2010). Les mutations N-Ras et K-Ras sont mutuellement exclusives. Le tableau 2 présente un résumé des principales études répertoriées. (Annexes 5)

Les tumeurs N-RAS et K-RAS mutées ne montrent pas de différences significatives en termes clinique et pathologique caractéristiques, à l'exception d'une faible prévalence de l'histologie mucineuse et des métastases pulmonaires (**M. Schirripa et al.**, 2014)

L'étude de cancer colorectal impliquant le Nras peut se faire en immunohistochimie comme en moléculaire (le séquençage par exemple) :

V-5-Le séquençage :

Le séquençage de l'ADN, consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné. Les premières techniques de séquençage ont été développées en parallèle au milieu des années 1970. Les méthodes de Sanger (Grande-Bretagne) et Gilbert (Etats-Unis) ont toutes deux été récompensées d'un prix Nobel de chimie en 1980

Il sert au test héréditaire, identification judiciaire et la thérapie génique. (**NCBI**) (Voir l'annexe 7)

V-6-L'immunohistochimie :

C'est une technique associant l'immunologie et l'histochimie. Elle permet la détection d'une substance chimique dans un tissu ou dans une cellule par un anticorps dirigé contre cette substance.

Les anticorps sont appliqués sur la section tissulaire (ou sur la cellule) pour se lier à l'antigène (Ag) correspondant.

L'IHC est réalisée dans un 2ème temps, en complément de l'examen histologique standard pour classer une tumeur si l'histologie seule ne le permet pas et apporter des informations complémentaires : en terme de pronostic et à visée thérapeutique.

L'IHC peut se faire : sur des coupes en paraffine, coupes en congélation ou examen cytologique

Principe de l'immunohistochimie

Anticorps conjugués : La molécule marquée est conjuguée à une immunoglobuline : soit l'anticorps primaire (méthode directe) ou l'anticorps secondaire (méthodes indirectes)

Automatisation

Quand les demandes d'analyses IHC sont très nombreuses, il peut devenir difficile de gérer l'utilisation d'un grand nombre d'anticorps tout en tenant compte des particularités de chacun.

L'automatisation permet d'uniformiser et d'améliorer la reproductibilité de la coloration et de réduire la variabilité des résultats analytiques. Par conséquent, il est fortement recommandé d'automatiser ces techniques.

L'immunohistochimie permet de localiser des antigènes dans les tissus et les cellules au moyen d'anticorps spécifiques. Elle met en évidence des protéines d'intérêt contribuant au diagnostic positif et différentiel, voire au pronostic et à la réponse thérapeutique. Il existe une dizaine de systèmes de révélation en immunohistochimie. Leur niveau d'amplification est variable ainsi que leur complexité d'utilisation. Il est important de connaître le principe du système utilisé au laboratoire pour adapter la technique afin de limiter l'apparition de signal non spécifique.

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Objectifs :

Nous rappelons que notre but est de comparer entre la détection de la mutation du gène N-Ras par une technique moléculaire et par celle d'immunohistochimie. Notre approche est la suivante :

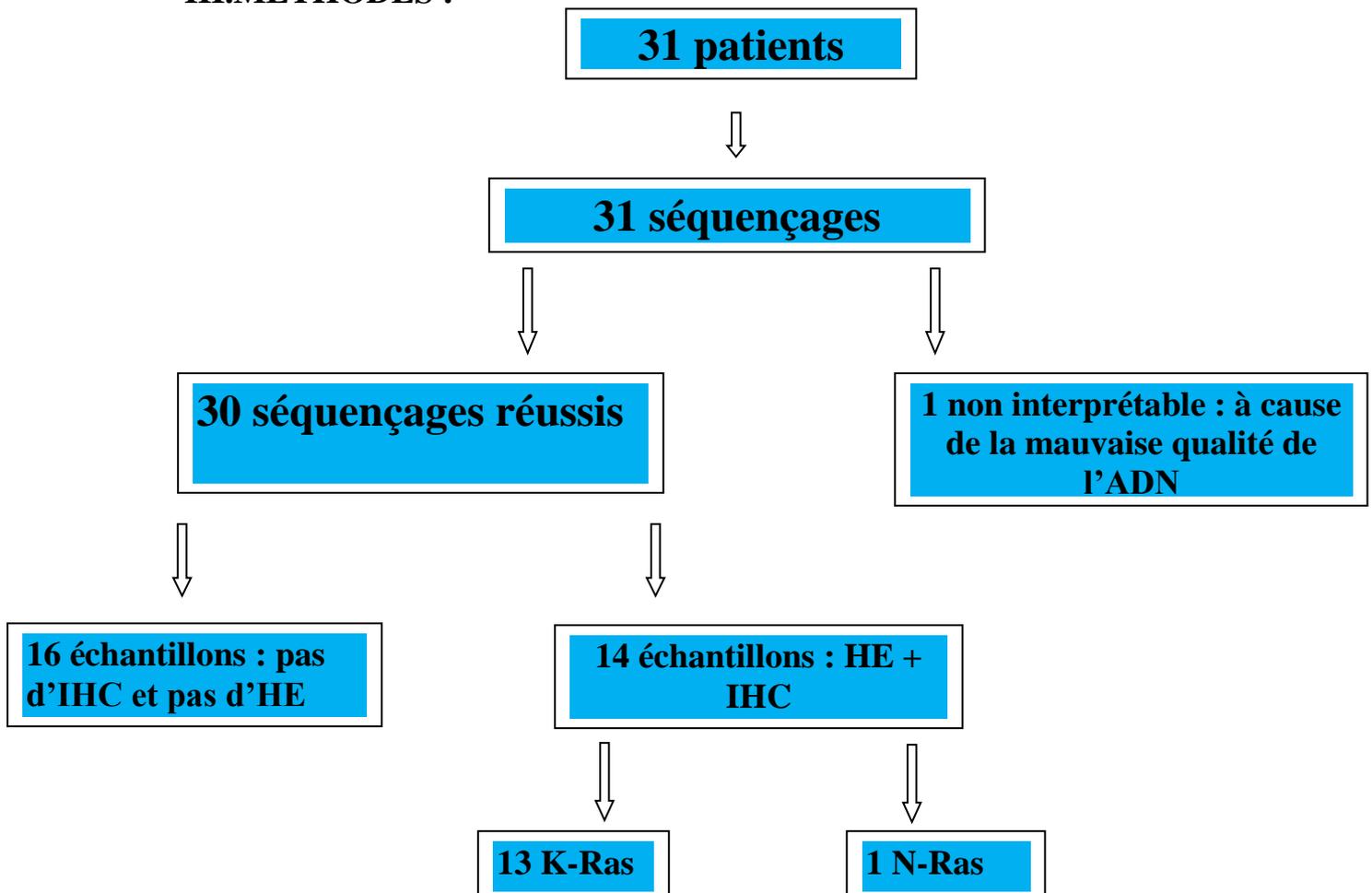
- 1- Détection des mutations N-Ras et K-Ras par une technique de la biologie moléculaire qui est le séquençage.
- 2- Comparer les différents aspects histologiques des tissus épithéliaux atteints d'un cancer colorectal impliquant soit la mutation du gène K-Ras ou N-Ras.
- 3- Détection de la mutation N-Ras à l'aide d'un anticorps anti-N-Ras et voir l'efficacité de l'étude immunohistochimique.

II.MATERIEL :

II.1. Les patients :

Notre étude concerne 31 patients atteints d'un cancer colorectal suivis au niveau du service d'anatomopathologie du CHU de Blida (Frantz Fanon) et au GENEKOR (Committed to biotechnological innovation) et au laboratoire d'onco-pharmacologie ; centre ANTOINE-LACASSAGNE, 2016, France.

III.METHODES :



III.1 Partie rétrospective (Biologie moléculaire) :

On a reçu 31 résultats de séquençage de nos patients atteints d'un cancer colorectal suivis au niveau du centre GENEKOR Committed to biotechnological innovation et au niveau du laboratoire d'onco-pharmacologie ; centre ANTOINE-LACASSAGNE, 2016, France.

Le séquençage a été réalisé après une extraction d'ADN suivie d'une détection de mutation par HRM et par sondes TaqMan et séquençage.

Il y a un cas de mutation N-Ras, des cas de mutation K-Ras et des cas où il n'y a pas de mutation K-Ras ou N-Ras.

-Le cas de cancer colorectal impliquant une mutation N-Ras :

Rapport D'Analyse Moléculaire
Directeur Scientifique: Dr. George Nasioulas
Mutations des gènes K-RAS et N-RAS
<p>Les gènes KRAS et NRAS sont membres de la famille des gènes RAS. Les mutations somatiques des gènes KRAS et NRAS ont été trouvées dans une variété de tumeurs malignes humaines.</p> <p>L'ADN a été extrait de l'échantillon à l'étude en utilisant le kit de tissu Qiagen QIAmp DNA FFPE. Un Re-séquençage ciblé de l'ADN (TruSeq Custom Amplicon, Illumina) a été utilisé pour la détection de mutations dans les exons 2,3 et 4 des gènes KRAS et NRAS. Le séquençage a été réalisé en utilisant la nouvelle génération suivante de plate-forme de séquençage MiSeq (Illumina).</p>
Résultats pour l'échantillon analysé:
L'échantillon analysé porte une mutation dans l'exon 3 de l'oncogène N-RAS.
Directeur Scientifique Dr. George Nasioulas Biologiste Moléculaire

Figure 15 : Le résultat de séquençage représentant le cas de N-Ras muté.

La figure représente le résultat de séquençage du cas de N-Ras muté. L'échantillon est issu d'une pièce de colectomie segmentaire ; c'est un adénocarcinome bien différencié liberkhunien.

III.2. Partie prospective :

III.2.1. Prélèvements :

Les pièces de tous les sujets ont été collectées au service d'anatomopathologie du CHU de Blida (Frantz Fanon). A la réception, chaque pièce est fixée dans le formole pour la conserver en attendant de faire la macrotomie.

III.2.2. Réception des échantillons et macrotomie:

Le service d'anatomopathologie reçoit différentes pièces fraîches des patients (estomac-côlon rectum-sein-...) dont chacune est enregistrée.

Dans la salle de macrotomie :

1-Traitement du **rectum** par les médecins :

- Réaliser des coupes circulaires (tranches de 1cm de largeur) sur le rectum.
- Couper les tranches en morceaux.
- Les placer dans des cassettes.
- Récupérer les ganglions trouvés (12 ganglions pour un rectum) dans le curage et les mettre dans des cassettes.

2-traitement du **côlon** par les médecins :

exemple :

- On récupère le côlon du formole.
- C'est un côlon droit iléon de 13 cm et appendice de 7cm.
- à la coupe on a trouvé une tumeur à coloration blanchâtre et consistance dure.



Figure 16 : une partie du côlon droit malade.

- La tumeur est bourgeonnante spinosante



Figure 17



: Tumeur d'aspect blanchâtre.

- On réalise des coupes dans la tumeur afin de trouver des ganglions et les analyser :

Figure 18 : des coupes dans la tumeur.



ganglions ;
il faut avoir au
analysée.

-On enlève tout les
moins 12 ganglions a

Figure 19: des ganglions a analysées.

1-A l'aide de l'automate de traitements des tissus (1) on a réalisé une déshydratation des tissus à plusieurs étapes pendant 12h environ :



-Fixation des tissus avec le formole
(mise en évidence d'un
détail morphologique, fixation et conservation).

Figure 20 : Automate de traitement des tissus

-Circulation par le circulateur : déshydratation par l'alcool (éthanol) à concentrations croissantes et éclaircissement par le xylène.



2-Imprégnation (inclusion) par la paraffine liquide :

Figure 21 : Un moule contenant l'échantillon avec de la paraffine

-On a réglé l'automate d'inclusion par la paraffine ; on a ajouté des granulés de paraffine à l'appareil et on l'a réglé à 67°C afin de la liquifier.



-on a récupéré les échantillons dans les cassettes (afin de mieux

conserver et protéger les biopsies et on les a mis dans des cassettes à petits trous et dans de petits bouts de ponge).

Figure 22 : Le fond de la cassette sur l'échantillon dans le moule

-On a ouvert et on a enlevé le couvercle de la cassette.

-On a fait couler de la paraffine dans des moules ou on dépose l'échantillon (2).

-On a appuyé avec un support sur l'échantillon pour obtenir une coupe à un niveau bien droit.

- On a remis le fond de la cassette (3).
- On a coulé encore de la paraffine dans le moule.
- On a fait une solidification par la plaque froide
- On les a mis au congélateur.
- On a détaché le moule et on a laissé le reste (4)

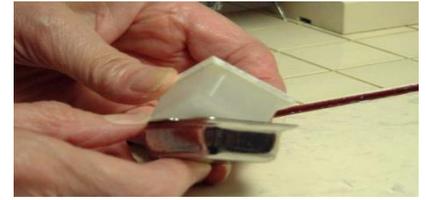


Figure 23 : Détachement du moule

III-2-3- Microtomie :

- On a récupéré les échantillons paraffinés du congélateur (5).
- A l'aide de microtome semi-automatique qui coupe entre 2 et 5 μm on a réalisé des coupes fines (on commence par éliminer la paraffine solidifiée jusqu'à arriver à l'échantillon).

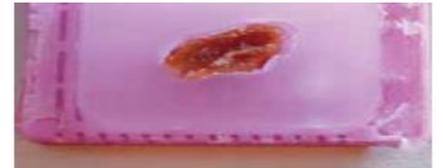


Figure 24 : Echantillon congelé.

*changer les lames de microtome quand il le faut

- On a étalonné l'appareil ou baigne les coupes ; eau distillée à 50°C (ne pas dépasser les 60°C afin de ne pas faire fondre la paraffine).

Figure 24 : Echantillon congelé.

- On a laissé flotter la fine coupe dans l'eau distillée.

- A l'aide d'une lame on a pris la fine coupe, on l'a laissé sécher et on l'a mentionné avec un numéro représentatif.

- On a mis toutes les lames ensemble dans un porte-lame (chaque lame représente un échantillon).

4-Déparaffinage :

- On a mis les échantillons dans l'étuve à 100°C pendant 30mn et 15 mn dans le xylène pour le déparaffinage



Figure 25 : le microtome.

*L'inclusion de l'échantillon dans la paraffine (nécessaire pour

réaliser les coupes) implique son élimination préalablement à la coloration. En effet, la paraffine est hydrophobe tandis que les colorants sont hydrophiles. C'est pourquoi la coloration des coupes comporte une étape de déparaffinage et de réhydratation. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine (toluène ou xylène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % (compatible avec le solvant précédent) jusqu'à 70 % (compatible avec l'eau), avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale.



- Chaque bain, dans un solvant est fait dans un flacon cylindrique adapté appelé tube de Borel.

- Les blocs qui restent sont archivés.

*Après réhydratation, la coupe est colorée. Elle est d'abord plongée dans l'hémalum de Masson pendant 5 à 10 minutes, rincée par trois bains successifs dans l'eau de conduite puis dans l'eau distillée.

La coupe est ensuite recouverte d'une goutte d'éosine directement sur la lame. Après deux minutes de coloration, la coupe est rincée par l'eau sous le robinet (attention à ne pas décoller la coupe par un courant d'eau trop violent) puis dans l'eau distillée. Il faut alors procéder à la déshydratation, opération inverse de celle menée au début, avant de pouvoir faire le montage dans la résine.

La déshydratation est réalisée en plongeant successivement la lame dans deux bains d'alcool à 95 % puis dans deux bains d'alcool à 100 % et enfin dans deux bains de solvant (toluène ou xylène). À la sortie du solvant, une goutte de résine de montage (par exemple, E-kit) est disposée sur la coupe et une lamelle est appliquée de façon à ce que la résine recouvre l'ensemble de la coupe. La résine polymérise en une vingtaine de minutes mais on peut accélérer le processus en plaçant la lame sur une plaque d'histologie à 50°C ou simplement sur un radiateur.



Figure 26 : Coloration par automate de coloration : Hématoxyline Eosine (HE).

III-2-4 Immunohistochimie :



Après la technique d'HE on passe à la technique immunohistochimique (manuelle dans ce cas).

-On a réalisé des coupes des tissus déjà paraffinés avec le microtome.

-On a mis les coupes dans des lames.

-On les a incubés dans l'étuve pendant une nuit complète.

-On a mis dans la cocotte et laisser 30mn. (La cocotte sert au démasquage, déparaffinage et au refroidissement)



Figure 27 : La cocotte.

-On a ouvert la cocotte (ouvrir après avoir laissé échapper la vapeur 2 mn)

-On a récupéré les lames dans les porte-lames.

-Pour changer la pression on les a mis pendant 5mn dans un PH= 9 ou 6 selon la pièce.

-On a mis dans de l'eau distillée pendant 5mn.

-On a déposé les lames dans la chambre humide pour les laisser hydratées (dans de l'eau distillée pendant la réalisation de la technique) :

*Avec un crayon hydrophobe on a encadré l'échantillon sur la lame afin que la solution qu'on va mettre sur cet échantillon ne déborde et ne dépasse pas ce cadre.

1-On a mis une solution de peroxydase (100 à 300 µl) avec une pipette sur nos échantillons pendant 5mn qui élimine les sites endogènes sur l'échantillon suivie par deux lavages de 5mn chacun avec une solution de lavage pour éliminer l'excès.

2-On a mis une solution de protéine-bloc (pas toujours) pour faciliter la fixation des anticorps qu'on va mettre dans l'étape suivant.

3-On a mis l'anticorps spécifique (on réalise les dilutions des anticorps qui peuvent se conserver 3 à 6 mois selon la fiche technique des réactifs) à l'échantillon qui sert à marquer et révéler l'expression de notre protéine (Le temps d'incubation de l'anti corps anti N-Ras est 30 min et en utilisant un PH=7 après 1/10 de dilution). Suivie aussi par deux lavages avec une solution de lavage pour éliminer l'excès.

4-On a mis le post-primary pendant 30 mn (pas toujours) puis le polymère HRP pendant 30 mn suivie aussi par deux lavages avec une solution de lavage pour éliminer l'excès.

5-On a mis le DAB (dilué auparavant) pour marquer avec une coloration marron 1mn puis réaliser 3 ou jusqu' à 4 lavages.

6-On a marqué avec l'hématoxyline pendant 1 mn qui donne une contre-coloration bleue.

-On a lavé avec de l'eau de robinet.

-On les a mis dans une solution d'ammoniac pendant 5 mn pour bleuter la coloration.

-On a lavé avec de l'eau distillée.

-La batterie finale : la réhydratation dans des becs ;

1-dans l'alcool 70° pendant 3mn.

2-dans l'alcool 90° pendant 3mn.

3-dans l'alcool 100° pendant 3mn.

4-dans l'alcool 100° pendant 1mn.

5- dans le xylène pendant 3mn.

6- dans le xylène pendant 3mn.

7- dans le xylène pendant 3mn.

-On a fait le montage dans des lames avec l'E-KIT dans la lamelle qui aide sa fixation sur la lame.

-On a bien essuyé avec la gaze.

-On les a laissé sécher.

-Les lames prêtes pour observation microscopique.

*Entretien de laboratoire : le lavage de matériel se fait avec liquide vaisselle pour éliminer l'huile protectrice des appareils.

*l'ordre et la propreté sont très importants dans le laboratoire.

*certains anticorps nécessitent une incubation une nuit complète à +4°c.

Chapitre III : Résultat et discussion

Résultats

Partie Rétrospective:

a/ Sexe des patients

- La détection moléculaire par séquençage de la mutation N-Ras ou K-Ras impliquée dans le cancer colorectal métastatique des 31 patients à donné les résultats suivants :

41.94% sont des hommes et 58.06% sont des femmes.**fig 28**

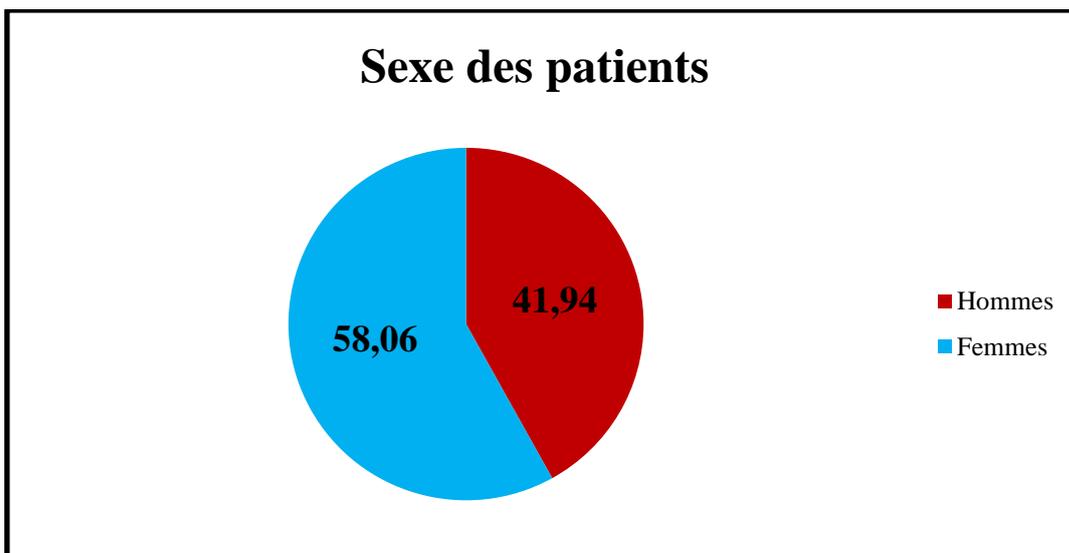


Figure 28 : Répartition des patients selon le sexe.

b/ âges des patients :

- Le cancer colorectal chez nos patients est présent chez les cas de plus de 25 ans jusqu'à 80 ans d'une manière puissante, puis chez les patients de plus de 80 ans d'une façon légère.

c/ Types d'échantillons :

- Pour nos échantillons la plupart étaient sous forme de pièces, les autres sont des biopsies.**fig 29**

:

Types d'échantillons

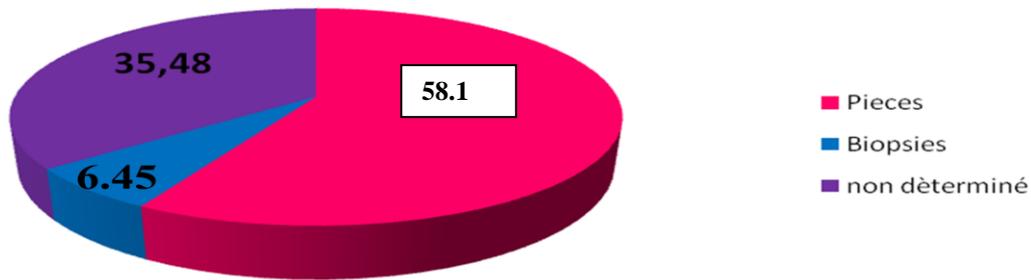


Figure 29 : Types d'échantillons sélectionnés.

d/ Siège de la tumeur :

-Les tumeurs sont localisées au niveau du côlon gauche plus qu'au côlon droit ; car la partie sigmoïde, et le rectum sont les zones les plus touchées. **fig 30**

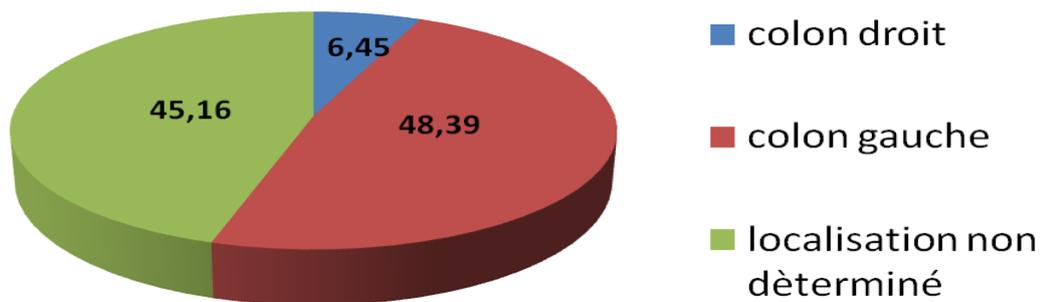


Figure 30 : Siège de la tumeur

e/ Mutation du côlon gauche

➤ Dans le côlon gauche il y a plus de mutation K-Ras que de N-Ras ; **Fig 31**

Mutation du côlon gauche

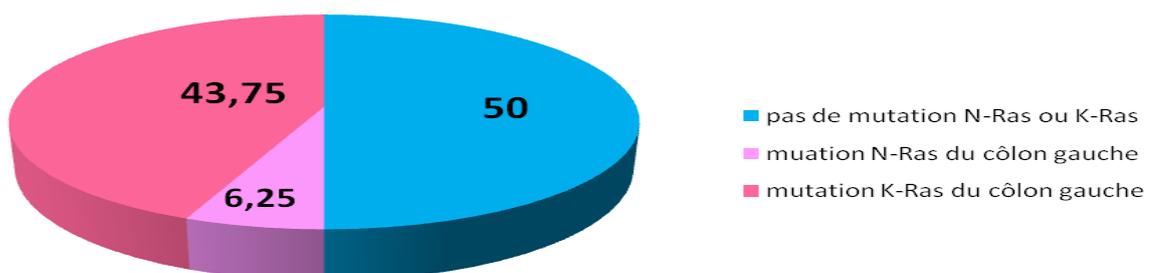


Figure 31 : Mutation du côlon gauche

f/ Répartition TNM :

-La plupart des mutations retrouvées étaient chez les patients de grade PT3 (adénocarcinomes peu différenciés) que PT4 (adénocarcinomes indifférenciés).**fig 32**

Répartition de grade

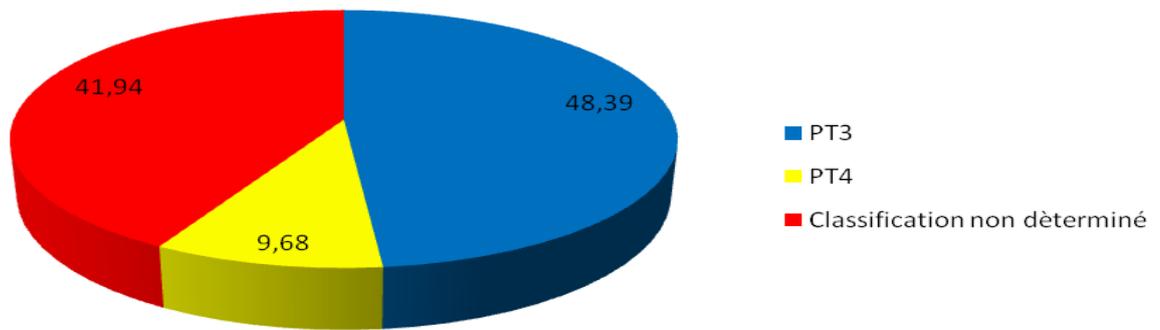


Figure 32 : Répartition de grade

g/ Répartition des résultats de séquençage.

- Dans nos résultats la plupart des cas ne comportent pas de mutation N-Ras ou K-Ras à coté de quelques cas à mutation K-Ras et un seul cas à mutation N-Ras ; l'implication de la mutation N-Ras par rapport à la mutation K-Ras dans le CCR était toujours rare.**fig 33**

la répartition des différentes mutations

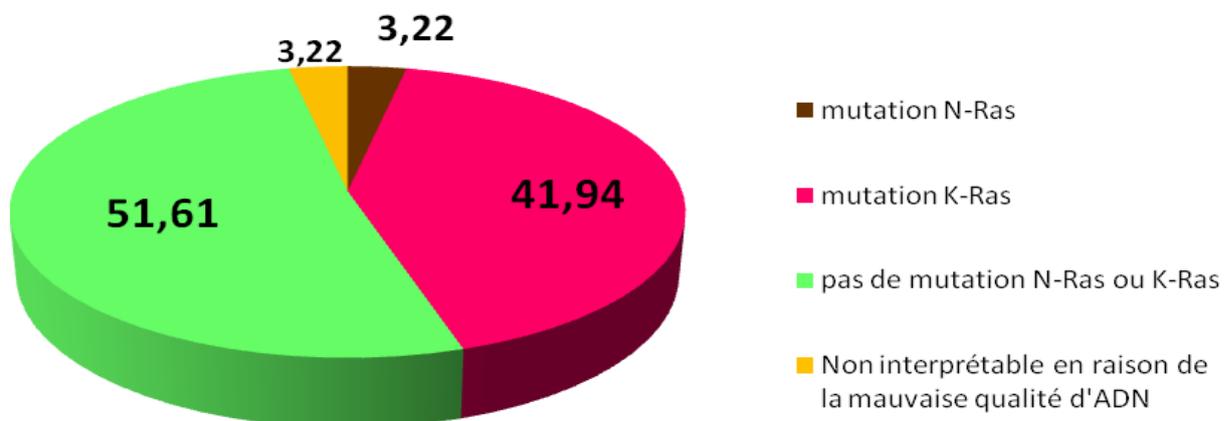


Figure 33 : Représentation de la répartition des résultats de séquençage

h/ Métastase

La plupart des métastases sont hépatiques contre un seul cas cérébral. Le drainage portal de l'organe cible et des conditions locales favorisant le développement in-situ des cellules cancéreuses expliquent la localisation préférentiellement hépatique des métastases des cancers colorectaux. (Voir annexe1 pour une explication plus développée). **Fig 34**

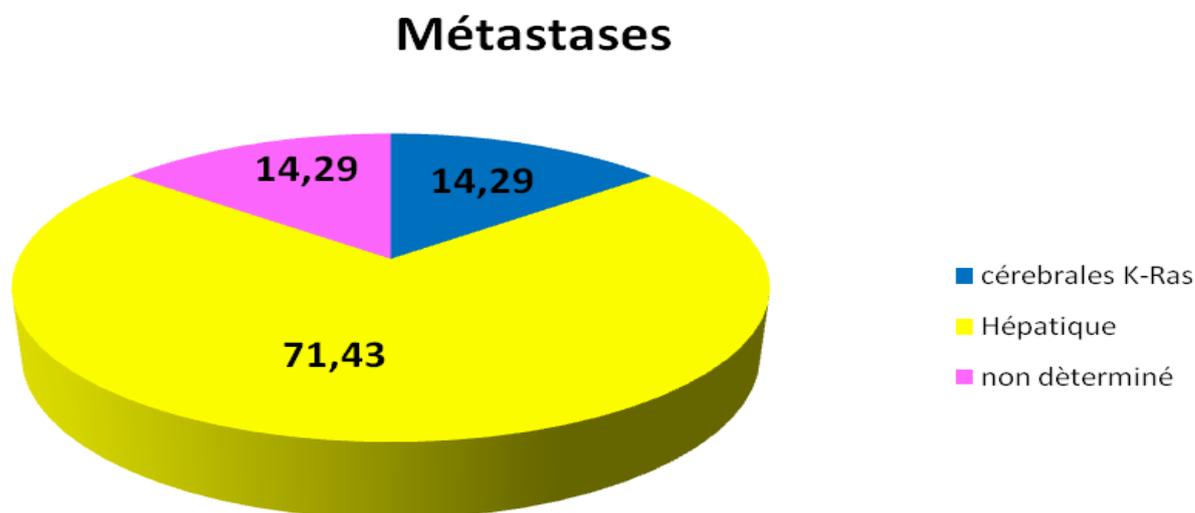


Figure 34 : répartition des métastases chez nos patients

Tableau 5 : Histologie du cancer colorectal selon les mutations N-Ras / K-Ras

mutation	K-Ras	N-Ras	Pas du mutation K-Ras ou N-Ras	Non interprétable
Adénocarcinome bien différencié	4	1	5	0
Adénocarcinome moyennement différencié	3	0	6	1
Adénocarcinome peu différencié	0	0	1	0
Carcinome à cellules indépendantes	3	0	1	0
Adénocarcinome colloïde	0	0	0	0
Adénocarcinome colloïde muqueux	1	0	2	0
Histologie non déterminé	2	0	2	0
Total	12	1	17	1

Partie Immunohistochimique :

I. Observation microscopique d'HE :

L'observation microscopique des lames après traitement histologique par l'hématoxyline éosine (HE) à donnée les résultats suivants :

- Muqueuses normales

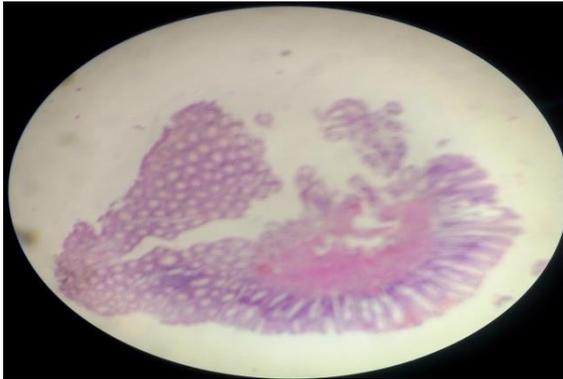


Figure 35 : Paroi épithéliale normale.

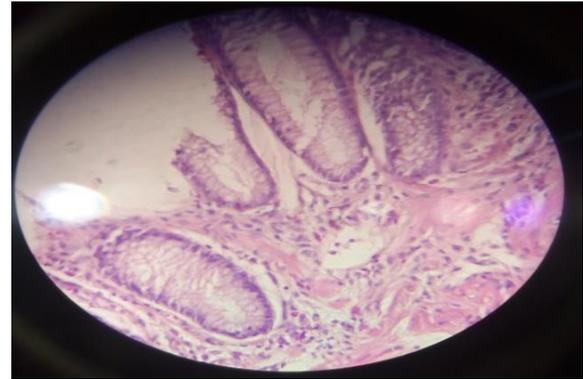


Figure 36 : Muqueuse normal.

La paroi épithéliale est normale, elle n'est pas irrégulière. **Fig 35**

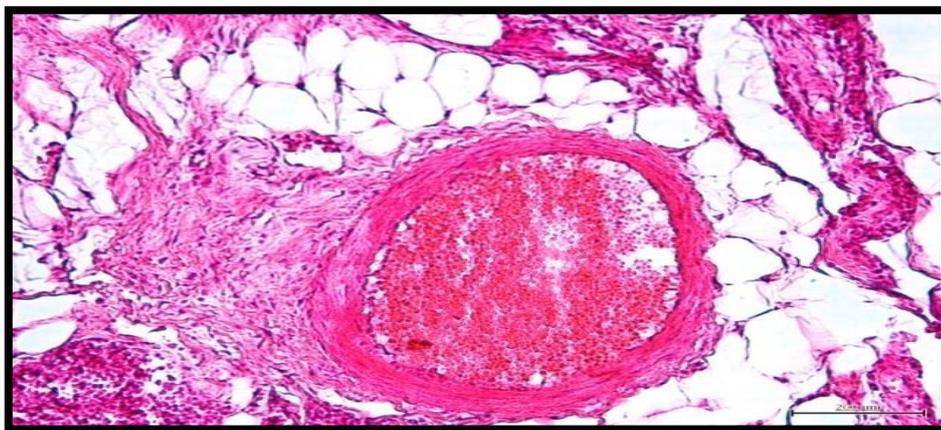


Figure 37 : Vaisseau sanguin normal.

Le vaisseau sanguin représenté est normal (pas d'embolus vasculaire). **fig37**

I.1- Comparaison entre aspects tissulaires avec mutation K-Ras et/ou mutation N-Ras

a- Aspects tissulaires avec mutation N-Ras.

- 1-Structure glandulaire :
- 2-Quelques travées : membranes cytoplasmiques irrégulière
- 3-des atypies cytonucléaires ; anomalies des noyaux (augmentation de taille, inégalité (anisocaryose), structure de chromatine irrégulièrement répartie) sont présentes au niveau de la plus part des cellules malignes.

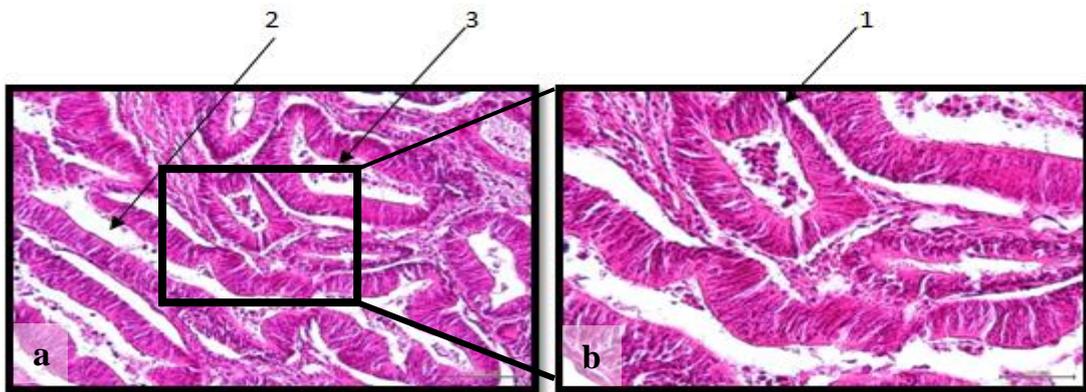


Figure 38 : Observation microscopique d'un tissu cancérisé du côlon impliquant la mutation N-Ras (a) Grx10, (b) Grx 40. (1) 1-Structure glandulaire. (2) Quelques travées : membranes cytoplasmiques irrégulière. (3) Atypies cytonucléaires ; anomalies des noyaux (augmentation de taille, inégalité (anisocaryose), structure de chromatine irrégulièrement répartie) sont présentes au niveau de la plus part des cellules malignes.

b- Aspects tissulaires avec mutation K-Ras ;

- 1- travées
- 2 -quelques glandes

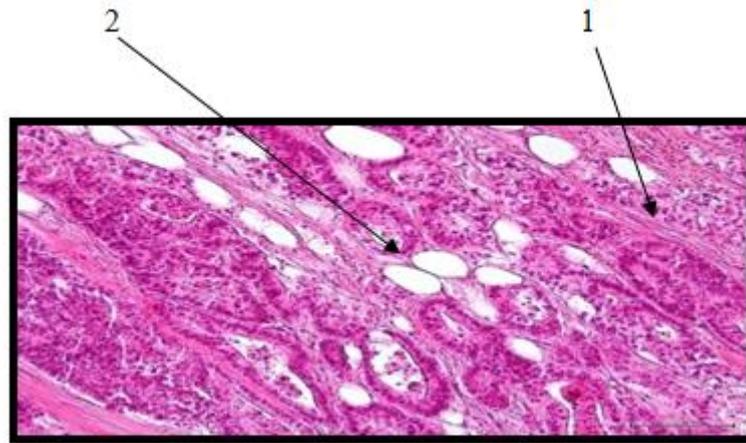


Figure 39 : Observation microscopique d'un tissu cancéreux (cancer colorectal impliquant la mutation K-Ras) ; (1) Travées et (2) Quelques glandes

Glande centrée de nécrose

La nécrose est néfaste et échappe au contrôle de l'organisme. C'est un critère de malignité.**fig 40**

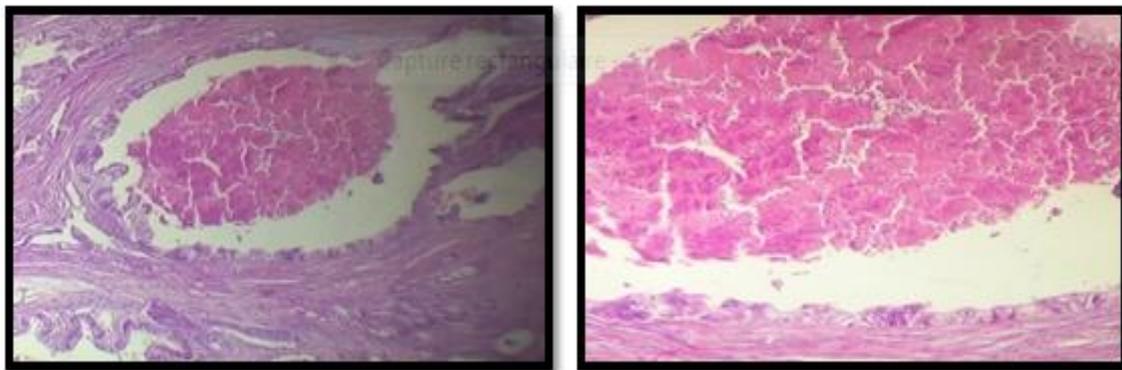


Figure 40 : Glande centrée de nécrose (K-Ras+)

❖ Différents types histologiques K-Ras+ retrouvés dans notre série :

Après traitement histologique des K-Ras + on aura différents types histologiques :

- 1-Adénocarcinome bien différencié
- 2-Adénocarcinome moyennement différencié
- 3-Adénocarcinome colloïde
- 4-Adénocarcinome peu différencié

1-Adénocarcinome bien différencié :

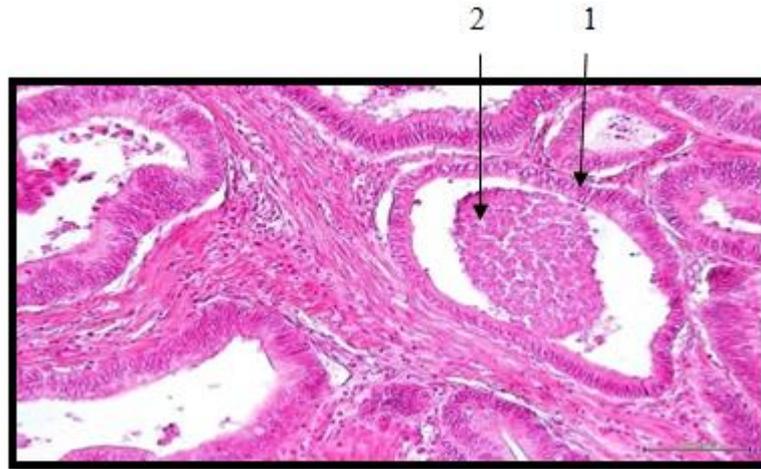


Figure 41: Adénocarcinome bien différencié (K-Ras+). (1) Glandes individualisées proches des cellules normales. (2) anomalies des noyaux (augmentation de taille, inégalité (anisocaryose), structure de chromatine irrégulièrement répartie).

2- Adénocarcinome moyennement différencié : structures polyadénoïdes avec souvent de grandes variations au sein de la même tumeur

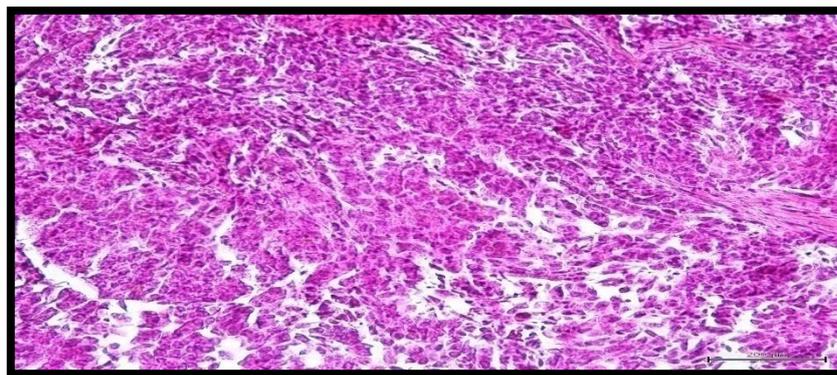


Figure 42: Adénocarcinome moyennement différencié (K-Ras+)

3- Adénocarcinome colloïde : Caractérisé par une importante mucosécrétion en plages extracellulaires (flèche)

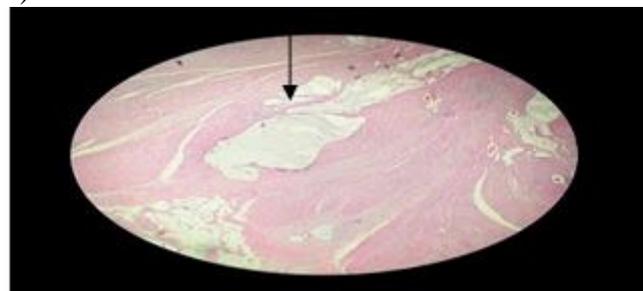


Figure 43 : Aspect d'un adénocarcinome colloïde (K-Ras+)

4- Adénocarcinome peu différencié : de rares lumières glandulaires

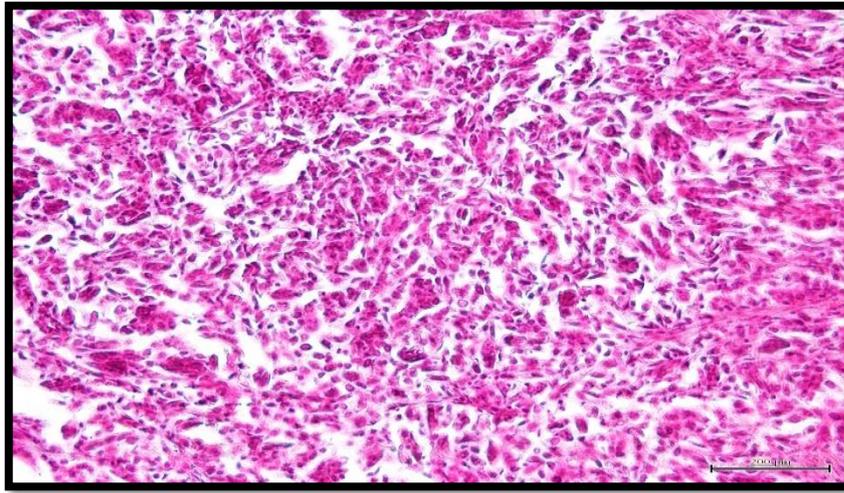


Figure 44 : Aspect d'un adénocarcinome peu différencié (K-Ras+)

Tableau 6: Représentation des résultats de l'observation microscopique après traitement par HE.

Observations	Cancer colorectal impliquant une mutation N-Ras	Cancer colorectal impliquant une mutation K-Ras
Atypies cellulaires	+	+
Nécroses cellulaires	+	+
Travées	+	+
Emboles vasculaires	+	+
Glandes tapissées de cellules tumorales	+	+

Les N-Ras+ et les K-Ras+ représentent les mêmes aspects histologiques.

II. Observation microscopique de l'IHC :

L'observation microscopique des lames après traitement Immunologique par l'anticorps anti Nras à donnée les résultats suivants :

N-Ras+ : La mutation N-Ras est détectée par l'anticorps anti-N-Ras.

N-Ras⁻ : Pas de mutation N-Ras détectée.

N-Ras+ : Infiltrat inflammatoire sous forme de follicules à centre germinatif clair.

- Marquage cytoplasmique
- N-Ras+ : l'anti corps anti N-Ras détecte la mutation, le marquage rose clair représente le siège cytoplasmique (localisation de la protéine N-Ras entre la membrane plasmique et l'appareil de Golgi).

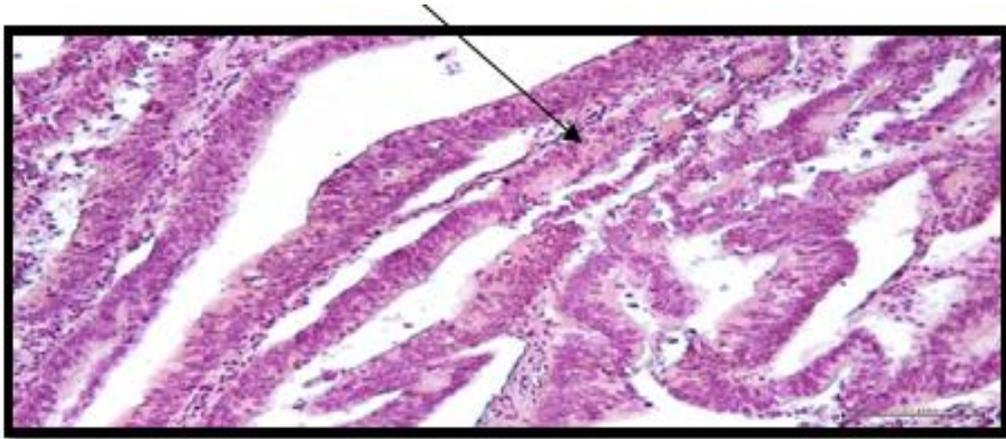


Figure 45 : Immunohistochimie d'une tumeur N-Ras (N-Ras+)

N-Ras négatif : absence de marquage cytoplasmique des cellules tumorales à l'anti corps anti N-Ras dans les cas d'une mutation K-Ras.

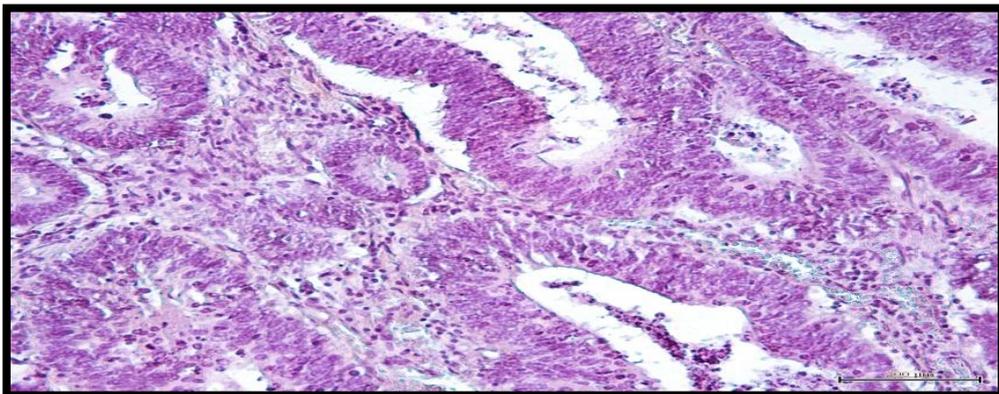


Figure 46 : Immunohistochimie d'une tumeur N-Ras (N-Ras négatif)

Discussion

II-Partie moléculaire :

Le cancer colorectal chez nos patients est présent chez les cas de plus de 25 ans jusqu'à 80 ans d'une manière puissante, puis chez les patients de plus de 80 ans d'une façon légère.

Nos échantillons sont la plupart sous forme de pièces, les autres sont des biopsies ; les pièces sont de taille plus importante donc elles vont donner de meilleurs résultats.

Nos résultats confirment que dans le cancer colorectal métastatique les mutations N-Ras se produisent dans environ 3 à 5% du cancer colorectal (3.22% dans notre cas).

Le seul cas qui représente un cancer colorectal impliquant une mutation N-Ras dans notre série ne présente pas une métastase néanmoins des études préalablement réalisées et qui déclarent que la mutation N-Ras est impliquée dans 6 % des cancers colorectaux métastatiques. (Faibles chances pour trouver des cas de CCRm de N-Ras muté.)

L'importance de cette étude qui s'intéresse à la mutation N-Ras dans le CCRm est le diagnostic et le suivi du cancer colorectal impliquant cette mutation.

La mutation N-Ras ou K-Ras ne définit pas le grade jusqu'à présent.

Notre N-Ras muté est issu d'une pièce de colectomie segmentaire, adénocarcinome bien différencié lieberkhunien (C'est un carcinome, donc un épithéliome, qui atteint les glandes de lieberkuhne de l'intestin. Les glandes de Lieberkuhne sont des glandes tubulaires de la muqueuse intestinale).

Nos résultats confirment que dans le cancer colorectal métastatique les mutations K-Ras se produisent dans environ 40% du cancer colorectal (41.94% dans notre cas).

KRAS mutés ont été associée à des caractéristiques cliniques spécifiques, tels que l'apparition de métastase cérébrales (14.29 %) et des métastases hépatiques (71.43 %).

Les mutations K-Ras semblent produire dans des stades précoces de la carcinogénèse et pour être directement impliquée dans la transition de l'adénome à adénocarcinomes (la plupart des adénocarcinomes).

Les tumeurs sont la plupart de stade PT3 puis PT4 et les deux sont des tumeurs à haut grade. Parfois les résultats sont ininterprétables à cause de la qualité d'échantillon ou de l'exigüité de l'échantillon donc un bon échantillonnage de la tumeur s'implique.

I- Partie Immunohistochimique :

1-Interprétation des résultats d'observation microscopique après traitement par hématoxyline-éosine :

-**Tumeur N-Ras mutée** : des atypies cellulaires, des emboles vasculaires, des glandes tapissées de cellules tumorales et des travées qui signifient qui sont des critères de malignité.

-**Tumeur K-Ras mutée** : des atypies cellulaires, des emboles vasculaires, des glandes tapissées de cellules tumorales et des travées qui signifient qui sont des critères de malignité.

Parfois la tumeur prend naissance à partir d'un adénome cancérisé.

*Les tumeurs N-Ras muté et K-Ras muté n'ont pas des spécificités histologique ou clinique.

*Le manque d'observations d'autres manifestations cellulaires cancéreuses dans la tumeur N-Ras mutée qui est due au manque d'échantillons pour le cancer colorectal impliquant la mutation N-Ras à cause de sa faible fréquence par rapport à d'autres mutations impliquées dans le CCRm.

Des adénocarcinomes bien, moyennement, peu différenciés ou colloïdes qui signifient :

Les tumeurs qui contiennent des cellules cancéreuses bien différenciées ont tendance à se développer lentement, donc à être moins agressives.

Les cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées ont tendance à se développer rapidement, se propagent plus fréquemment et engendrent un pronostic plus sombre que les tumeurs dont les cellules cancéreuses sont bien différenciées

Les cellules cancéreuses modérément différenciées ont une apparence et un comportement qui se situent à mi-chemin entre ceux des cellules cancéreuses bien différenciées et ceux des cellules cancéreuses indifférenciées. La plupart des types de cancer sont formés de cellules cancéreuses modérément différenciées.

2- Interprétation des résultats d'observation microscopique après traitement immunologique des tumeurs N-Ras mutées par l'anticorps anti-N-Ras :

-**Tumeur mutation N-Ras +** : l'anticorps anti-N-Ras détecte spécifiquement la mutation N-Ras.

*Le test immunologique de la détection de la mutation N-Ras est difficilement réalisable. Le gène N-Ras code pour une protéine membranaire qui fait la navette entre l'appareil de Golgi et la membrane plasmique, c'est pour cela qu'on recherche l'expression au niveau du cytoplasme des cellules tumorales.

L'aspect histologique nous apporte des précisions sur la différenciation tumorale ou grading et le degré d'infiltration.

Le profil immunohistochimique des tumeurs colorectales nous précise la présence ou l'absence de la mutation N-Ras à l'aide de l'anticorps anti N-Ras .

Chapitre IV : Conclusion

Conclusion

La présence d'une mutation Ras est un marqueur prédictif de résistance aux traitements par anticorps anti EGFR.

Les mutations N-Ras impliquées dans le cancer colorectal sont rares par rapport aux mutations K-Ras qui sont plus fréquentes.

Les tumeurs (N-Ras et K-Ras muté) ne montrent pas de différences significatives cliniques et pathologiques caractéristiques. Donc les analyses suggèrent que les tumeurs RAS mutées représentent un groupe homogène de patients en termes de caractéristiques cliniques.

L'anticorps anti N-Ras est spécifique au N-Ras muté.

La caractérisation moléculaire est essentielle, non seulement pour l'identification des patients qui peuvent tirer détriment de l'anti-EGFR, mais aussi dans le but d'identifier des stratégies thérapeutiques pour ces patients par le biais d'essais conçus de manière appropriée.

En concluant, l'étude moléculaire vient compléter l'étude immunohistochimique et lui ajoute, sur l'aspect histologique et le grade, la possibilité de la détection de la mutation et sa localisation exacte, ce qui un facteur décisif du traitement anti-EGFR.

Perspectives :

A condition d'avoir des échantillons d'ADN de bonne qualité on peut par la technique moléculaire caractériser des sous types de cancer colorectal métastatique tout en détectant avec précision la mutation du gène impliqué.

A

- A.J Bilchik, E.K Abdalla, R.Adam, D ;Jaeck, JN; Vauthey, D. Mahvi,2012, Improving resectability of hepatic colorectal metastases: [Epidemiology of colorectal cancer liver metastases].
- Akao, Y.; Nakagawa, Y.; Hirata, I.; Iio, A.; Itoh, T.; Kojima, K.; Nakashima, R.; Kitade, Y.; Naoe, T, 2010 , Role of anti-oncomirs miR-143 and -145 in human colorectal tumors,*Cancer Gene*
- Ali BR, Nouvel I, Leung KF, Hume AN and Seabra MC , 2010 A novel statin-mediated "prenylation block-and-release" assay provides insight into the membrane targeting mechanisms of small GTPases. *Biochem Biophys Res Commun*.
- Boige V, Malka D, Taieb J, Pignon JP, Ducreux M , 2004, Colorectal cancer: prognostic molecular markers, *Gastroenterol Clin Biol*.
- A. Stevens, S. James Loxe, B. Young, 2004 *Anatomie Pathologique : Atlas de Wheather* 4 ème édition, Ed Mosby, : 46 - 153.
- A. Stevens, S. James, 2002, *Histologie humaine*, 3ème édition ; p203-210.

B

- Bos JL, 1989, Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* ;49:4682-9 .
- Bueno de Mesquita HB, 1993Lifetime and baseline alcohol intake and risk of colon and rectal cancersin the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC).

C

- Cancers colorectaux - Les tumeurs du côlon | Institut National Du Cancer
- Chen X, Halberg RB, Ehrhardt WM, Torrealba J, Dove WF, 2003 : Clusterin as a biomarker in murine and human intestinal neoplasia *Proc Natl Acad Sci USA*;100(16):9530-5
- CH. Manuelle, 2008 *Les 5 fonctions vitales du corps humain : Anatomie-physiopathologie*. Rueil-Malmaison (Hauts-de-Seine) : Lamarre, . ; 272p
- Colicelli J, 2004 Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Sci STKE* : RE13

D

- De Roock. 2010. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis.

- Dingzhi Wang and Raymond N, 2013 . DuBois, The Role of Anti-Inflammatory Drugs in Colorectal Cancer Annual Review of Medicine Vol. 64: 131-144 (Volume publication date January), Texas 77030-4009.
- Downward J, 2003 Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. Nat Rev Cancer 3: 11-22.

E

- F. Bibeau, F. Boissière, P. Laurent Puig, 2006 formes familiales des cancers colorectaux, techniques diagnostiques France.
- E. Braunwald, A.S. Fauci, Kasper DL, 2001, Harrison's Principles of Internal Medicine (15th edition), New York: McGraw-Hill Publishing;.
- Fearon ER, Vogelstein B. A, 1990 Jun genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1;61(5):759-67
- Forones NM, Tanaka MCEA and CA 19-9 as prognostic indexes in colorectal cancer Gastroenterology Division, Federal University of Sao Paulo.

G

- Gastroentérologie Clinique et Biologique. Vol 28, N° 1 janvier 2004 pp. 21-32.

H

- H. Guénard, B. Bioulac, M. R. Boisseau, F. Carré, J.D. Mainard, P. Devillier, J. Hanoune, A. Harf, J.R Lacour, Y. Lamour, R. Le Naour, B. Lévy, R. Marthan, F. Mion, M. Paillard, B. Swynghedauw, P. Varène, J.D Vincent., 2001, Physiologie humaine. 3ème Ed; 439 - 440.
- Hill MJ. A, 1989 etiology of colorectal cancer: current concepts. Baillière's Clinical Gastroentérologie; 3:567-592.
- Hammarstrom, 1999 The carcinoembryonic antigen (CEA) family : structure, suggested functions and expression in normal and malignant tissues. Semin. Cancer Biol; 9(2):67-81 33

I

- Institut national du cancer, mars 2010. Les traitements du cancer du côlon, collection Guides de référence Cancer info, INCa.

J

- J. Lamrani, 2008. Tumeur coliques en occlusion. Thèse de doctorat, Jean-Louis Merlin Les Biomarqueurs Moléculaires En Oncologie.
- Johannes L. Bos, Eric R. Fearon, Stanley R. Hamilton, Matty Verlaan-de Vries, Jacques H. van Boom, Alex J. van der Eb & Bert, 1998 Vogelstein Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers.
- Johnson, S.M.; Grosshans, H.; Shingara, J.; Byrom, M.; Jarvis, R.; Cheng, A.; Labourier, E.; Reinert, K.L.; Brown, D.; Slack, F.J, 2005, RAS is regulated by the let-7 MicroRNA family. *Cell*

K

- Karen Leroy, Patricia de Cremoux ; John Libbey Eurotext, 3 juil. 2014, Anomalies moléculaires des cancers: Ciblage thérapeutique -285 pages
- Kristen K. Ciombor, Christina Wu, and Richard M. January 2015, Goldberg Recent Therapeutic Advances in the Treatment of colorectal cancer Annual Review of Medicine Vol. 66: 83-95 (Volume publication date The Ohio State University Comprehensive Cancer Center, Columbus, Ohio 43210;

L

- Le petit LAROUSSE de la médecine.
- Levine PH ; Diagn Cytopathol. 2006 Mar; 34(3):191-5 .
- Lièvre, F. Peschaud, E. Mitry, 27 June 2002, Nature 417, 949-954 50 Page(s) : 77-83 Chimiothérapie (néo)adjuvante des métastases hépatiques de cancer colorectal opérées Volume 19, numéro 2,
- Lockhart et Berlin, The epidermal growth factor receptor as a target for colorectal cancer therapy.
- Luo J, Emanuele MJ, Li D, Creighton CJ, Schlabach MR, Westbrook TF, Wong KK and Elledge SJ, 2009 A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell* 137: 835-848

M

- M. Abid, 2012, Cancers des colons, Conférence pour résidents de 4^{ème} année de chirurgie générale
- Marta Schirripa¹, Chiara Cremolini¹, Fotios Loupakis¹, Manfredi Morvillo¹, Francesca Bergamo², Federica Zoratto¹, 2014, Role of NRAS mutations as prognostic and predictive markers in metastatic colorectal cancer, *International Journal of Cancer*.

- Mathilde Brasseur RAS : Pour qui ? Pourquoi ? Comment ? Volume 34, numéro 1, Mars 2015
Service d'hépatogastro-entérologie & cancérologie digestive, Centre hospitalier de Soissons,
France Page(s) : 45-8 2015.
- Michael B. Potter, date March 2013, Strategies and Resources to
Address Colorectal Cancer Screening Rates and Disparities in the United States and
Globally Annual Review of Public Health Vol. 34: 413-429 (Volume publication) First published
online as a Review in Advance on January 7, 2013 Department of Family and Community
Medicine, University of California, San Francisco, California
- M. MONGE , J-P Bergerat Heures de France, 1 janv. 1996 - 495 pages 30
- M. Sekal, , 2012 Evaluation anatomopathologique et biopathologique des cancers colorectaux au
CHU Hassan ii de Fes: résultats préliminaires de l'étude colorec.fez. Thèse pour l'obtention du
diplôme de spécialité en médecine

P

- Pellegrini P, Contasta I, Berghella AM, Gargano E, Mammarella C, Adorno D, 2000. Simultaneous
measurement of soluble carcinoembryonic antigen and the tissue inhibitor of metalloproteinase
TIMP1 serum levels for use as markers of pre-invasive to invasive colorectal cancer Cancer
Immunol Immunother; 49(7):388-94 39
- Pierre Dubé, MD et Julie Beaudet, MD Serge N, 62 ans, 1999, cancer colorectal.
- Potter JD, Slattery ML, Bostick RM, Gapstur SM; 1993, Colon cancer : a review of the
epidemiology. Epidemiology; 15(2):499-545

R

- Ransohoff DF, Lang CA, 1991, Screening for colorectal cancer. New England Journal of
Medicine; 325:37-41.
- Rapport n 19 , 2014, des journées Registre de cancer d'Oran.
- Rosine Guimbaud , Anne-Pascale Laurenty , Delphine Bonnet , Janick Selves , Mars 2015,
Oncogénétique des cancers digestifs : pourquoi et comment faire mieux ? Volume 22 n°3.
- Rueil-Malmaison (Hauts-de-Seine) , 2008, Lamarre. ; 272p.

S

- SEDKAOUI_Cherifa , 2015, chimiothérapie et la thérapie ciblée dans le cancer colorectal
métastatique.
- Shankaran V, Obel J, Benson III AB, 2010 , Predicting response to EGFR inhibitors in metastatic
colorectal cancer: current practice and future directions. The Oncologist 15:157-67)

- S. Nguyen, R. Bourouina, 2008, Manuel d'anatomie et de physiologie, 4ème édition, Edition LAMARRE, 44.45.46.
- société canadienne du cancer, 2016.
- société de recherche sur le cancer France, Springer, 1 août 2014 - 175 pages Etat des lieux des tests RAS chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique en 2014
- Sylviane Olschwan, Catherine Bonaïti, Josué Feingold, Thierry Frébourg, Sophie Grandjouan, Christine Lasset, Pierre Laurent-Puig, Fabrice Lecuru, Bertrand Millat, Hagay Sobol, Gilles Thomas, François Eisinger, Avril 2004, Identification et prise en charge du syndrome HNPCC (héréditaire non polyposis colon cancer), Prédiposition héréditaire aux cancers du côlon du rectum et de l'utérus volume 91, n°4

V

- Valérie Boige David Malka, Julien Taïeb , Jean-Pierre Pignon , Michel Ducreux Cancer colorectal : altérations moléculaires pronostiques.
- Vogelstein, B.; Fearon, E.R.; Hamilton, S.R.; Kern, S.E.; Preisinger, A.C.; Leppert, M.; Nakamura, Y.; White, R.; Smits, A.M.; Bos, J.L. 1988 , Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N. Engl. J. Med.*, 319, 525–532.

W

- Wang WS¹, Lin JK, Chiou TJ, Liu JH, Fan FS, Yen CC, Lin TC, Jiang JK, Yang SH, Wang HS, Chen PM. CA19-9 as the most significant prognostic indicator of metastatic colorectal cancer.
- World Gastroenterology Organisation Global Guidelines juin 2009.

Y

- Yves Leclerc, MD et Serge Dubé, MD). Marcelle T, 62 ans, 2003, cancer colorectal

Annexe 1

Biologie des métastases hépatiques

Les cellules tumorales malignes sont caractérisées par une instabilité de leur génome. Les anomalies chromosomiques, qu'il s'agisse de translocations, de duplications, d'amplifications ou de délétions confèrent aux cellules cancéreuses la possibilité de donner naissance à des cellules différentes de la cellule mère permettant ainsi l'émergence de clones cellulaires nouveaux dont certains auront des potentialités métastatiques. L'acquisition de ces potentialités métastatiques peut être la conséquence d'une dérégulation dans l'expression de certains proto-oncogènes et/ou de gènes suppresseurs du phénotype métastatique comme notamment nm23 ou WDNM 1.

La localisation préférentiellement hépatique des métastases des cancers colo-rectaux est expliquée par deux facteurs vraisemblablement intriqués : le drainage portal de l'organe cible et des conditions locales favorisant le développement in-situ des cellules cancéreuses. La première étape dite d'échappement au cours de laquelle les cellules métastatiques quittent l'organe cible par voie lymphatique ou sanguine font intervenir des molécules d'adhésion cellulaires, des phénomènes de digestion enzymatique permettant l'effraction des membranes basales et des facteurs intervenant dans la mobilité cellulaire comme la laminine ou la fibronectine. Lors de la phase circulante, les cellules métastatiques subissent des agressions mécaniques (50% meurent dans les 4 heures et 99,5% dans les 24 heures) et immunologiques, essentiellement liées aux interactions avec les cellules NK. Arrivées dans le foie les cellules métastatiques s'implantent préférentiellement au contact des cellules endothéliales portales dont l'apport en éléments nutritifs est important, grâce à des structures d'attachement comme la laminine, la fibronectine ou des intégrines. La prolifération est alors sous la dépendance de facteurs d'angiogenèse (TGF β angiogénine, BFGF..) et de facteurs de croissance dont certains sont autocrines. Elle nécessite l'échappement aux systèmes de surveillance et de défense de l'hôte. Malgré bien des inconnues, la biologie des métastases hépatiques laisse entrevoir de nombreuses étapes accessibles à des thérapeutiques pouvant intervenir dans les tous premiers stades. (**Allen-Mersh** *et al*, 1994).

Annexe 2

Les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT

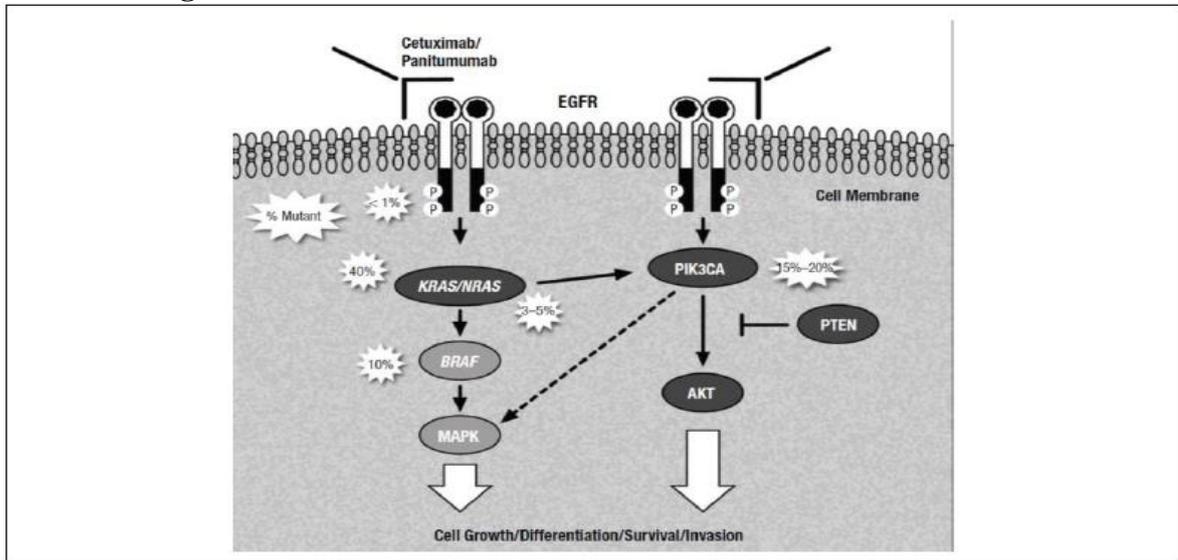


Figure: Fréquences mutationnelles des gènes impliqués dans les voies de signalisation RAS/RAF/MAPK et PI3K/AKT et qui affectent la réponse aux anti-EGFR (De Mattos-Arruda *et al.* 2011.)

Annexe 3

Famille protéines RAS : 3 isoformes exprimés de façon ubiquitaire (K-Ras, H-Ras, N-Ras)

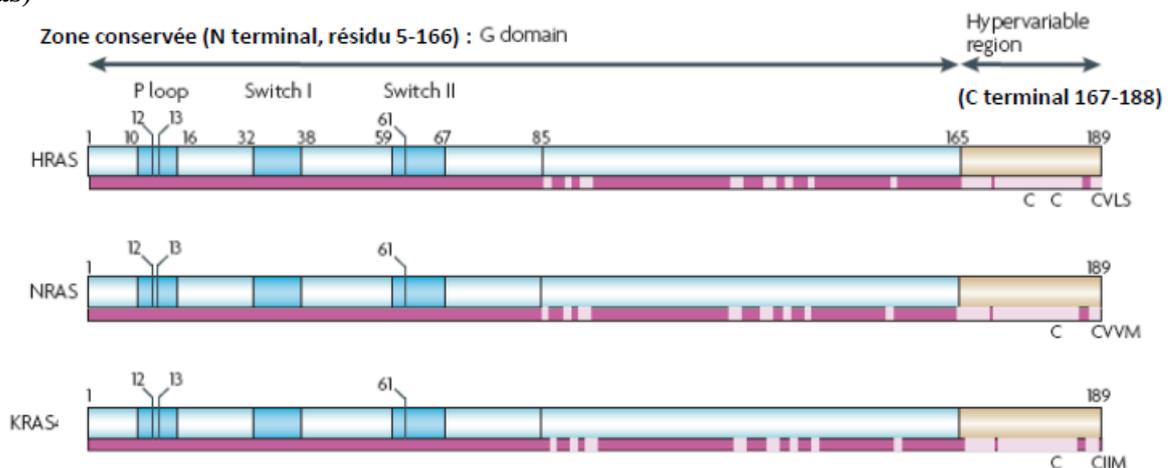


Figure : Famille protéines RAS .

Annexe 4**La Séquence du gène N-Ras (GenBank Graphics)**

```
>gi|60548029|gb|AY941100.1| Homo sapiens NRAS mRNA, 3' UTR, partial
sequence
GAGTTTTCCAAGTATGTTCTAAGCACAGAAGTTTCTAAATGGGGCCAAAATTCAGACTTGAGTATGTTCT
TTGAATACCTTAAGAAGTTACAATTAGCCGGGCATGGTGGCCCGTGCCTGTAGTCCCAGCTACTTGAGAG
GCTGAGGCAGGAGAATCACTTCAACCCAGGAGGTGGAGGTTACAGTGAGCAGAGATCGTGCCACTGCACT
CCAGCCTGGGTGACAAGAGAGACTTGTCTCCAAAAAAAAGTTACACCTAGGTGTGAATTTTGGCACAAAG
GAGTGACAACTTATAGTTAAAAGCTGAATAACTTCAGTGTGGTATAAAAACGTGGTTTTTTAGGCTATGTT
TGTGATTGCTGAAAAGAATTCTAGTTTACCTCAAATCCTTCTCTTTCCCAAATTAAGTGCCTGGCCAG
CTGTCATAAATTACATATTCCTTTTGGTTTTTTTTAAAGGTTACATGTTCAAGAGTGAAAATAAGATGTTCT
TGCTGAAGGCTACCATGCCGGATCTGTAAATGAACCTGTAAATGCTGTATTTGCTCCAACGGCTTACT
ATAGAATGTTACTTAATACAATATCATACTTATTACAATTTTTACTATAGGAGTGAATAGGTAATAATTA
ATCTCTATTTTAGTGGGCCATGTTTAGTCTTTCACCATCCTTTAAACTGCTGTGAATTTTTTTGTCATG
ACCTGAAAGCAAGGATAGAGAAACACTTTAGAGATATGTGGGGTTTTTTTTACCATTCCAGAGCTTGTGAG
CATAATCATATTTGCTTTATATTTATAGTCATGAACTCCTAAGTTGGCAGCTACAACCAAGAACCAAAAA
ATGGTGCCTTCTGCTTCTTGTAAATTCATCTCTGCTAATAAATTATAAGAAGCAAGGAAAATTAGGGAAAA
TATTTTATTTGGATGGTTTCTATAAACAAGGGACTATAATCCTTGTACATTATTTTTTCATCTTTGCTGTT
TCTTTGAGCAGTCTAATGTGCCNCNCAATTATCTAAGGTATTTGTTTTCTATAAGAATTGTTTTAAAAGT
ATTCTTGTNCCAGAGTAGTTGTATTATATTTCAAACGTAAGATGATTTTTAAAAGCCTGAGTACTGNC
CTAAGATGGAATTGTATGAACTCTGCTCTGGAGGGAGGGAGGATGTCCGTGGAAGTTGTAAGACTTTTA
TTTTTTTTGTGCCATCAAAATATAGGTAAAAATAATTGTGCAATTCTGCTGTTTAAACAGGAACATTTGGCC
TCCTTGGCCCTAAATGGAAGGGCCGATATTTTAAAGTTGATTATTTTATTGTAAATTAATCCANCCTAGTT
CTTTTTAATTTGGTTGAATGTTTTTCTTGTAAATGATGTTTAAAAAATAAAAACTGGAAGTTCTTGGC
TTAAAAA
```

Annexe 5

Tableau : Les mutations *NRAS* et *KRAS*

ÉTUDES	CCR	MÉTHODE	MUTATIONS KRAS N (%)		MUTATIONS NRAS N(%)		
			CODONS 12/13	AUTRES CODONS	GLOBALE	CODONS	NOUVEL AA (N)**
Gasparini et al., 2014	N = 94 <i>KRAS</i> G12-13 wt (Sanger)	PSQ	12/94 (13)	Q61 : 5 (5) A146 : 5 (5) K117 : 0 (0)	9/94 (9,6)	G12/13 : 3 (3) Q61 : 6 (6)	?
Di Bartolomeo et al., 2014	N = 28	Sanger	11/23 (48)	0/23 (0)	1/22 (4,5)	G12 : 1 (4,5)	D(1)
Douillard et al., 2013	N = 641 <i>KRAS</i> G12-13 wt	HRM + Sanger	0/641 (0)	Q61 : 24/638 (3,8) A146 : 28/620 (4,5) K117 : 8/620 (1,3)	48/641 (7,5)	G12 : 17/637 (2,7) G13 : 5/637 (0,8) Q61 : 26/636 (4,1)	D(10) V(3) C(3) A(1) R(5) K(14) R(7) H(3) L(2)
Peeters et al., 2013	N = 288	PCR ASO + NGS	117/280 (42)	Q61 : 7/284 (2,5)	14/282 (5,0)	G12 : 7 (2,5) G13 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,1)	D(4) S(2) C(1) V(1) K(3) L(2) H(1)
Shen et al., 2013	N = 676	Sanger	219/674 (32)	Q61 : 14/672 (2,1)	26/621 (4,2)	G12 : 8/630 (1,3) G13 : 3/630 (0,5) Q61 : 13/643 (2)	D(5) V(3) D(2) R(1) R(8) L(2) H(2) K(1)
Vaughn et al., 2011	N = 2 121	PSQ	900/2121 (42,4)	Q61 : 19/513 (3,7) A146 : 17/513 (3,3)	26/513 (5,1)	G12 : 9 (1,8) G13 : 1 (0,2) Q61 : 16 (3,1)	D(6) C(2) S(1) D(1) K(8) R(5) L(3)
Beadling et al., 2011	N = 236	Mass Array	78/236 (33 %)	A59 : 1 (0,4) Q61 : 6 (2,5)	8/236 (3,4)	G12 : 4 (1,7) G13 : 1 (0,4) Q61 : 3 (1,3)	D(3) R(1) R(1) K(1) R(2)
Janku et al., 2011	N = 105	PSQ	49/97 (51)	?	2/31 (6)	?	?
De Roock et al., 2010	N = 747	Mass Array	271/747* (36)	Q61 : 16/747 (2,1) A146 : 15/747 (2,0)	17/644 (2,6)	G12 : 4 (0,6) G13 : 1 (0,2) Q61 : 12 (1,8)	D(1) C(2) S(1) R(1) K(4) R(4) L(3) H(1)

Abréviations : AA : acide aminé; ASO : allèle spécifique PCR; CCR : cancer colorectal; HRM : high-resolution melting; N : nombre; PCR : polymérase chain reaction; PSQ : pyroséquençage; WT : wild type.

*Les fréquences spécifiques aux codons diffèrent de la fréquence globale car 4 échantillons portaient des mutations multiples : 1X(G12V+G12S), 1X(A146T+Q61L) et 2 p.G12V+p.A146T et 1 échantillon portait une mutation sur le codon 59.

**Les mutations faux-sens soulignées ne sont pas couvertes par la trousse d'EntroGen

Annexe 6

Détection de mutations dans les gènes KRAS et NRAS dans les cancers colorectaux		CODE ESSAI: GEN_BMH_KRAS ET GEN_BMH_NRAS
Test Accrédité	ISO 15189	
Réalisable en urgence	non	
Formulaire de demande	MQ.A11.04 - Détections d'anomalies génétiques et épigénétiques (KRAS-EGFR-MGMT-GIST-Autre)	
PRÉ-ANALYTIQUE		
Type d'échantillons	Tissus fixés au formol et enrobés à la paraffine	
Autre type d'échantillons	Cancer colorectal. Tumeur primaire ou métastase ; résection chirurgicale ou biopsie.	
Matériels	Flacons de formol	
Conditions de collecte, traitement, conservation et transport	<ul style="list-style-type: none"> ■ Le prélèvement doit être fixé au formol 10% dans l'heure qui suit le prélèvement et pour une durée comprise entre 6 et 48 heures, à température ordinaire du local (ne pas congeler !). ■ Il est demandé de noter ces durées sur le formulaire de demande. ■ Tout autre type de fixateur est interdit. ■ Le formol doit être en excès, et doit au minimum couvrir complètement le prélèvement. 	
Délai maximum du préanalytique	2 jours	
ANALYTIQUE		
Méthode et appareil	Recherche de mutations par pyroséquençage	
Kit	Protocole home-made.	
Règle d'application	<p>Une analyse de première intention combine l'analyse des mutations des gènes KRAS et NRAS les plus fréquentes. Les positions testées couvrent plus de 98% des mutations décrites dans les cancers colorectaux.</p> <p>A la demande du clinicien, les positions restantes peuvent être testées en deuxième intention.</p>	
POST-ANALYTIQUE		
Expression du Résultat	La séquence est comparée aux bases de données publiques et les variants rapportés par comparaison aux données disponibles dans la base "COSMIC".	
Délais (sauf le week-end)	5 jours (moy) - 8 jours (max)	
Fréquence de réalisation de l'analyse	hebdomadaire	

Annexe 7

Séquençage

. Préparation de la séquence cible :

Ces trois méthodes utilisent des bases communes : le brin d'ADN à séquencer est extrait, amplifié, puis dénaturé (on sépare le double brin d'ADN en deux), et on utilise la polymérase, une enzyme dont le rôle est de dupliquer un élément.

L'amplification, c'est à dire la répllication de la séquence, est réalisée à partir d'un technique appelée PCR ou "Polymerase chain reaction" (réaction de polymérisation en chaîne). Cela

permet de dupliquer à plusieurs millions d'exemplaires un fragment d'ADN grâce à l'ADN polymérase. Cette technique utilise des cycles de trois phases au cours desquelles chaque double brin est dénaturé (cf. infra) et séparé de sa polymérase (qui est maintenue par des protéines). Une variation spécifique de la température permet aux nombreuses amorces présentes en suspension dans la solution de s'hybrider aux simples brins sans que ceux-ci ne s'hybrident entre eux (ce qui rendrait impossible l'accrochage de l'amorce). Enfin, la polymérase assimile progressivement les nucléotides néoformés libres ajoutés également dans la solution jusqu'à l'obtention de doubles brins complets ; c'est l'élongation. Le cycle, d'une durée maximum de quatre minutes, est répété en boucles de nombreuses fois (entre 35 et 45 par PCR) et double le nombre de brins à chaque fois (suite logique de puissance 2).

La dénaturation (ou déshybridation), c'est à dire la séparation des deux brins composant la molécule d'ADN, est obtenue par élévation de température ce qui a pour effet de fragiliser les liaisons hydrogènes reliant les bases azotées.

3. Méthode de Sanger :

Dans quatre tubes à essais distincts, on introduit en parallèle des brins d'ADN cibles dénaturés en grand nombre, des amorces (sur laquelle se fixe la polymérase), la polymérase elle-même et des nucléotides normaux (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

On ajoute ensuite un nucléotide modifié ou didéshydro-nucléotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) de type différent dans chaque tube. Ceux-ci sont identiques aux nucléobases classiques à la différence qu'il leur manque un groupement-HO nécessaire à l'assimilation du nucléotide suivant par la polymérase (liaison phospho-diester). La quantité de nucléotides modifiés incorporés dans chaque tube est bien inférieure au nombre de nucléotides classiques afin de ne pas stopper l'assimilation trop tôt. Il faut qu'il y ait moins de ddNTP que de dNTP pour que dans le tube, on ait toutes les molécules possibles qui soient synthétisées.

Méthode de Sanger :

Dans quatre tubes à essais distincts, on introduit en parallèle des brins d'ADN cibles dénaturés en grand nombre, des amorces (sur laquelle se fixe la polymérase), la polymérase elle-même et des nucléotides normaux (dATP, dTTP, dCTP, dGTP).

On ajoute ensuite un nucléotide modifié ou didéshydro-nucléotide (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP) de type différent dans chaque tube. Ceux-ci sont identiques aux nucléobases classiques à la différence qu'il leur manque un groupement-HO nécessaire à l'assimilation du nucléotide suivant par la polymérase (liaison phospho-diester). La quantité de nucléotides modifiés incorporés dans chaque tube est bien inférieure au nombre de nucléotides classiques

afin de ne pas stopper l'assimilation trop tôt. Il faut qu'il y ait moins de ddNTP que de dNTP pour que dans le tube, on ait toutes les molécules possibles qui soient synthétisées.

Ainsi, lors de l'assimilation d'un de ces nucléotides par la polymérase, la réplication du brin est stoppée. La quantité de nucléotides modifiés incorporés dans chaque tube étant inférieure au nombre de nucléotides classiques, statistiquement. Une fois les réactions terminées, on obtient dans chacun des quatre tubes des doubles brins d'ADN de tailles variables, en fonction de leur arrêt par les nucléotides modifiés.

Les "réactions de séquence" (avec ddNTP) sont rapides (moins de 15 minutes). Le point long du protocole est en fait la lecture du résultat. On place alors le contenu des tubes dans quatre puits distincts (correspondant aux quatre nucléotides possibles) de gel d'électrophorèse.

L'ADN étant chargée négativement, plus la taille de la séquence est importante et plus la molécule migre vers le pôle positif du gel d'électrophorèse. Après leurs migrations, dans ce gel on peut aisément retrouver l'ordre des nucléotides de la séquence concernée. Une simple lecture horizontale de ce gel (une fois révélé) permet de connaître l'ordre des bases de la séquence. Afin de voir les fragments d'ADN sur le gel d'électrophorèse, on utilise la plupart du temps des marqueurs fluorescents. On peut aussi marquer radioactivement les nucléotides puis les exposer à un film photographique: des bandes sombres apparaissent là où se trouvait de l'ADN sur le chromatogramme ; c'est l'autoradiographie. (**belhoucine**).

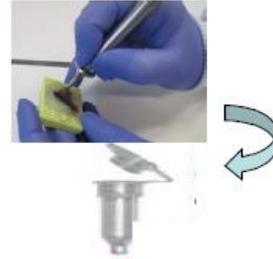
Annexe 8

Extraction d'ADN

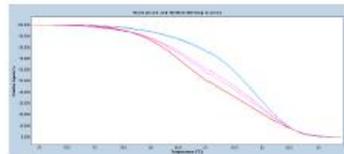
L'ADN a été extrait à de l'échantillon à l'étude en utilisant le Kit de tissu Qiagen QIAmp DNA FFPE. un Re-séquençage ciblé de l'ADN (TruSeqCustomAmplicon, Illumina) a été utilisé pour la détection de la mutation des exons 2,3 et 4 des gènes K-Ras et N-Ras. Les séquençages ont été réalisés en utilisant la nouvelle génération de plate forme de séquençage MiSeq (Illumina).

Génotypage KRAS exon 2

1- Extraction ADN



2- détection d'un mutant par HRM



3- Identification de la mutation par sondes Taqman



Génotypage KRAS, NRAS exon 2,3,4

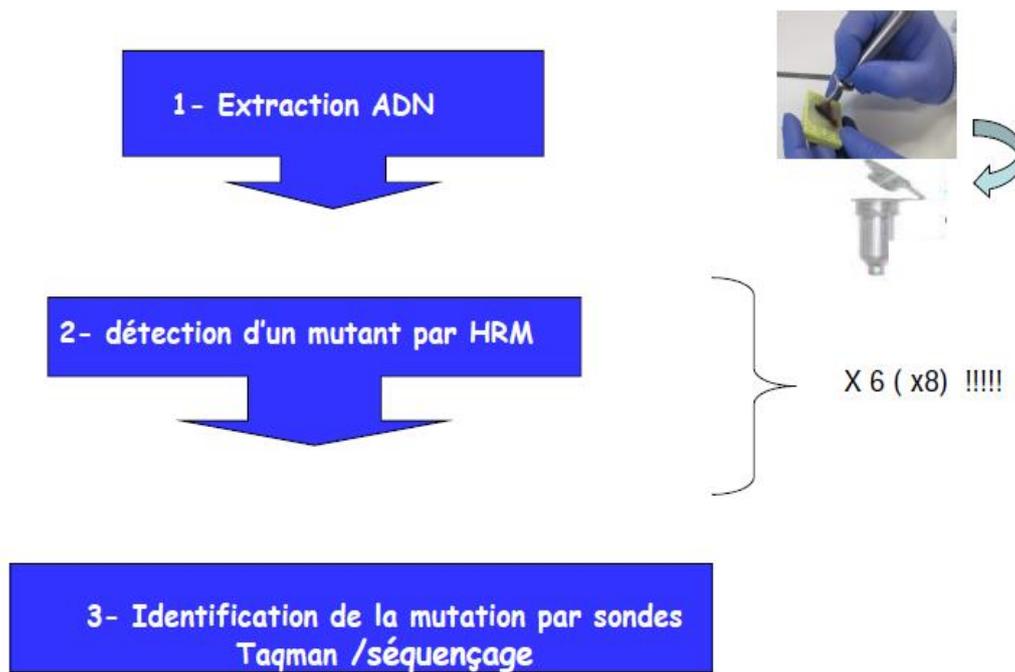


Figure : Extraction d'ADN

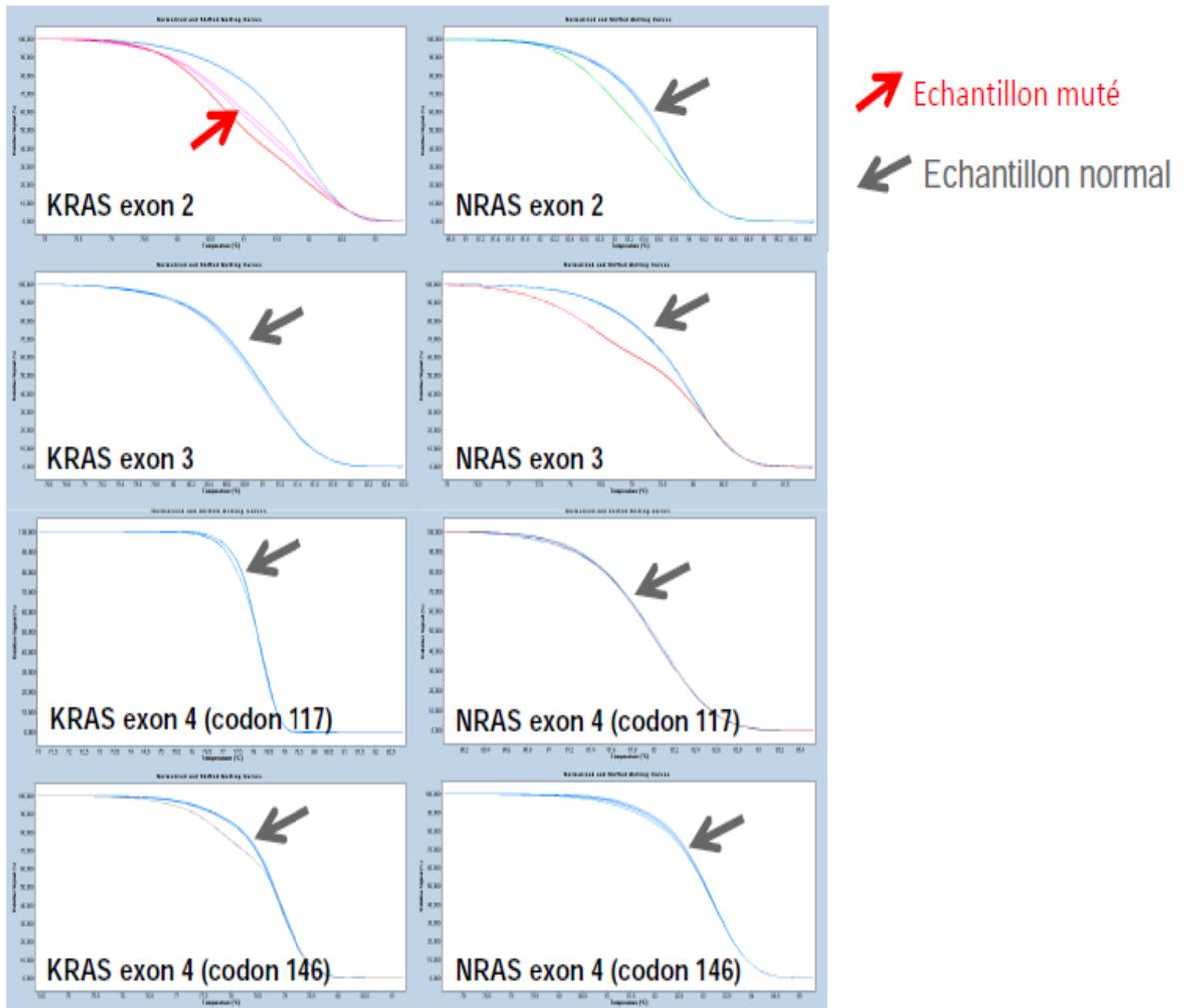


Figure : la détection de la mutation K-Ras et N-Ras par la technique taqMan

Annexe 9

Echantillon : Pas de mutation K-Ras ou N-Ras

ABDELKADER DJOUAH	<i>Page 1 of 3</i>
 GENEKOR <i>Committed to Biotechnological Innovation</i>	 Clinical Testing Cert. No 822-2
Sample Information	
Rapport D'Analyse Moléculaire	
Directeur Scientifique: Dr. George Nasioulas	
Mutations des gènes K-RAS et N-RAS	
<p>Les gènes KRAS et NRAS sont membres de la famille des gènes RAS. Les mutations somatiques des gènes KRAS et NRAS ont été trouvées dans une variété de tumeurs malignes humaines.</p> <p>L' ADN a été extrait de l' échantillon à l' étude en utilisant le kit de tissu Qiagen QIAmp DNA FFPE. Un Re-séquençage ciblé de l' ADN (TruSeq Custom Amplicon, Illumina) a été utilisé pour la détection de mutations dans les exons 2,3 et 4 des gènes KRAS et NRAS. Le séquençage a été réalisé en utilisant la nouvelle génération suivante de plate-forme de séquençage MiSeq (Illumina).</p>	
Résultats pour l'échantillon analysé:	
L'échantillon analysé ne porte pas une mutation dans les exons 2,3 et 4 des oncogènes K-RAS et N-RAS.	

Echantillon : Mutation K-Ras

FATIMA GUARBA	Page 1 of 3
	GENEKOR <i>Committed to Biotechnological Innovation</i>
Sample Information	
<div style="background-color: #cccccc; height: 80px;"></div>	
Rapport D'Analyse Moléculaire	
Directeur Scientifique: Dr. George Nasioulas	
Mutations des gènes K-RAS et N-RAS	
<p>Les gènes KRAS et NRAS sont membres de la famille des gènes RAS. Les mutations somatiques des gènes KRAS et NRAS ont été trouvées dans une variété de tumeurs malignes humaines.</p> <p>L'ADN a été extrait de l'échantillon à l'étude en utilisant le kit de tissu Qiagen QIAmp DNA FFPE. Un Re-séquençage ciblé de l'ADN (TruSeq Custom Amplicon, Illumina) a été utilisé pour la détection de mutations dans les exons 2,3 et 4 des gènes KRAS et NRAS. Le séquençage a été réalisé en utilisant la nouvelle génération suivante de plate-forme de séquençage MiSeq (Illumina).</p>	
Résultats pour l'échantillon analysé:	
<div style="background-color: #cccccc; padding: 5px;">L'échantillon analysé porte une mutation dans l'exon 2 de l'oncogène K-RAS.</div>	

Echantillon : cas non interprétable

Date de prescription : 22 janvier 2016

Matériel transmis : Bloc tumoral inclus en paraffine / Fixateur utilisé : Formol

Nombre de blocs : 1

Identification du/des blocs : H11076/15

Nature du prélèvement : Biopsie

Localisation : colique

Stade : tumeur primitive

Type histologique : Adénocarcinome moyennement différencié

% de cellules tumorales : 30 %

Estimation du % de cellules tumorales présentes dans la zone sélectionnée pour macro-dissection, validée par le Dr Juliette HAUDEBOURG, Pathologiste au Centre Antoine-Lacassagne.

Date de réception en Oncopharmacologie : 26/01/2016

N° ADN : M-251

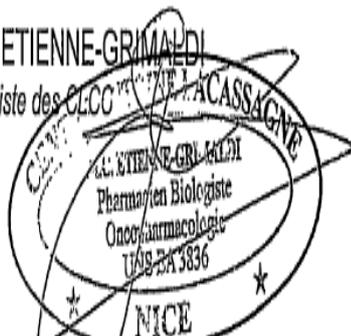
RESULTAT :

Résultat ininterprétable en raison de la mauvaise qualité de l'ADN (absence d'amplification). La réception d'un nouveau bloc tumoral est nécessaire.

Nice, le 28/01/2016

M.C. ETIENNE-GRIMARDI

Biologiste des CLCC



G. MILANO

Responsable d'Unité d'Oncopharmacologie

Biologiste des CLCC

Annexe 10

Tableau : représentation des résultats de séquençage.

Pa tie nt	Caracté ristiques	Localisation de la mutation	Observation
1	Homme 66 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras.	-Biopsie. Côlon sigmoïde (côlon gauche) - Localisation droite. carcinose péritonéale -Polyadenome vilieux cancérisé rectosegmoidien - Métastase hépatique - Colloïde muqueux -Biopsie pérotinienne
2	Femme 59 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras.	- Pièce de rectum (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 17*4cm - Adénocarcinome moyennement différencié. - Classé PT3N1CMx
3	Homme 64 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène N-Ras	-Pièce de colectomie segmentaire (côlon gauche). -Localisation gauche -Taille : 7cm -Adénocarcinomes bien différencie liberkhunien -Classé PT3N1aMx
4	Femme 55 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	- Pièce du rectum (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 20*8cm

			-Adénocarcinome bien différencié Prenant naissance à partir d'un adénome tubulo vilieux. -Composante de colloïde muqueux - Classé PT3N2b.
5	Homme 60 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	- Pièce rectale (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 18 cm - Adénocarcinome invasif colloïde -Classé YPT3N1bMx
6	Femme 63 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras.	- Pièce (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 2 segments coliques de 25 et 45 cm -Adénocarcinome moyennement différencié -Classé pT3N1cMxR0.
7	Femme 66 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras.	Non déterminé
8	Homme 59ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	-Siège non déterminée - Adénocarcinome invasif moyennement différencié
9	Femme 51ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	- Pièce recto-sigmoïde ectomie (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 3*1 - Adénocarcinome mucineux -Colloïde muqueux - Classé PT3N1bMx
10	Homme 46 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	- Biopsie (côlon droit) -Localisation droite -taille : 2 mm à 5 mm

			-Carcinome à cellules indépendantes du siège colique
11	Homme 60 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	- Pièce de colectomie (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 40*8cm -Adénocarcinome colique bien différencié -Le Foi Est métastatique -Carcinose péritoniale - Classé PT4An0M1
12	Femme 47 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	- Pièce (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 4cm -Adénocarcinome bien différencié - Classé PT4BN0Ma
13	Homme	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	- Pièce (Colon droit) -Localisation droite -Taille : 27cm-caecale 18 cm -Adénocarcinome peu à moyennement différencié - Classé PT3N2aMx
14	Homme 43 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	Non déterminé
15	Homme 53 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	- Pièce (côlon gauche) -Localisation gauche -taille : 6cm - Adénocarcinome moyennement différencié - Métastase hépatique - Classé PT3N1cMxRo
16	Femme	L'échantillon analysé porte une	-Pièce côlon gauche

	71 ans	mutation dans l'oncogène K-Ras	-Localisation gauche -Taille : 17*3cm -Adénocarcinome bien différencié -Classé PT3N2aM1
17	Femme 46 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	-Siège non déterminée -Adénocarcinome. - Métastatique cérébrale
18	Femme 91 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	- Pièce de colectomie (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 3.5cm -Adénocarcinome bien différencié. -Classé PT4N2aMx
19	Femme 41 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'oncogène K-Ras	-Siège non déterminée -Adénocarcinome invasif moyennement différencié
20	Femme 35 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	-Pièce recto-colique (colon gauche) -Localisation gauche -Taille : 16*5 -Adénocarcinome bien différencié - Classé YPT3N0Mx
21	Homme 77	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	-Pièce (Côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 2.5cm -Adénocarcinome bien différencié -Colectomie palliative -Carcinose pérotinienne - Métastase hépatique - Classé PT3n2aMx
22	Homme	Pas de mutation dans les exons 2 ,3	-Siège non déterminée

	31 ans	et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	-Adénocarcinome bien différencié
23	Femme 49 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	- Pièce (côlon gauche) -Localisation gauche -Taille : 2 foyer 7.5cm et 5.5 -Carcinome colloïde muqueux -Avec métastase - Classé PT3N1bMx
24	Femme 60 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans le codon 2 de l'oncogène K- Ras	-Pièce amputation à 2 foyers Côlon gauche -Localisation gauche -Taille : 7.5 et 5.5cm - Colloïde muqueux -Classée pT3N1aMx
25	Homme 69 ans	L'échantillon analysé porte une mutation dans l'exon 2 de l'oncogène K- Ras	Non déterminé
26	Homme	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	-Pièce (côlon droit) -Localisation droite -Taille : 14cm -Adénocarcinome bien différencié -Classé PT3N0MX
27	Femme 66 ans	Pas de mutation dans oncogènes K-Ras et N-Ras	-Siège non déterminée - Adénocarcinome peu différencié -Métastase hépatique -Classé
28	Femme 77 ans	Pas de mutation dans les exons 2 ,3 et 4 des oncogènes K-Ras et N-Ras	-Adénocarcinome moyennement différencie
29	Femme	L'échantillon analysé porte une	Non déterminé.

		mutation dans l'exon 2 de l'oncogène K- Ras	
30	Femme	L'échantillon analysé porte une mutation dans de l'oncogène K-Ras	-Pièce de sigmoïde ectomie côlon gauche -Localisation gauche -taille : 17*4.5 -Adénocarcinome invasif bien différencié -Métastase hépatique -Classé PT3N0Mx
31	Femme 66 ans	Ininterprétable en raison de la mauvaise qualité de l'ADN	Siège non déterminé Adénocarcinome moyennement différencié

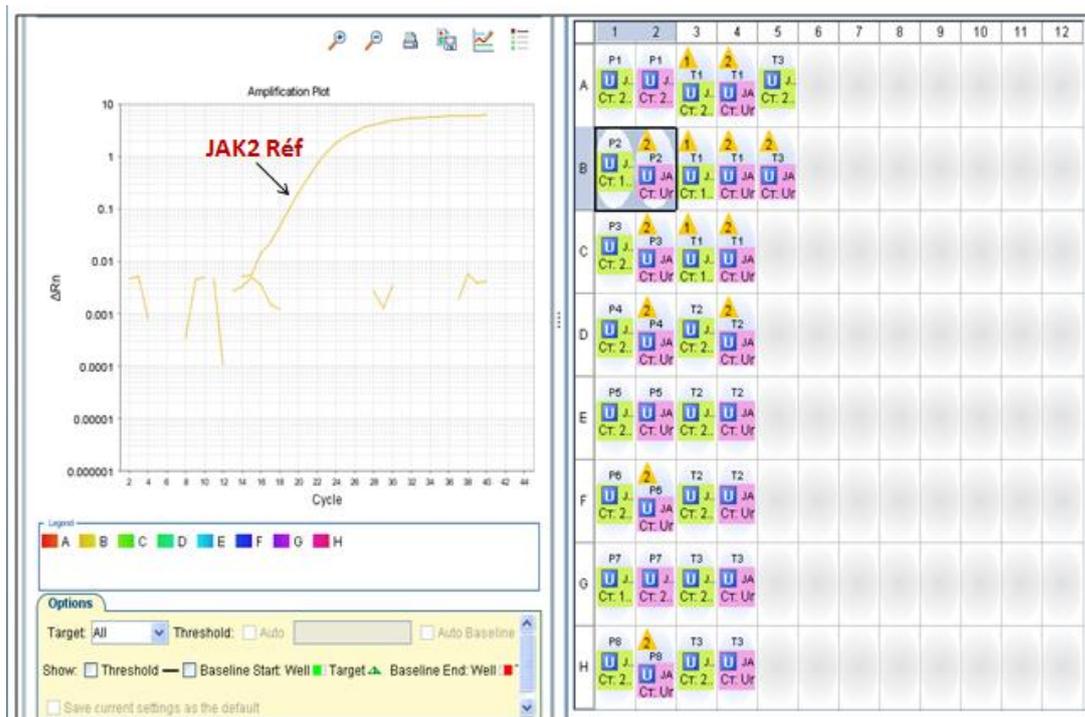
Annexe 11

Les étapes de la macrotomie

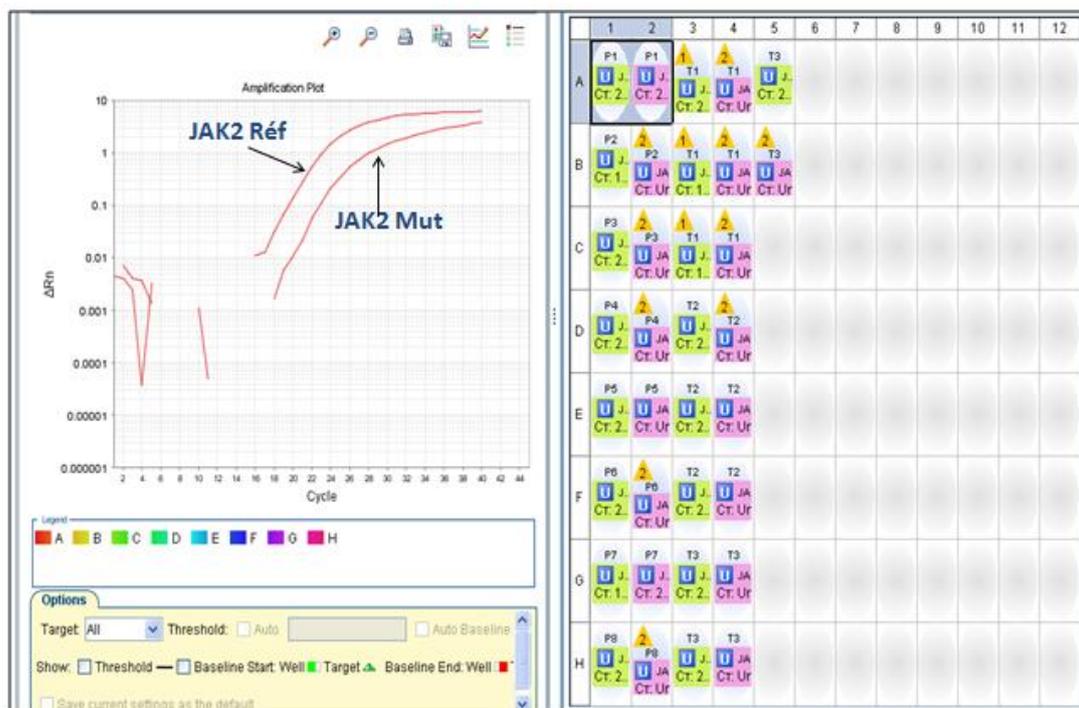




Annexes



Annexes 1

Fiche de renseignements médicale

Annexe 2

Figure - Schéma représentatif de l'augmentation de la fluorescence de l'allèle non muté JAK2 par PCR en temps réel (Taqman).

Figure- Schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel.

Figure : schéma représentant résultat positif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel

Figure : schéma représentant résultat négatif de la détection de la mutation JAK2 v617f par PCR en temps réel

