

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la recherche Scientifique

Université SAAD DAHLEB BLIDA 1

Faculté Des Science de nature et de la vie

Département de biologie et physiologie cellulaire



MÉMOIRE DE FIN D'ETUDES

En vue d'obtention du Diplôme de MASTER en biologie

Option : Biosignalisation Cellulaire et Moléculaire – Génétique de cancer

Thème

Expression de la protéine p53 dans le cancer de la vésicule biliaire diagnostiquée au niveau du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC), Alger

Présenté par :

CHERGUI Djamila

Soutenu le : 02/10/2014 devant le jury :

Mme SAADIL	MCA	USDB	Présidente
Mme HANNACHI L	Professeur	CHU M A	Examinatrice
Mme AMIR C	Professeur	CHU M A	Examinatrice
Mme BENAHMED M	MAA	CPMC Alger	Promotrice

Promotion 2013-2014

Remerciements

J'adresse mes vifs remerciements à Madame SAADI / L , chef de département de biologie et physiologie cellulaire de l' université SAAD DAHLEB BLIDA 1 d'avoir accepté de présider mon jury de soutenance de mémoire, ainsi qu'au le professeure AMIR /C chef service de l'anatomie pathologie de Mustapha Alger et professeur HANNACHI /L. de Moustapha Alger pour avoir accepté d'être les examinatrices de notre travail.

Je teins remercier vivement Docteur BENAHMED /M qui est l'origine de ce mémoire , pour m'avoir accueillie dans laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC ,pour la confiance qu'elle m' a accordée, pour la liberté dont j'ai bénéficié dans mon stage et l'expérience dont elle m'a fait profiter , pour m'avoir transmis de précieuses connaissances et pour m'a avoir conseillée et guidée avec patience et disponibilité.

J'adresse un grand merci a toute ma famille, pour m'avoir toujours encouragée et d'être inquiètes du bon déroulement de mes études. Je remercier spécialement ma sœur AICHA et ma cher amie SOUHILA pour leur soutien.

A la fin je voudrais ajouter mes remerciements à tous les membres de la promotion BCM pour leurs soutien. Et aussi mes camarades de laboratoire .

Résumé

Le cancer de la vésicule biliaire affecte les femmes plus souvent que les hommes et son incidence augmente régulièrement avec l'âge. Il est souvent associé à la lithiase biliaire prolongée et la cholécystite chronique. Par des approches histologiques et immunohistochimiques, nous avons étudié l'expression de la p53 dans 8 cas sur 12 de cancers de la vésicule biliaire (6 adénocarcinomes bien différenciés, 1 adénocarcinome peu différencié et 1 adénocarcinome moyennement différencié). Ils ont été classés selon les critères de l'OMS. Dans la plupart des cas nous avons retrouvé une surexpression de la p53 (7 des 8 cancers). Elle était variable dans les différents grades et sous-types histologiques. Dans les adénocarcinomes classiques bien et moyennement différenciés, nous avons trouvé un taux moyen de 41% de cellules positives et pour les cancers peu différenciés 23% de cellules positives. Au contraire l'expression de la p53 était complètement négative dans la muqueuse normale, et très faible dans l'Adénome. Enfin nos données suggèrent que l'expression de p53 est un événement précoce, souvent impliqué dans la carcinogenèse et lié à différents sous-types histologiques d'adénocarcinomes de la vésicule biliaire.

Mots clés : cancer de la vésicule biliaire, la p53 , immunohistochimie

Abstract

Gallbladder Cancer affects women more often than men. Its incidence increases steadily with age. It is often associated with prolonged cholelithiasis and chronic cholecystitis. We studied the expression of p53 in 8 cases out of 12 cancers of the gallbladder (6 well-differentiated adenocarcinoma, 1 adenocarcinoma poorly different and moderately differentiated adenocarcinoma 1). They were classified according to WHO criteria. In most cases we found overexpression of p53 (7 of 8 cancers). She was variable in different grades and histological subtypes. In conventional moderately differentiated adenocarcinoma and well, we found an average of 41% positive cells, while among the poorly differentiated cancers and 23% of positive cells. In normal mucosa, unlike the expression of p53 was completely negative and very low in the adenoma. Finally, our data suggest that expression of p53 is an early event, often involved in carcinogenesis and bound to different subtypes histologicals of gallbladder adenocarcinomas .

Keywords: gallbladder cancer, p53, immunohistochemic marking.

ملخص

سرطان الحويصلة الصفراوية يصيب النساء أكثر من الرجال. مع حدوث زيادات الإصابة به مع تقدم العمر. و كثيرا ما يرتبط سرطان المرارة مع التحصر الصفراوي طويل المدة وكذا التهاب المرارة المزمن .

إنهنا دراسة نسيجية و دراسة كيميائية مناعية نسيجية للتعبير عن البروتين p53 في الورم الحميد و في 8 من 12 حالة من حالات سرطان المرارة (سنة 6 غدية متباينة بشكل جيد، واحدة 1 غدية سينة التباين و واحدة 1 غدية معتدلة التباين). تم تصنيفها وفقا لمعايير منظمة الصحة العالمية. في معظم الحالات وجدنا تعبير مهم جدا من البروتين p53 (7 من 8 أنواع السرطان). وكانت متغيرة في مختلف الدرجات والأنواع النسيجية الفرعية

وجدنا في السرطانات الغدية جيدة و معتدلة التباين ما معدله 41% من الخلايا الإيجابية، في حين وجدنا نسبة 23% من الخلايا الإيجابية في السرطانات الغدية سينة التباين . في الغشاء المخاطي الطبيعي، كان التعبير عن البروتين p53 سلبيا تماما، بينما كان منخفضا جدا في سرطان الغدي الحميد

وأخيرا، تشير بياناتنا أن التعبير عن البروتين p53 هو حدث مبكر، وغالبا ما يظهر في ظاهرة التسرطن ومرتبطة بمختلف الأنواع النسيجية الفرعية للسرطان الحويصلة الصفراوية

الكلمات المفتاحية :

سرطان الحويصلة الصفراوية , p53, الكيمياء المناعية النسيجية

LISTE DES ABREVAITIONS

ACE	Antigène carcinoe embryonnaire
ADN	Adénosine Désoxyribonucléique
CCK	Cholecystokinine
CVB	Cancer de la vésicule biliaire
CBP	CREB- binding protein
CdK	Cyclin dependent kinase
DAB	Di-Aminobezidine
H	Habitant
LOH	Loss of heterozygosity
MDM2	Mouse double minute2
Pb	Paire de base
Pm	Promoteur
PBS	Phosphate Buffered Saline

SOMMAIRE

	Page
Introduction.....	1
CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES	
I .1 .Généralités sur la vésicule biliaire.....	2
I . 1.1. Anatomie	2
I . 1. 2. Histologie de la vésicule biliaire.....	2
I . 2 . Epidémiologie sur le cancer de la vésicule biliaire.....	3
I . 3. Facteurs de risque	5
I . 4. Diagnostic du cancer de la vésicule biliaire.....	5
I . 5. Aspects histopathologiques du cancer de la vésicule biliaire.	5
I . 6. Généralités sur la p53.....	8
I . 6.1. La structure de la p53.....	8
I . 6.2. Fonction de la p53.....	9
I . 6.3. Mode d'action de la p53.....	13
CHAPITRE II : MATRIEL ET METHODES	
II . 1. Matériel non biologique annexe 4.....	17
II .2. Matériel biologique.....	17
II.3. Identification des échantillons.....	17
II .4.Méthodes d'étude Morphologique.....	17
II .4.1.Coloration à l'Hématoxyline-Eosine.....	18
II .5.Méthodes d'étude immuno-Histochimique.....	19
II .5.1.Prétraitement du tissu.....	19
II . 5. 1 .1. Déparaffinage et réhydratation.....	19

II . 5. 1. 2. Démasquage enzymatique.....	20
II .5 .1.3. Blocage de la peroxydase endogène.....	20
II . 5.2. Immunomarquage par anticorps anti-p53	20
II . 5.3. Montage des coupes entre lames et lamelles.....	20
II .5.4. Observation et prise des photos.....	20

CHAPITRE III : RESULTATS

III. 1. Analyse des données épidémiologiques.....	22
III.1.1.Répartition des patients atteints de cancer de la vésicule biliaire en fonction d'âge.....	22
III.1.2.Répartition selon le sexe des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire.....	23
III.2.Etude anatomopathologie du cancer de la vésicule biliaire.....	24
III.2.1.Détermination du types histologiques.....	24
III.2.2.Répartition des patients en fonction du stade de la tumeur du cancer de la vésicule biliaire.....	25
III.3.Etude Immunohistochimique du cancer de la vésicule biliaire	26
III.3.1. Répartition des patients selon intensité du marquage de p53 du cancer de la vésicule biliaire.....	27

CHAPITRE IV : DISCUSSION

DISCUSSION.....	32
CONCLUSION.....	35
REFERENCES BIBIOGRAPHIQUES	
ANNEXES	

Introduction

Le cancer de la vésicule biliaire est la tumeur maligne la plus fréquente des voies biliaires et la 5ème tumeur du tractus gastro-intestinal. A été décrit pour la première fois par Maximilian DESTOLL en 1777. C'est un cancer relativement rare mais dont le pronostic reste redoutable car souvent découvert à un stade avancé d'où un taux de mortalité très élevé. (Diehl et al. , 1980 ; Albores-Saavedra et al .,2000) . Il y a une variation régionale et ethnique marquée de l'incidence du cancer de la vésicule biliaire. Les taux de mortalité les plus élevés ont été rapportés chez les Indiens Mapuche du Chili et les Hispaniques. (Randi et al . ,2006).

La plupart des cancers de la vésicule biliaire est de découverte fortuite chez les patients subissant une cholecystectomie pour lithiase biliaire avec une fréquence de 0,025 à 3 %. (Pawlik et al.,2007).L'étude anatomopathologique reste le seul examen qui permet de confirmer le diagnostic de cancer de la vésicule biliaire.Elle repose principalement sur l'étude morphologique standard. L'adénocarcinome représente le type histologique le plus fréquemment rencontré. Le pronostic des cancers de la vésicule biliaire dépend du stade histologique (classification TNM) et du traitement chirurgical entrepris. (Roa et al ., 1999)

Le diagnostic en retard et l'absence de traitement efficace pour de nombreux patients restent des caractéristiques typiques de cette maladie. Le pronostic est mauvais avec un taux de survie à cinq ans de 32 % pour les lésions confinées à la muqueuse de la vésicule biliaire et un taux de survie à un an de 10 % pour les stades les plus avancés. (Piehler et al.,1978 ; Kuroki et al., 2005).

Le gène de p53 se trouve dans le chromosome humain 17, suspend le cycle cellulaire quand il ya altération de l'ADN. S'il existe une mutation p53 dans le cycle cellulaire continue sans contrainte et reprend l'ADN endommagé, conduisant à des tumeurs de la prolifération des cellules cancéreuses et non contrôlées. (White, 1998).Des mutations de p53 se trouvent dans la vaste majorité des cancers de la vésicule biliaire envahissantes (Wistuba et al.,1999). Ces mutations sont représentées par une perte d'hétérozygotie (LOH) sur les loci chromosomiques 8p (44%), 9p (50%) et 18q (31%). (Wistuba et al .,1995).

Notre travail vise à faire une mise au point sur l'intérêt de l'expression de la p53 dans le cancer de la vésicule biliaire grâce à une étude rétrospective sur 12 cas au niveau du laboratoire d'Anatomie Pathologique du Centre de Pierre et Marie Curie de (CPMC) d 'Alger.

II. Matériel et méthodes:

Notre étude a été réalisée au niveau de laboratoire d'Anatomie Pathologie du Centre de Pierre et Marie Curie (CPMC) d'Alger.

Il s'agit d'une étude rétrospective sur 12 cas consécutifs des malades atteints du cancer de la vésicule biliaire et une étude prospective de la p53 sur un intervalle de 4 ans de janvier 2011 à juillet 2014.

Après confirmation histologique du cancer des 12 patients opérés au niveau du centre CPMC pour cancer de la vésicule biliaire, une étude immunohistochimique sur l'expression de la protéine p53 a été effectuée pour 8 cas un cancer de la vésicule biliaire et un muqueuse normale ont été étudiés.

Tout le matériel biologique et non biologique nécessaire pour la réalisation de la technique de coloration hématoxyline éosine HE et l'étude immunohistochimique a été fourni par le personnel du laboratoire d'Anatomie Pathologie du CPMC. le stage se déroule au niveau du service d'anatomie pathologique de CPMC depuis le 19 mars 2014 jusqu'à 17 septembre 2014.

II. 1. Matériel non biologique: annexe 4

II. 2. Matériel biologique

Notre étude rétrospective a porté sur un nombre de 12 cas présentant un cancer de la vésicule biliaire et une étude prospective de l'expression de la Protéine p53 effectuée sur 8 cas un adénome à partir de l'année 2011 jusqu'à 2014. Les 12 prélèvements ont été fixés dans le formol à 10%, déshydratés et enrobés de paraffine, coupés et colorés. Le numéro d'identification et la fiche de renseignements accompagnent les prélèvements durant toutes les étapes de la technique pré-analytique jusqu'à la rédaction du compte rendu et l'archivage des blocs de paraffine et les lames.

II. 3. Identification des échantillons

Une fois dans le laboratoire d'anatomie pathologique, chaque échantillon reçoit un numéro d'identification qui sera reporté sur un bloc de paraffine après examen macroscopique et prélèvement tissulaire effectués par le médecin pathologiste.

Une fiche de renseignements obligatoire accompagne chaque échantillon et comporte les renseignements suivants :

- L'identité du patient : nom, prénom, âge et sexe.
- Le siège et la date du prélèvement, et le nom du médecin prescripteur.
- L'âge du début et le mode d'évolution de maladie.
- Les données paracliniques : imagerie (TDM , échographie) et bilan biologique (préopératoires standards et marqueurs tumoraux si possibles)

II.4. Etude d' étude morphologique :

II.4.1.coloration hématoxyline éosine HE ;

II.4.1.1Principe :

C'est la technique standard pour l'analyse morphologique des prélèvements et l'identification des lésions. L'hématoxyline est un colorant basique qui colore le noyau en bleu tandis que l'éosine de nature acide colore le cytoplasme en rose.

Les étapes pré-analytiques sont :

II.4.1.2.Fixation :

Une fixation des prélèvements de 12 h à 48 heures dans le formol à 10%, est nécessaire pour la conservation des structures tissulaires.

II.4.1.3.Déshydratation et imprégnation :

Elle se fait dans l'automate à circulation. Les prélèvements sont déshydratés par le biais d'alcools à concentration croissante (de 80° à 100°). Ils sont immergés pendant 2h dans chaque bain d'alcool, puis dans 2 bains de xylène pendant 2 heures chacun pour subir l'éclaircissement qui consiste à éliminer alcool utilisé dans la déshydratation et par conséquent prépare le tissu à l'imprégnation avec la paraffine chauffée à 58-60° contenue dans le dernier bac de l'automate.

II.4.1.4Inclusion à la paraffine Les blocs sont ensuite inclus dans des bacs de paraffine hydrophobe fondu à 62°C (distributeur de paraffine Leica), puis refroidis à 4°C afin de permettre la réalisation des coupes fines et régulières.

II.4.1.5.Confection des coupes

Elle consiste à découper les blocs en tranches fines régulières de 3 à 5 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome manuel de façon à ce que la face à couper soit dans un plan vertical et parallèle au fil du rasoir pour obtention de rubans.

II.4.1.6.Etalement sur les lames :

Après obtention de rubans, les coupes sont étalées à la surface d'un bain marie réglé à 46°C, Puis recueillies sur des lames rodées préalablement numérotées par le matricule correspondant inscrit au crayon ou avec diamant. Séchage des lames : pendant une nuit à 40°C dans l'étuve.

II.4.1.7.Déparaffinage et réhydratation

Les coupes sont complètement déparaffinées dans deux bains de xylène pendant 5 minute chacun, puis passées dans quatre bains d'éthanol de concentration décroissante : 100°,95°,90°,70° successivement pour la réhydratation.

II.4.1.8.Coloration :

La coloration de la routine est la coloration Hématoxyline éosine (HE) .

II.4.1.9.Montage et observation au microscope optique :

Le montage est l'opération qui consiste à fixer, à l'aide d'une substance appropriée (Eukitt), une lamelle de verre sur l'échantillon histologique ceci pour éviter l'oxydation des colorants. Les lames sont ensuite séchées dans l'étuve à 35°C, nettoyées au xylène et enfin observées au microscope optique à différents grossissements.

II.5.Méthode d'étude Immuno-histochimique

II.5.1. Prétraitement du tissu

II.5.1.1.Déparaffinage et réhydratation

Les coupes sont placées dans l'étuve à 60°C pendant 24 heures pour l'élimination de l'excès de paraffine. Elles sont par la suite déparaffinées complètement dans deux bains de xylène pendant 5 minute chacun, puis passées dans quatre bains d'éthanol de concentration

décroissante : 100°,95°,90°,70° successivement pour la réhydratation ,ensuite rincées dans l'eau distillée.

II .5.1.2.Démasquage enzymatique

Dans une solution de démasquage citrate de ph=9 les coupes sont mises pendant 40min à97°C. puis refroidies 20min à température ambiante, par la suite rincées à l'eau distillées.

II .5.1.3.Blocage de la peroxydase endogène

Les échantillons sont entouré par une substance hydrophobe à l'aide d'un DAKO pen afin d'éviter la dispersion et la perte des réactifs .les coupes sont incubées a l'eau oxygénée H₂O₂ pendant 5 minutes , puis rincer à l'eau distillée.

II .5.2.Immunomarquage

Nous avons marqué nôtres lames par l'anticorps anti p53.

Après rinçage avec le tampon PBS , les coupes prétraitées sont incubées avec les anticorps primaires, pendant une durée de 1 heure, à la température ambiante ensuite les coupes sont rincées deux fois pendant cinq minutes avec le TP PBS et incubées avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase pendant 30 minutes. Les coupes sont par la suite, rincées par le PBS deux fois pendant cinq minutes et incubées avec une solution de DAB (1ml pour une goutte de chromogène) pendent 5 à 10 minutes à surveiller jusqu'à l'obtention d'une couleur marron, la réaction est stoppée par un rinçage par l'eau distillée.

Contre coloration topographique à l'hématoxyline de Mayer dans le but de visualiser les noyaux qui du fait de la présence des acides nucléiques et le colorant de nature basique vont prendre une couleur bleu foncée

Les coupes immunomarquées et contre – colorées sont trempées dans une solution ammoniacuée (ammoniaque hydrogène NH₃ à 37 mM) pour éviter la perte de la coloration.

II .5.3.Montage des lames

Le montage entre lame et lamelle, permet la conservation illimitée ou transitoire des coupes traitées par les réactifs. Pour pouvoir réaliser l'observation analytique et photographier les zones d'intérêt, il est réaliser avec une solution conservatrice (faramount milieu aqueux)

II.5.6.Observation et prise des photos

Les coupes montées entre lame et lamelle sont observée au microscope à différent grossissement ensuite photographier avec une appareil numérique adaptable .

Discussion :

Le cancer de la vésicule biliaire est relativement rare, représentant 3% de toutes les tumeurs malignes (Silk et al . ; 1989). Les lésions malignes de la vésicule biliaire sont des Adénocarcinome dans 89 % des cas .(Pozo et al. ; 2005) . C'est un cancer qui touche préférentiellement la femme âgée .

Dans notre étude , la moyenne d'âge est 65 ans pour les femme et 68 ans pour les hommes. La répartition des patients selon les tranches d'âge a trouvé qu' il ya un pic important chez les patients âgés de plus de 60 ans avec un age médian de 64 ans.

Dans notre étude, nous avons analysé les cas des patients atteints du cancer de la vésicule biliaire sur le plan anatomopathologique par une coloration histologique HE (Hématoxylin – éosine) qui permet de déterminé le type histologique.

La plupart des cancers de la vésicule biliaire sont des adénocarcinomes (80-95%), et peuvent être de type tubulaire, mucineux, ou papillaire (Joffe et al., 1981). Les tumeurs papillaires sont moins susceptibles d'envahir le foie directement et ont une plus faible incidence de métastase dans les ganglions lymphatiques. Les types les moins communs de cancer de la vésicule biliaire sont le carcinome indifférencié ou anaplasique (07.02%), le carcinome à cellules squameuses (1-6%), et carcinome adénosquameux (1-4%) (Kim et al.; 2001).

Dans notre série on a retrouvé 8 patients porteurs d'Adénocarcinomes bien différenciés d'architecture papillaires et glandulaires (fig 16 A) et 2 cas ayants un adénocarcinome moyennement différencié dont l'architecture associé à des tubes et des travées (fig 17A) et 2 cas d'Adénocarcinome peu différencié avec une architecture diffuse sans structures glandulaires. (fig 18 A).

Les altérations génétiques fréquemment observées dans les cancers de la vésicule biliaire comprennent des mutations de K-ras, p16, la surexpression de la p53 et la perte d'hétérozygotie des bras chromosomiques (8, 23-25). (Wistuba et al 1995).

Gène P53 fait partie des Gènes supresseurs de tumeurs qui agissent comme des points de contrôle du Cycle cellulaire et donc, toute mutation dans ces gènes peut conduire à la transformation maligne. Ce gène est le gène le plus fréquemment muté dans nombreux cancers humains (côlon, sein, poumon, œsophage, foie et cerveau...) y compris le cancer de la vésicule biliaire. Ces tumeurs génétiquement mutées sont généralement associées à une

progression rapide de la maladie. L'expression de la protéine p53 dans le cancer de la vésicule biliaire a été détectée par divers techniques, mais la relation entre la surexpression de p53 et facteurs pronostiques clinico-pathologiques est encore mal connue. (Yong-Tae Kim et al. 2001).

Lee et al, (1995) ont étudié l'expression immunohistochimique de la protéine p53 dans 13 cas du cancer de la vésicule biliaire, 7 cas de la voie biliaire principale et 9 cancers de l'ampoule de Vater. Ces cas ont été comparés à 11 cas de cholécystite chronique et 4 lésions prénéoplasiques de la vésicule biliaire. L'immunomarquage nucléaire de la p53 n'a été trouvé que dans le cancer peu différencié de la vésicule biliaire.

Dans notre série, l'immunomarquage nucléaire de la p53 a été trouvé dans les différents Adénocarcinomes. Dans les Adénocarcinomes bien différenciés, l'intensité de l'expression de la p53 pour les cas n (2,3 et 8) présenté dans le (tableau 2) est élevée. Ils ont une intensité de marquage forte, mais on a trouvé un cas n (4) d'adénocarcinome bien différencié à faible intensité de 6% des cellules tumorales (fig 16 B et C). Pour l'Adénocarcinome moyennement différencié cas n (5) à un intensité de marquage nucléaire faible à modérée de 45%, (fig 17 B et C). L'Adénocarcinome peu différencié cas n(6) un faible immunomarquage de la p53 (fig 18 B). En comparaison, l'étude immunohistochimique de l'Adénome papillaire, montre un très faible intensité d'expression de la p53 de 2% des cellules (fig 15 D).

Les études de Mirca et al, (2000) de la surexpression de p53 dans 20 cas de cancer de la vésicule biliaire du nord de l'Inde retrouvent dans 14/20 de cancer de la vésicule biliaire une protéine p53 surexprimée. Dans leur étude, ce taux est beaucoup plus élevé que ceux rapporté plus tôt dans d'autres centres. Il également observé une corrélation significative de l'expression de p53 avec la présence de calculs biliaires, le stade T (de TNM), le grade de la tumeur et l'invasion du foie. Il n'a pas été trouvé de corrélation entre l'expression de p53 et le type histologique de la tumeur, alors qu'une corrélation a été observée dans d'autres études.

Dans une autre étude, l'expression de la protéine p53 a été étudiée dans 41 adénocarcinomes bien différenciés de la vésicule biliaire, 6 cas de cholécystite aiguë et 23 cas de cholécystite chronique : 34 des 41 cancers (58,5%) avaient un marquage diffus et intense de p53, (47-93%) et 4/41 cas (9, 8%) avaient un marquage focal avec un L'indice de marquage intermédiaire p53 (22-34%). il n'y a aucun rapport observé entre le stade, la taille de la tumeur, le type histologique et p53, à la différence de l'étude Indienne.

Billo et al (2000) ont étudié l'expression de p53 dans 80 cancers de la vésicule biliaire, 43 muqueuses péritumorales, 5 adénomes et 20 muqueuses de vésicule biliaire non tumorale. La p53 est surexprimée dans 51 des 80 cancers de la vésicule biliaire (64%) : elle a été observée dans 100 % des carcinomes de type intestinal et 66% de type papillaire, 83% des carcinomes adénosquameux et 66% carcinomes à cellules géantes. Alors que tous les adénocarcinomes mucineux étaient négatifs. L'immunoréactivité était de 60% dans les adénocarcinomes vésiculaires modérément différenciés. Ces résultats suggèrent que l'analyse génétique de Kras et mutations du gène p53 dans les biopsies de vésicule biliaire et la bile peut être utile pour le diagnostic des cancers des voies biliaires bien que son efficacité peut être limitée aux patients à un stade avancé de la maladie.

Dans notre série la majorité des patients étaient à des stades avancés T3 souvent étendus au foie avec atteinte métastatique (ovaire et paroi abdominale) chez deux patients cas n 5 et n 8. Le pronostic des cancers de la vésicule biliaire dépend essentiellement du stade tumoral. Il reste généralement pauvre à cause du potentiel invasif précoce et du retard du diagnostic.

RESULTATS

Nos résultats ont été réalisés sur 12 patients atteints d'un adénocarcinome de la vésicule biliaire (tout type histologique confondu d'Adénocarcinome)

III.1. Analyse des données épidémiologiques :

III.1.1. Répartition des patients atteints de cancer de la vésicule biliaire en fonction d'âge :

Notre étude porte sur 12 cas atteints un cancer de la vésicule biliaire, cette répartition est présentée dans l'histogramme suivant :

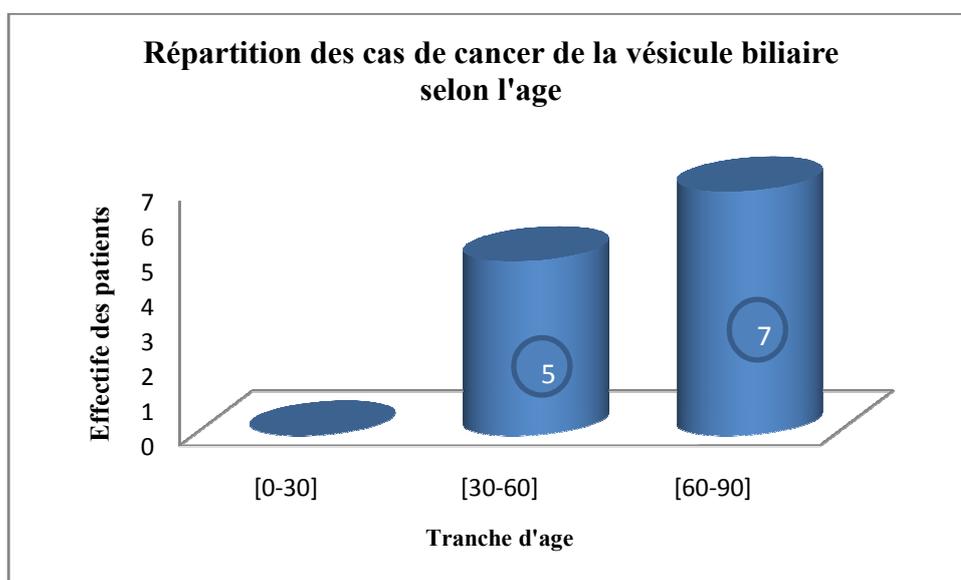


Figure 10 : Répartition des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire en fonction d'un intervalle d'âge de trente ans. Avec des extrêmes allant de 42 à 80 ans.

Il ya un pic important chez les patients âgés de plus de 60 ans. Il n'ya aucun patient atteint un cancer de la vésicule biliaire entre 0 et 30 ans dans notre série

Tableau 1 : répartition selon le sexe

Sexe	Nombre	Pourcentage %
femme	8	75
homme	4	25
total	12	100

III.1.2. Répartition selon le sexe des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire:

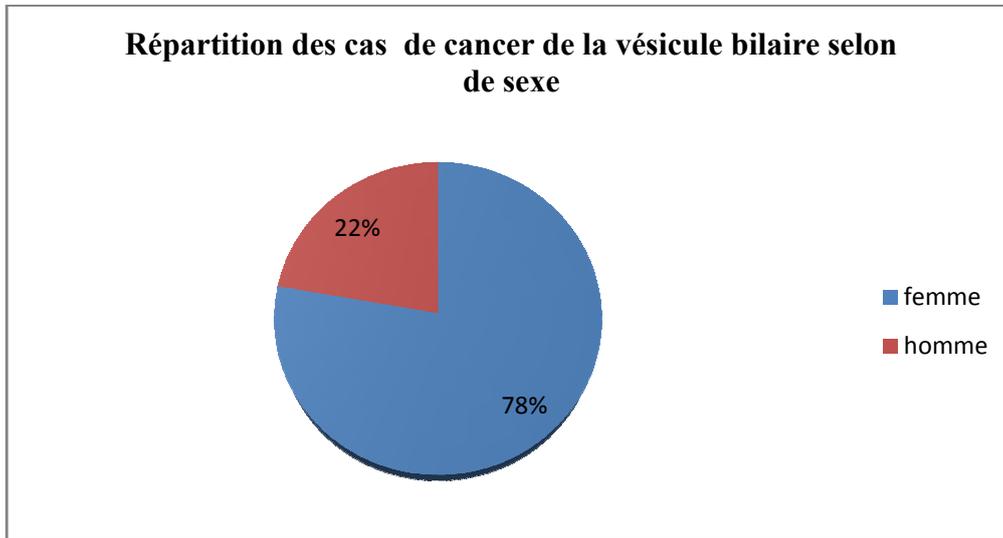


Figure 11: Répartition des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire selon le sexe.

Le cancer de la vésicule biliaire est plus fréquent chez les femmes (78%) par rapport aux hommes (22%)

III.2.Etude anatomopathologie du caner de la vésicule biliaire:

III.2.1.détermination du types histologiques.

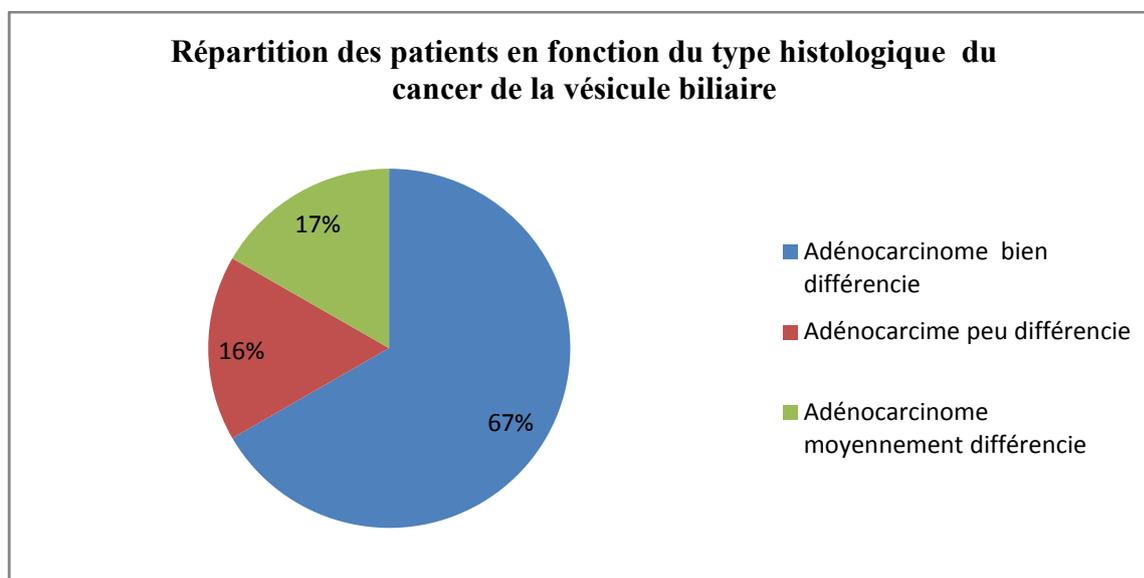


Figure 12 : Répartition des patients en fonction du type histologique du cancer de la vésicule biliaire.

III.2.2.Répartition des patients en fonction du stade de la tumeur du cancer de la vésicule biliaire.

Tableau 2 : Répartition selon le stade.(TNM)

Stade	types histologiques		
	Adénocarcinome bien différencié	Adénocarcinome peu différencié	Adénocarcinome moyennement différencié
T 1	0	0	0
T 2	4	1	2
T3	4	1	0

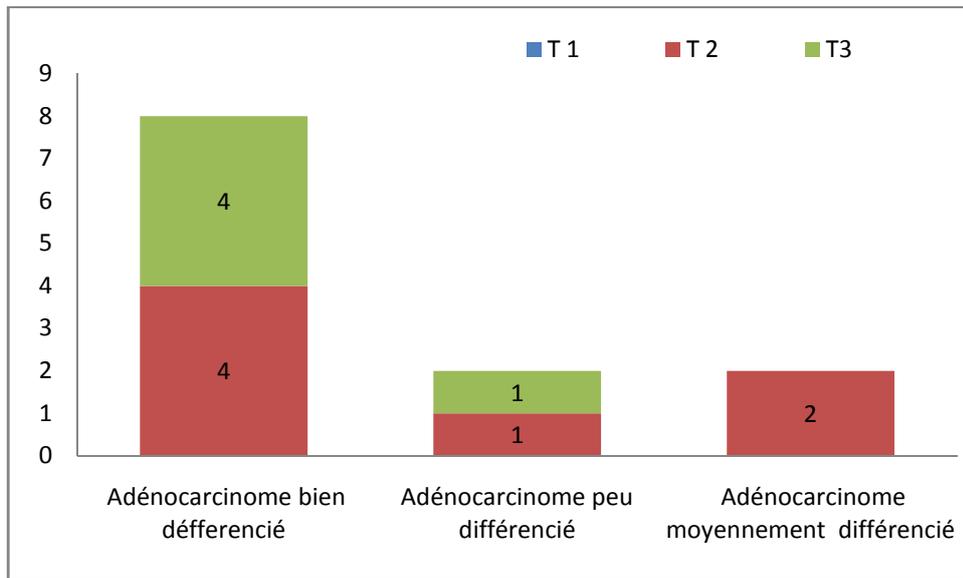


Figure 13 : Répartition des patients en fonction de stade de la tumeur du cancer de la vésicule biliaire.

Les 12 patients atteints du cancer de la vésicule biliaire présentent une tumeur maligne de nature épithéliale glandulaire ou adénocarcinome de morphologie variée et gradés en ;

- ✓ 8 Adénocarcinomes bien différenciés.
- ✓ 2 Adénocarcinomes moyennement différenciés.
- ✓ 2 Adénocarcinomes peu différenciés.

III.3. Etude Immunohistochimique du cancer de la vésicule biliaire:

Notre étude immunohistochimie de l'expression de p53 consiste à une analyse des coupes en paraffine, sur des prélèvements des patients atteints de cancer de la vésicule biliaire. Sur les 12 cas, 4 cas étaient des blocs communiqués par des laboratoires d'anatomies pathologies privés et donc on ne disposait pas des échantillons pour l'immunohistochimie de la p53. Les résultats sont résumés dans le tableau :

Tableau 3: l'expression de la p53 dans le cancer de la vésicule biliaire :

N cas	Pourcentage de p53 %	intensité de l'expression de p53		
1	17	+		
2	88			+++
3	89			+++
4	6	+		
5	45		++	
6	23	+		
7	27		++	
8	75			+++

+ Faible ++ Modéré +++ forte

III.3.1. Répartition des patients selon le pourcentage du marquage de p53 du cancer de la vésicule biliaire.

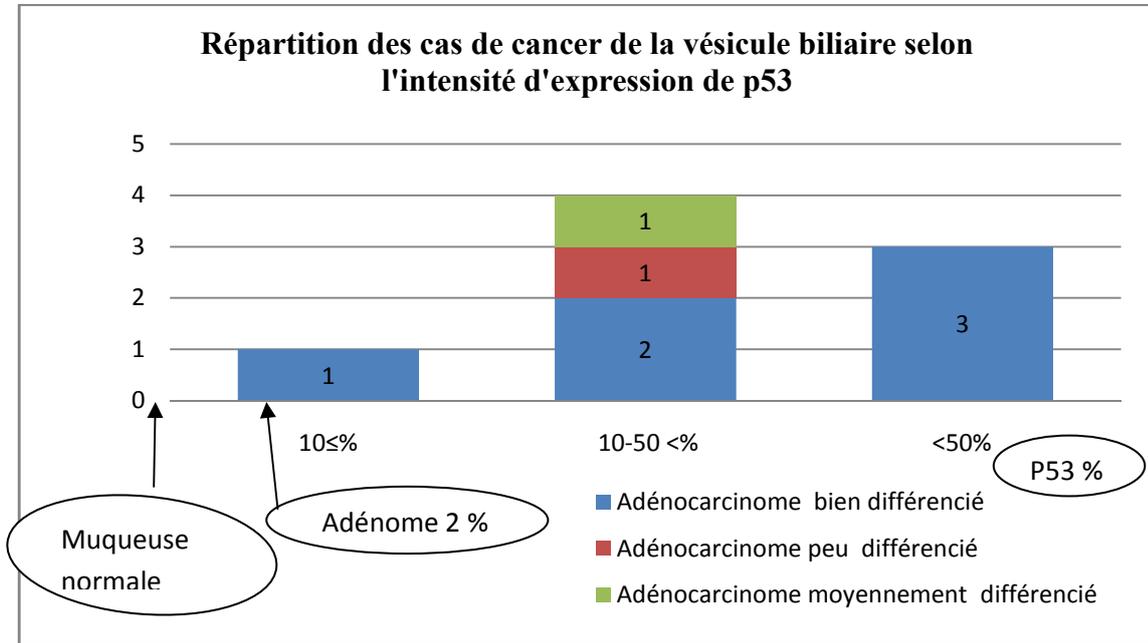


Figure 14 : Répartition des patients en fonction de l'expression de p53 dans le cancer de la vésicule biliaire.

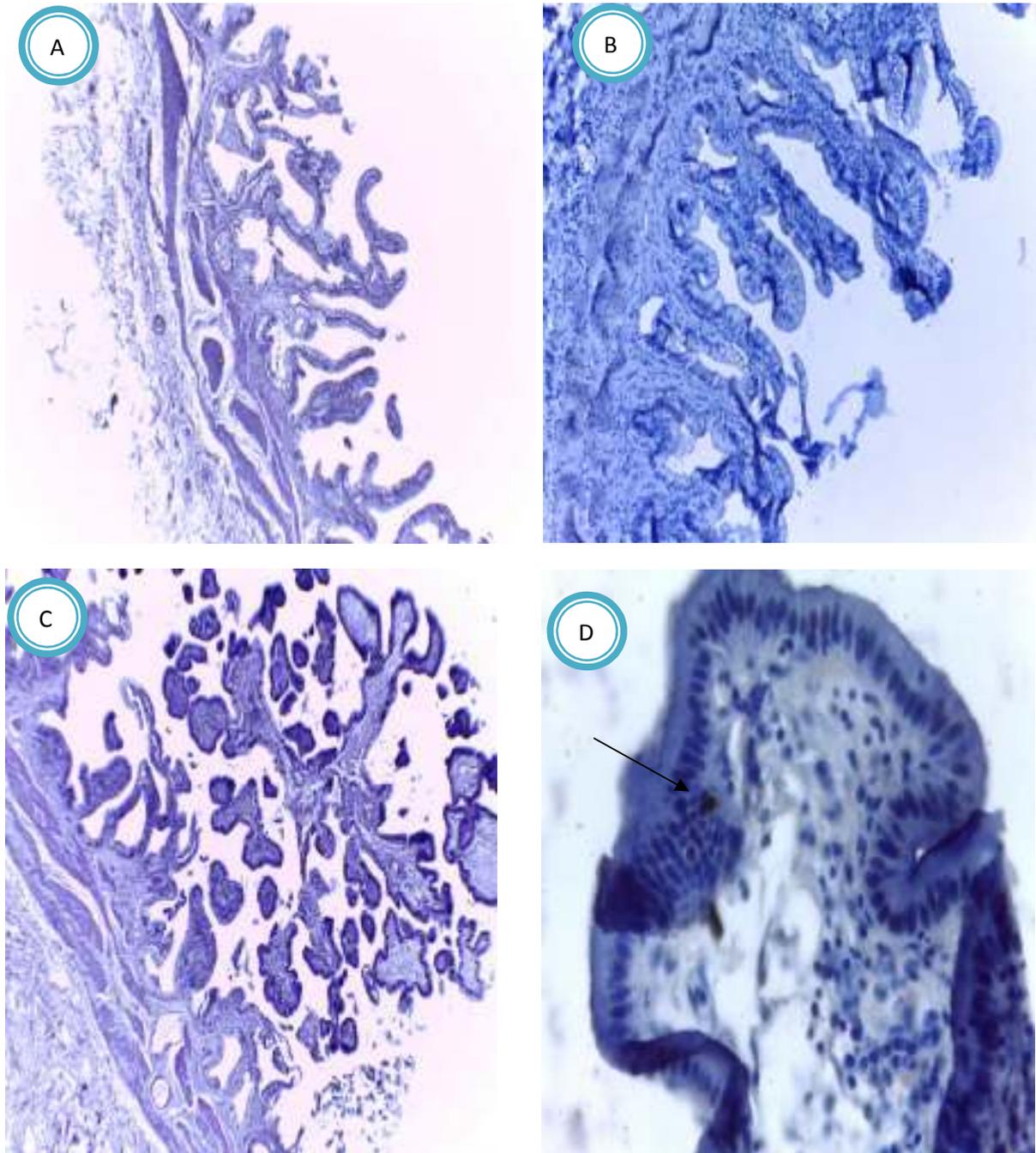


Figure 15 :Absence d’expression de p53 dans la muqueuse normale et très faible expression de p53 dans l’adénome papillaire de la vésicule biliaire.

A (HE G X10) : paroi vésiculaire normale. B (G x10, immunohistochimie avec p53) : absence des cellules positives. C (HE G X4) : adénome d’architecture papillaire sans atypies cytonucléaires . D (immunohistochimie avec p53 ; G x 40): 2% de cellules positives avec faible intensité.(↘)

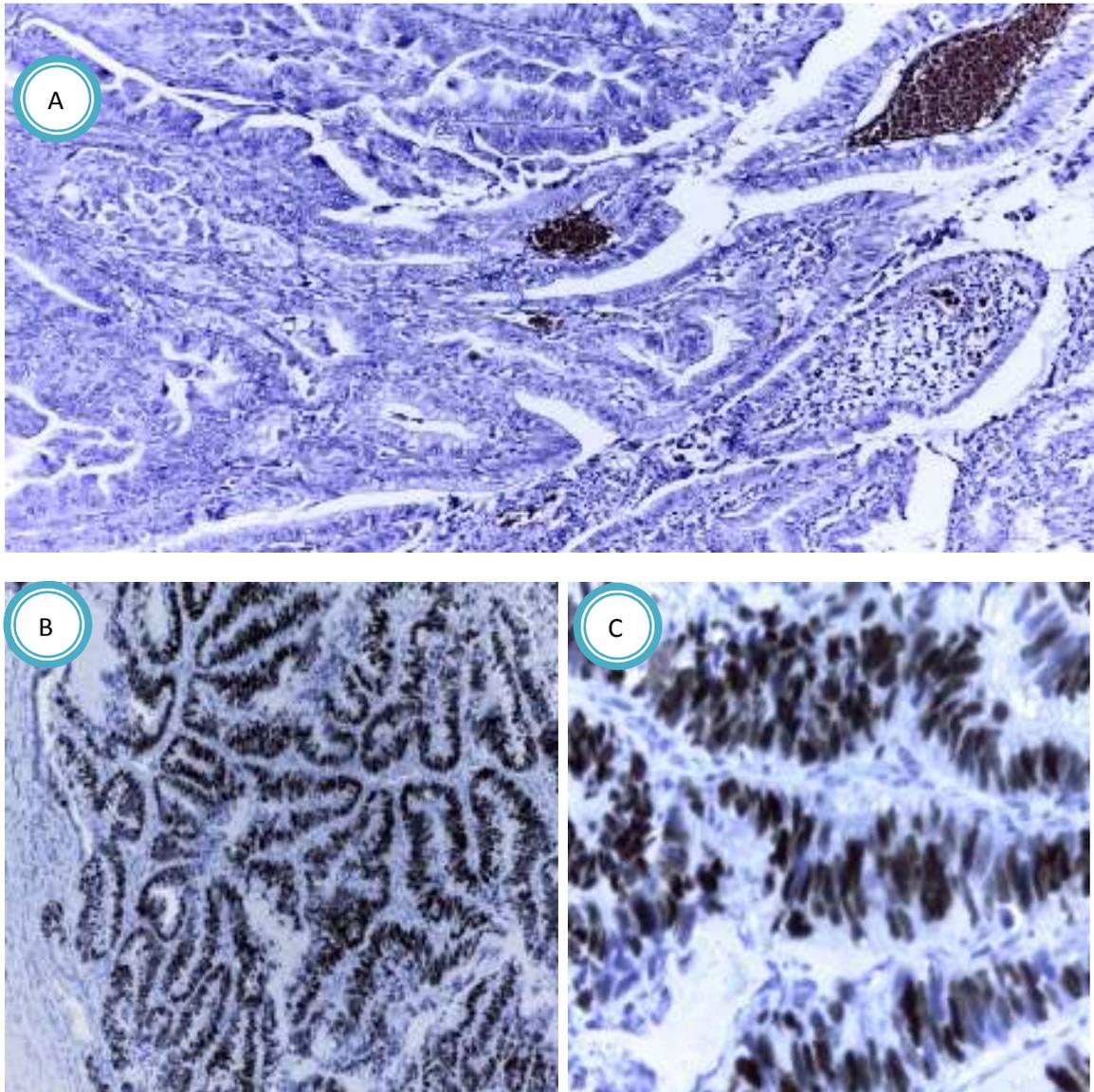


Figure 16 : Adénocarcinome bien différencié.

A : HE (G X10) prolifération maligne infiltrante d'architecture glandulaire et papillaire.

B et C (immunohistochimie avec p53G X 10 et X 40) : 89% de cellules qui présentent une positivité nucléaire de forte intensité.

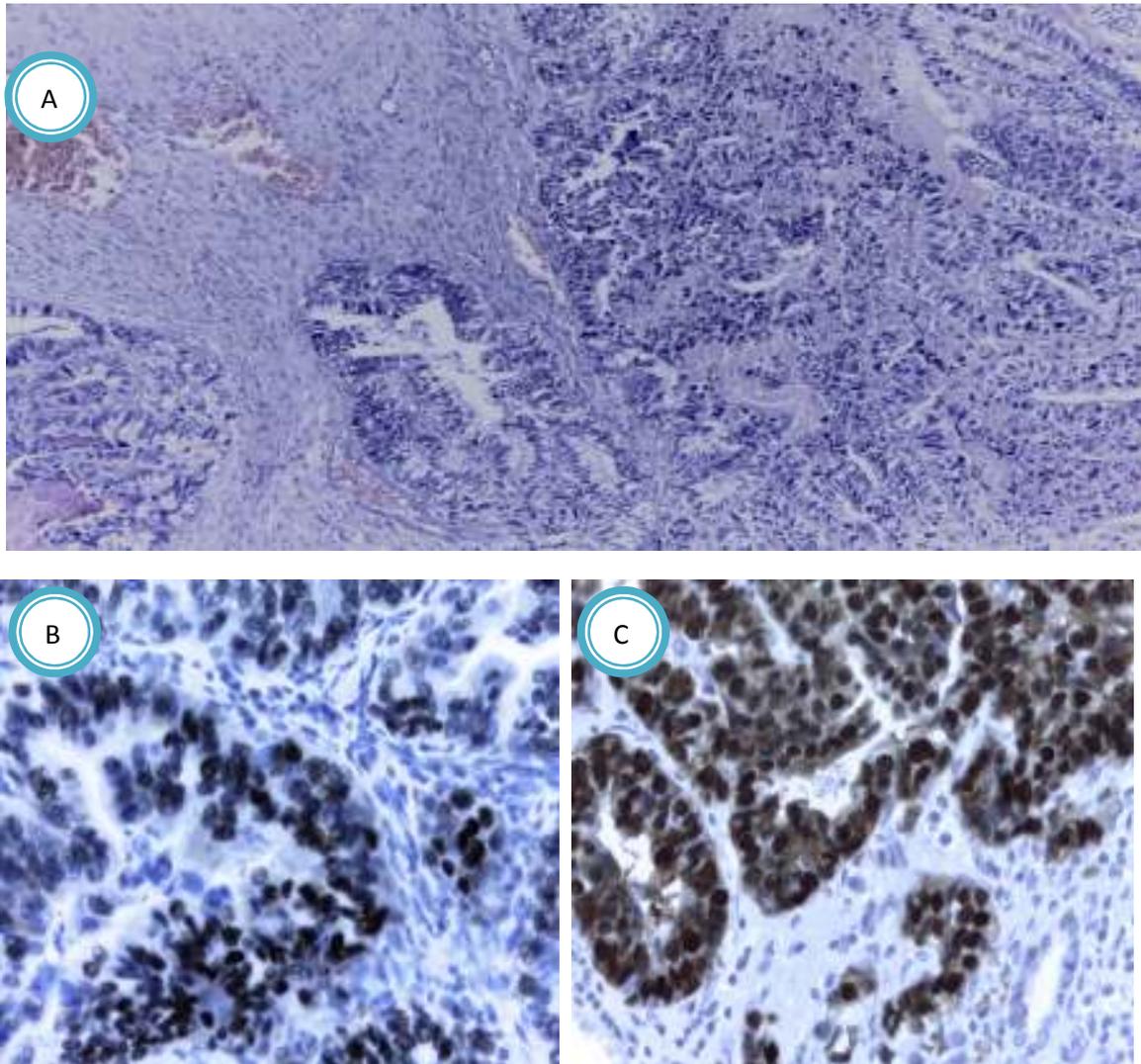


Figure 17 : Adénocarcinome moyennement différencié .

A (HE, G X10) : Adénocarcinome moyennement différencié d'architecture glandulaire et trabéculaire.

B et C (immunohistochimie p53, G X 10 et X 40) positivité nucléaire d'intensité modérée de 45% des cellules tumorales.

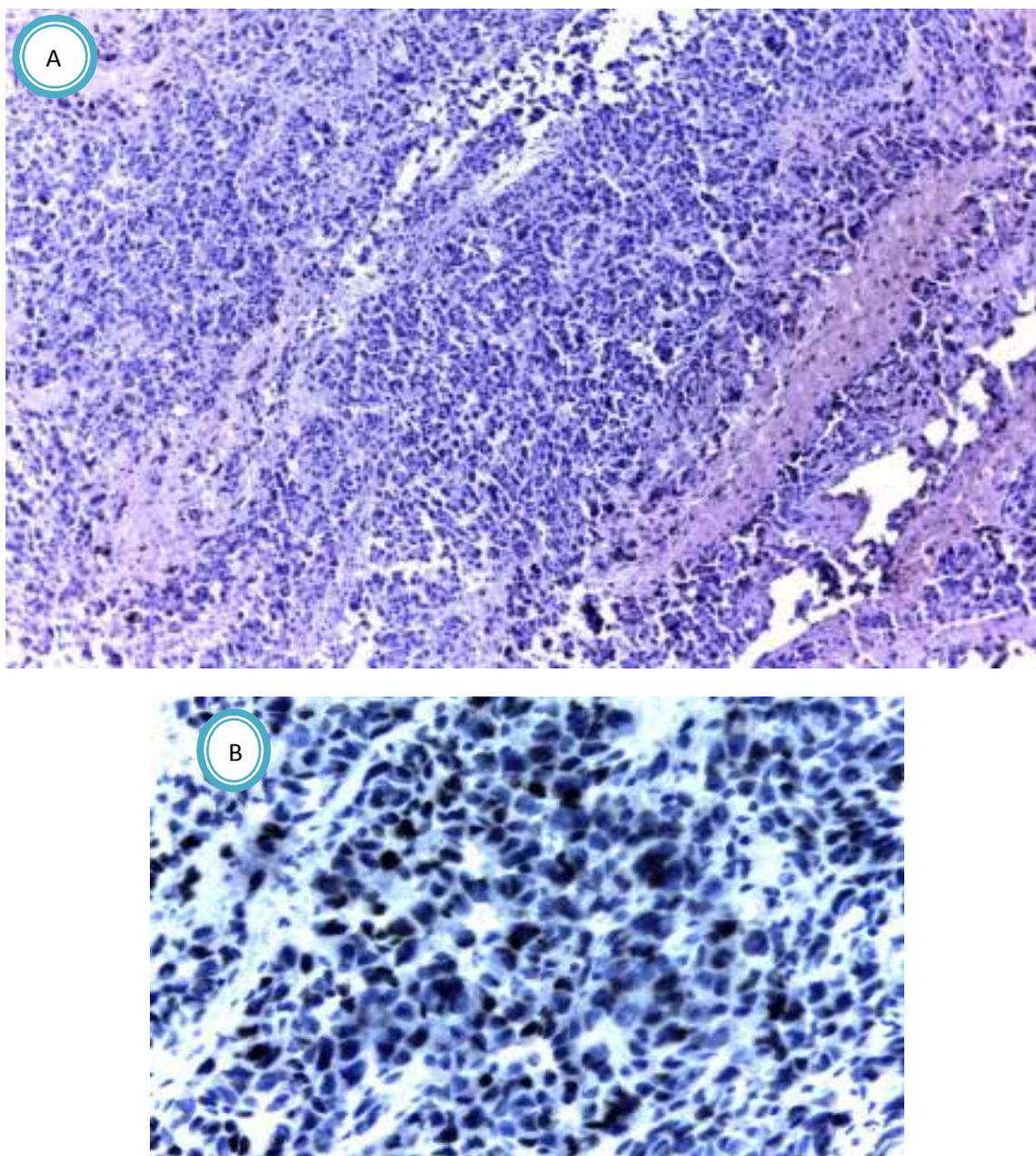


Figure18 : Adénocarcinome peu différencié.

A : HE G X 10 ; Adénocarcinome peu différencié d'architecture diffuse sans structures glandulaires évidentes.

B (immunohistochimie p53, G X 40) positivité nucléaire d'intensité faible de 23 % des cellules tumorales .

Conclusion

Le cancer de la vésicule biliaire est au cinquième rang des cancers digestifs, c'est un cancer de mauvais pronostic. Sa découverte à un stade précoce est une chance qu'il faut saisir, car le diagnostic est souvent réalisé à des stades avancés de la maladie en raison d'une symptomatologie peu spécifique. Environ 50 % des cancers de la vésicule biliaire sont diagnostiqués de façon fortuite lors de l'examen histologique après cholécystectomie.

Le traitement chirurgical reste le seul espoir de guérison des cancer de la vésicule biliaire. Elle dépend de l'étendue du cancer de la vésicule biliaire. On peut enlever la vésicule par chirurgie (cholécystectomie simple) ou bien faire une opération plus étendue.

Le nombre des cas étudiés n'était pas important, mais grâce à des approches histologiques et immunohistochimiques, nous avons déterminé les types histologiques le plus fréquent est L'Adénocarcinome bien différencié papillaire. Par rapport aux autres types histologiques qui restent très rares. Et la surexpression de la p53 était positive dans la majorité des cas étudiés, avec un pourcentage varié selon le grade et le sous type histologique de la tumeur.

Mais, il sera intéressant de compléter notre étude, pour confirmer les résultats immunohistochimiques car il n'y a pas de consensus pour le seuil de surexpression de la p53 et la place de ce marqueur tumoral reste limitée. N'ayant pas livré tous ses secrets, l'avenir est à la biologie moléculaire pour trouver un traitement adjuvant et des thérapies ciblées en plus la chirurgie.

Enfin, Le rôle précis de p53 réside dans l'activation et dans l'inhibition de l'expression de gènes qui sont impliqués dans de nombreuses fonctions essentielles dans la régulation des processus biologiques et la compréhension de tous ces fonctions pourra aider.

Nous sommes dans un pays à forte incidence, il nous revient à nous les biologistes et aussi les médecins Algériens de trouver des stratégies thérapeutiques efficaces contre le cancer de la vésicule biliaire.

I .1.Généralité sur la vésicule biliaire :

I .1.1.Anatomie de la vésicule biliaire

C'est un organe sous-hépatique, accolé au foie au niveau du lit vésiculaire, sur la scissure médiane hépatique. Elle fait partie des voies biliaires extra-hépatiques. C'est une citerne de la forme d'une poire qui comporte un fond arrondi, un corps et un collet. Ce dernier la relie au canal hépatique et au canal cholédoque par le canal cystique. La vésicule biliaire assure entre les repas, le stockage et la concentration de la bile. (Bartoli et al ,2000).

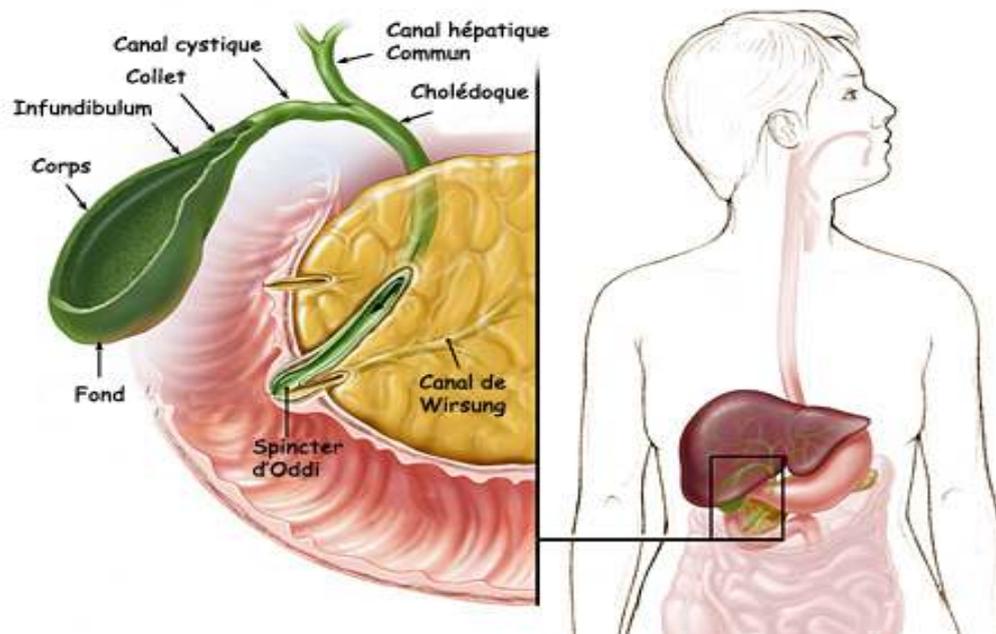


Figure 1 : Anatomie de la vésicule Biliaire (Copyright Johns Hopkins)

I .1.2. Histologie : (Martin et Michel .2008)

La Paroi de la vésicule biliaire est constituée de 3 tuniques : muqueuse, musculuse et adventice ou séreuse.

- ❖ **Muqueuse** : La muqueuse possède de nombreux replis qui s'effacent lors du remplissage vésiculaire. Son épithélium est simple, prismatique dont les cellules présentent des microvillosités apicales, des interdigitations et des complexes de jonction ainsi que de nombreuses vésicules apicales. Le chorion correspondant a un tissu conjonctif lâche entre les replis de l'épithélium qui forme de fausses glandes

(glandes de Luschka) et des glandes muqueuses au niveau du collet de la vésicule biliaire.

- ❖ **Musculaire** : Composée de fibres musculaires lisses à disposition plexiforme (dans tous les sens). elle se contracte et chasse la bile vers le duodénum Sous stimulation par la CCK, sécrétée par les cellules neuroendocrines duodénales,
- ❖ **Séreuse** : Située sur la face non adhérente au foie, elle répond à la séreuse péritonéale sauf à sa face d'accolement au foie où elle est remplacée par une adventice qui se lie à la capsule hépatique.

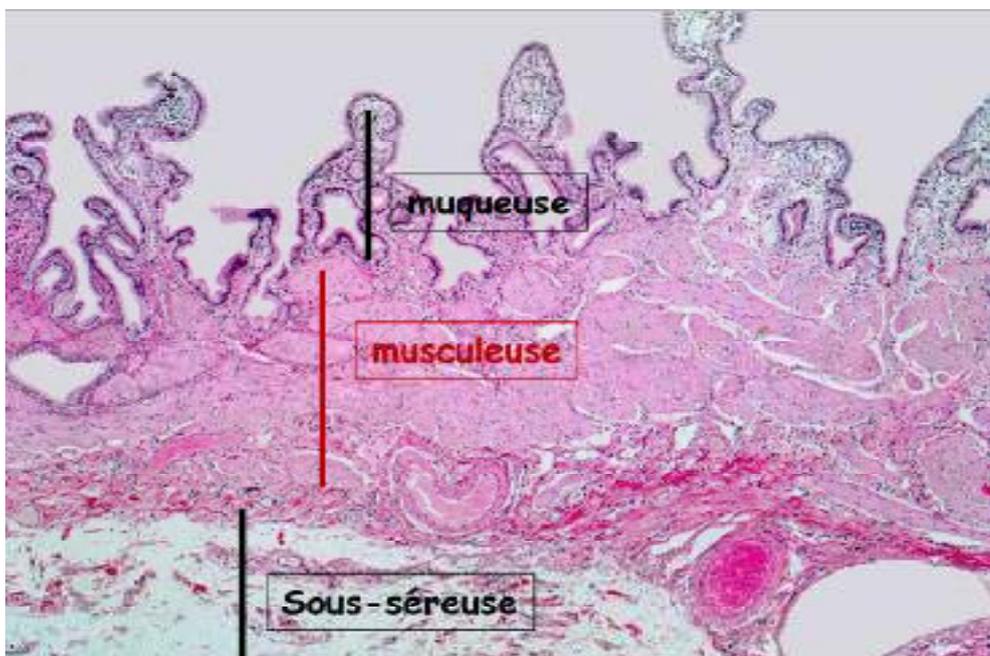


Figure 2 : Structure des différentes couches histologique de la vésicule biliaire (DADOUNE et al . ;1990).

I .2. Epidémiologie sur le cancer de la vésicule biliaire :

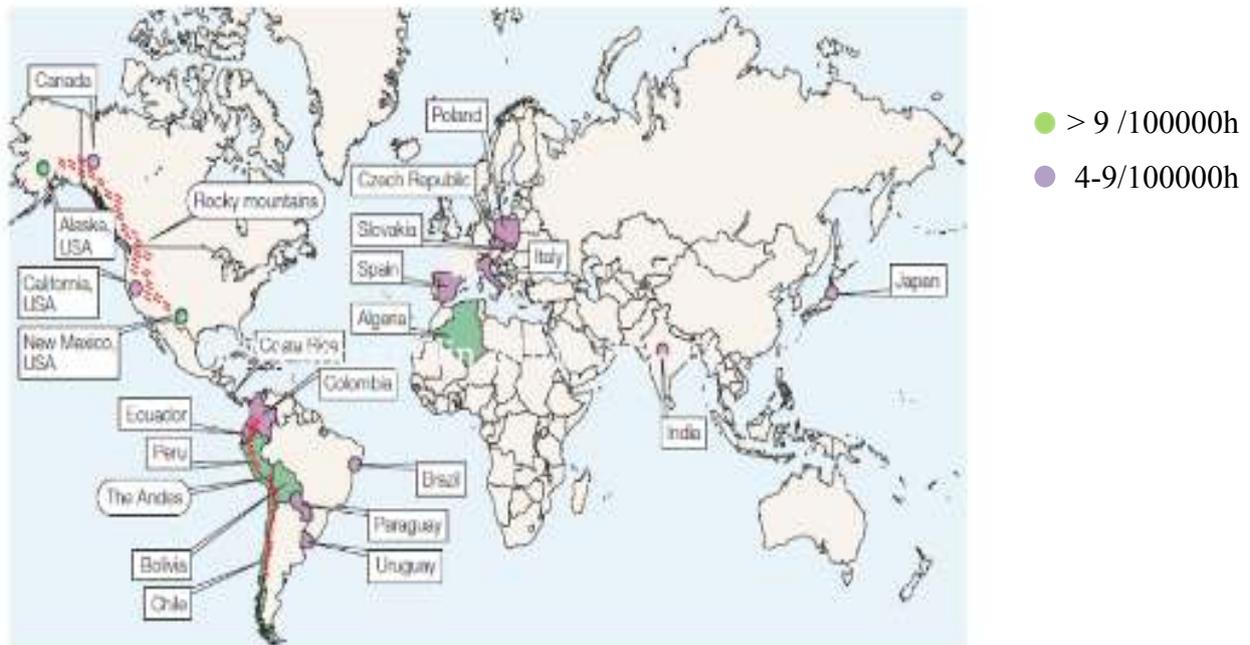
Le cancer de la vésicule biliaire est au cinquième rang des cancers digestifs et le plus fréquent des cancers des voies biliaires (deux tiers). Sa prévalence est de 3/100 000 habitants dans les pays occidentaux. En France, le sex-ratio est de 1,9 avec une différence de prévalence en fonction du sexe ; respectivement 3,8 et 1,3/100000 chez la femme et chez l'homme. La moyenne d'âge est de 72 ans pour les hommes et 74 ans pour les femmes. Ce cancer est rare avant 50 ans mais ensuite l'incidence croît et de façon plus rapide chez les femmes reflétant l'épidémiologie de la lithiase vésiculaire, principal facteur de risque (risque relatif ≥ 3) de ces

CHAPITRE I : DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES

cancers de la vésicule biliaire.(Hsing et al., 1998). Pour le continent africain, Il n'existe pas de statistique concernant l'incidence de cancer de la vésicule biliaire , néanmoins on note une très grande fréquence des ces cancers en Algérie. L'incidence est estimée à 6,1 à 8 chez les femmes et représente le 2^e cancer digestif après les cancers colorectaux . (Abid et al. , 2004).

Dans le registre du cancer d'Alger (Le registre des tumeurs de la wilaya d'Alger 2010) rapporté par l'institut national de sante publique, le cancer de la vésicule biliaire représente une incidence brute de 3,6/1000000 pour les femmes et 1,8/1000000 pour les hommes, ce qui le classe au 3^e rang des cancers digestifs chez la femme après le colon et l'estomac. Au niveau de la wilaya de Boumerdès (Le registre des tumeurs de la wilaya d'Alger 2010), l'incidence brute chez la femme est de 5.6/1000000 et de 0.5/1000000 chez l'homme . Ce cancer est classé au 2^e rang des cancers digestifs de la femme.

De par le monde , l'Algérie est un pays de forte incidence du cancer de la vésicule biliaire au même titre que l'inde et le chili (Randi et Franceschi,2006) à raison de 9 /1000000 habitants (Wistuba et Gazdar , 2004).



**Figure 3 : Incidence du cancer de la vésicule biliaire dans le monde
(Nature Reviews cancer 2004)**

I .3.Facteurs de risque

Le risque relatif de cancer de la vésicule passe de 2,8 à 4,4 chez les personnes atteintes de lithiase vésiculaire. (Maringhini et al ., 1987). Pour certains, la taille des calculs serait un facteur prédictif de cancer (Lowenfels et al ., 1989 ; Bueno et al ., 1993).

La consommation de tabac et d'alcool ainsi qu'un régime hypercalorique ont aussi été avancés comme facteurs de risque avec, respectivement, des risques relatifs de 3,2 ; 3,6 ; et 2,0 (Strom et al ., 1995 ; Yagy., et al.,2008) .Les autres facteurs de risque connus sont les infections biliaires chroniques parasitaires ou bactériennes , et la vésicule porcelaine (Tewari et al., 2010 ; Rustagi et al., 2011) .Dans la mesure où 70 % des patients ont plus de 70 ans au moment du diagnostic du cancer, la cholécystectomie prophylactique pour une lithiase vésiculaire asymptomatique n'est pas justifiée et semble même réduire l'espérance de vie d'après certaines études (Ransohoff et al. , 1983 ; Friedman et al., 1988).

I .4. diagnostic du cancer de la vésicule biliaire

Le diagnostic clinique des cancer de la vésicule biliaire reste difficile à cause d'une symptomatologie vague et non spécifique. Ils présente des signes fonctionnel tel que Douleur, Ictère et d'autre signes comme les nausées et les vomissements .un examen clinique peu être normale chez les patients a des stade précoce. Aussi un examen paracliniques : imagerie (TDM , échographie) et bilan biologique (préopératoires standards et marqueurs tumoraux L'ACE (carcinoembryonic antigen) et le CA 19-9 (carbohydrate antigen 19-9) si possibles) . (Stavros et al .,2008)

I . 5. Aspect histopathologie du cancer de la vésicule biliaire (Classification selon OMS annexe 1)

- **Tumeurs Epithéliales :**

I .5.1. **carcinomes** :C'est un Adénocarcinome dans 90% des cas(Duffy et al., 2009 ; Goldin et Croc ,2009 ;Liu etYeh,2009 ;Felekouras et al.,2009)

I .5.1.1. Adénocarcinome

L'adénocarcinome bien à moyennement différencié est la tumeur épithéliale la plus fréquente de la vésicule biliare et des canaux biliaires extra-hépatiques. Il est composé de structures glandulaires de petite ou de grande taille, bordées par des cellules de hauteur variable,

cubique ou cylindrique haute ressemblant à l'épithélium biliaire superficiel .Il existe souvent du mucus au niveau des cellules et des glandes. Le mucus extracellulaire peut se calcifier. Les adénocarcinomes bien différenciés présentent des foyers de différenciation intestinale dans un tiers des cas. Ils comportent également des cellules en bague à châton et des cellules endocrines. Les cellules endocrines peuvent être nombreuses et sont immunoréactives pour la sérotonine et aux hormones peptiques. Néanmoins, la présence de ces cellules ne permet pas de confirmer le diagnostic de néoplasme neuroendocrine. (Hamilton ,2000)

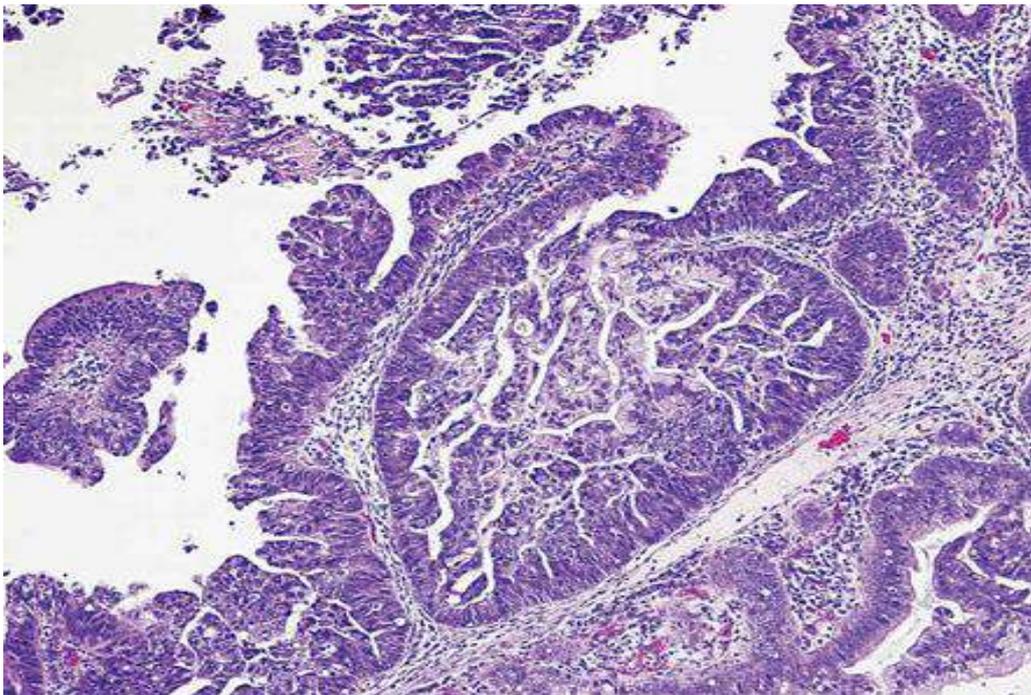


Figure 4 : Adénocarcinome bien différencié de la vésicule biliaire (Hamilton ,2000)

I .5.2. Les variantes des Adénocarcinomes

I . 5. 2. 1. Adénocarcinome papillaire :

Cette tumeur est composée principalement par des projections villeuses constituées d'un axe fibro-vasculaire bordé par des cellules épithéliales cubiques ou cylindriques contenant souvent des quantités variables de mucus. L'adénocarcinomes papillaire se développe d'abord dans la lumière vésiculaire, puis infiltre la paroi, ce qui explique son meilleur pronostic par rapport aux autres formes habituelles d'emblée infiltrantes. (Yamaguchi et al.,1997)

I .5.2.2.L'adénocarcinome de type intestinal :

Cette variante d'adénocarcinome est composée de glandes ou de structures villosités bordées par des cellules de type intestinal. Elle peut parfois comporter un nombre variable de cellules endocrines ou de cellules de paneth. (Albores et al.,1986)

I .5.2.3.L'adénocarcinome mucineux (ou colloïde muqueux) :

Il est caractérisé par une muco-sécrétion extracellulaire formant de nappes de mucus qui occupent au moins 50% de la tumeur. (Albores-Saavedra et al .,1991)

I .5.2.4.L'adénocarcinome à cellules claires :

C'est une tumeur rare. Elle est généralement constituée de cellules claires, riche en glycogène, à limite cytoplasmique nette et à noyaux hyperchromatiques. (Sugaya et al., 1989 ; Albores et al.,1986 ; Bittinger et al., 1995)

I .5.2.5.Le carcinome adénosquameux

Le carcinome adénosquameux est une tumeur à double composante maligne, glandulaire et épidermoïde. Le degré de différenciation des deux composantes peut varier, mais ils tendent généralement à être moyennement différenciés. La composante épidermoïde comporte souvent des cellules dyskératosiques (perles de kératine). Tandis que les glandes néoplasiques contiennent de la mucine.La particularité de cette tumeur est que sa composante épidermoïde a une capacité de prolifération deux fois plus rapide que celle de la composante glandulaire. (Nishihara et al., 1994 ; Suster et al.,1987).

I .5.2.6.Le carcinome épidermoïde :

Il s'agit d'une tumeur épithéliale maligne composée entièrement de cellules malpighiennes plus ou moins matures. Le degré de différenciation varie considérablement. L'épithélium peut être kératinisant ou non kératinisant. Dans certains cancers peu différenciés, il existe une prédominance des cellules fusiformes pouvant prêter confusion avec un sarcome. Dans ces cas, l'immunomarquage des cytokératines permet de redresser le diagnostic. Le carcinome épidermoïde peut se développer à partir d'une métaplasie malpighienne de l'épithélium biliaire. (Albores-Saavedra et al.,2000)

I .6.Généralités sur la protéine P53

La protéine P53 a été découverte en 1979 par Linzer et Levine, c'est un facteur transcriptionnel prépondérant dans la protection du génome. Couramment appelé « suppresseur de tumeur » et « gardien du génome », cette protéine est capable d'activer et de réprimer des gènes impliqués dans le processus biologique tels que le cycle cellulaire, l'apoptose et la réparation de l'ADN (Vogelstein B., *et al*, 2000 - Vousden KH., *et al*, 2002) . La p53 est l'un des marqueurs le plus étudié en cancérologie. Ainsi la p53 est réellement une des clés de régulation cellulaire aux stress écotoxiques. Sa réponse peut se faire par la voie de l'apoptose, vers la sénescence, ou l'arrêt du cycle cellulaire en activant des enzymes de réparation de l'ADN. Pour ces raisons, son altération entraîne le franchissement éventuel vers la cancérogène.

I .6.1. Structure de la p53

La p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 393 acides aminés, de poids moléculaire de 53KDa. Présente dans les cellules animales, la protéine p53 est un facteur de transcription (car elle se lie a une séquence spécifique de l'ADN). Elle se localise dans le noyau (Hammel et al , 2000 Bernardini et al.,2001 ; le blanc et al . , 2002 ; portefaix et al.,2006) . Elle est codée par le gène suppresseur de tumeur p53. Ce dernier est localisé sur le bras court du chromosome 17 de l'Homme, en position (17p13,1) reparti en 5 domaines (Weston et Godbolod .1997)

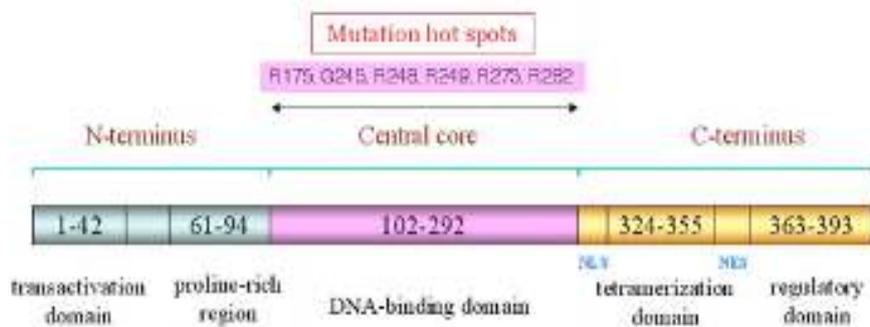


Figure 5 : Structure de la protéine p53(Bai et Wei-Guo Zhu,2006)

Principaux domaines sont ;

- le domaine N terminal : fortement acide, constitue des 100 premiers acides aminés.
Cette zone renferme le domaine d'activation de la transcription ainsi que le site de fixation aux produits de l'oncogène mdm (le blanc et al. ; 2002;portefaix et al. ;2006)
- le domaine central : domaine structural, composé des résidus 102-292 et fortement capable de se lier spécifiquement une séquence d'ADN retrouvée dans certains promoteurs de transcription (le blanc et al. ; 2002;portefaix et al. ;2006)
- le domaine C terminal : chargé positivement, et constitué par 300 à 393 acides aminés
Ce domaine renferme le domaine de tétramérisation et contenant aussi les domaines de translocation nucléaire NLS, NES nucléair exportation signal et le domaine de régulation de la p53 (le blanc et al. ; 2002;portefaix et al. ;2006)

I .6.2..Fonction de la p53

Le rôle précis de la p53 réside dans l'activation et l'inhibition d'expression de gènes qui sont impliqués dans nombreuses fonctions essentielles. Son activité est impliquée dans la régulation de processus tels que : le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la différenciation et la stabilité génomique, la sénescence et l'apoptose (Vousden et al., 2002 ; may et al., 1999)
Dans une cellule normale, la protéine P53 agit en trois phases.

➤ **Phase d'activation**

En absence de tout stress cellulaire, il y a que très peu de la p53 dans la cellule ; car elle n'est pas nécessaire dans le fonctionnement cellulaire. Cette absence de p53 est provoquée par son association avec l'onco-protéine MDM2 (Mouse Double minute 2) qui assure son transport du noyau vers le cytoplasme et sa dégradation par la voie ubiquitine - dépendante (Bernardini et al.,2001 ; Le blanc et al., 2002 ; Cressey et al ., 2006).

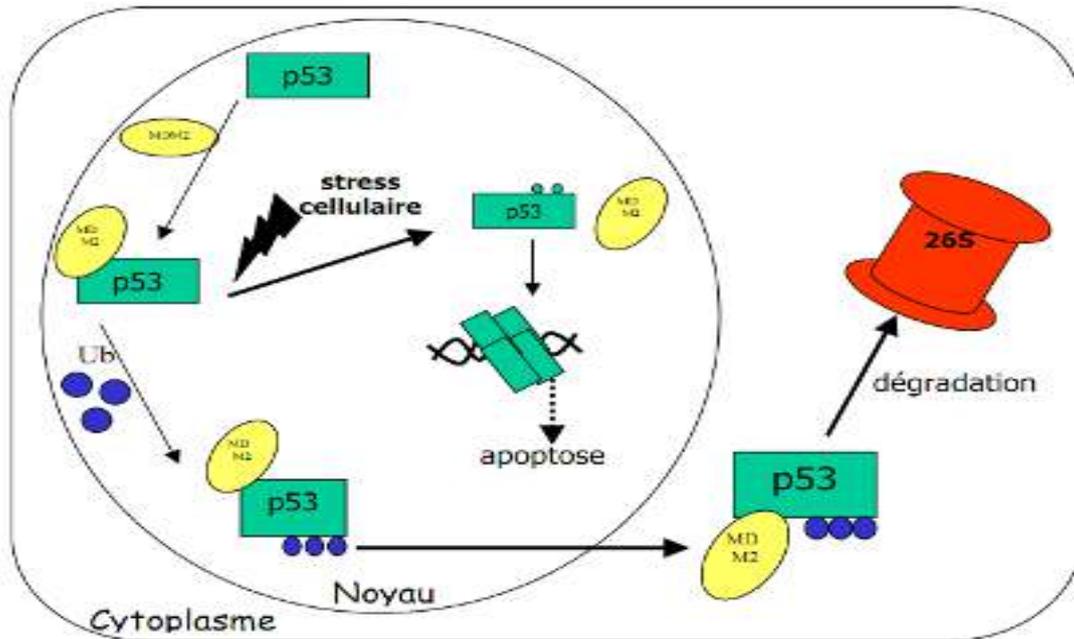


Figure 6 : Schématisation du rôle de MDM2 dans la voie de la P53 (Geoffrey, 2004)

Lorsque la cellule se trouve en situation de stress, l'association entre la p53 et mdm2 est abolie se qui conduit à une augmentation de la quantité de la p53 dans la cellule (Le blanc et al .,2002 ; Cressey et al ., 2006). De nombreux types de stress sont capables d'activer la p53 tels que l'exposition aux agents endommageant l'ADN, le déficit en nucléotides, les activations oncogéniques inappropriées, les défauts de division ou troubles du métabolisme cellulaire telle que l'hypoxie (Le banc et al .,2002).

➤ **Phase de modification**

Dans un 2^{ème} temps, la p53 va subir de nombreuses modifications post traductionnelles ayant pour conséquence l'accumulation d'une protéine p53 active sur le plan de la transcription (Le banc et al . ; 2002)

➤ **Phase de réponse**

Dans un 3^{ème} temps, la p53 activera la transcription d'un grand nombre de gènes l'ensemble de ces programmes pourra conduire à deux résultats ;

Un blocage transitoire du cycle cellulaire au niveau de la phase G1, juste avant la réplication de l'ADN. Il est généralement admis que cet arrêt de division cellulaire se voit après que l'ADN ait été endommagé.

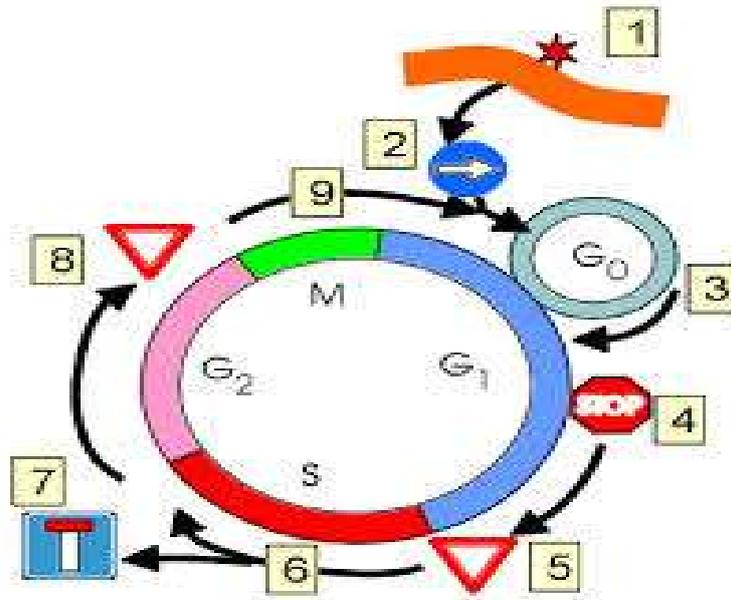


Figure 7:niveau d'introduction de la P53 dans le contrôle de cycle cellulaire (anonyme1)

En [1] sous l'influence de facteur de croissance, la cellule reçoit un signal de se diviser. En [2] Transmission du signal. En [3] les cellules sortent de G0 et progressent au delà d'un point de restriction [4] Si elles reçoivent un stimulus constant. En [5] il existe un point de contrôle, point d'intervention de la p53 ne laissant se diviser que l'ADN normal. En [6] la cellule double sa quantité d'ADN. En cas d'anomalie non réparable de l'ADN, elle évolue vers la mort [7] apoptose. En [8] il existe un nouveau point de contrôle avant la séparation du matériel génétique vers les deux cellules filles. En [9] La mitose s'accomplit les cellules filles se séparent et retournent en G0 sauf si un stimulus entretient le processus de division.

- ❖ Si aucune réparation de L'ADN n'a pu avoir lieu, la p53 sauvage induit l'apoptose des cellules dont l'ADN est endommagé. Les facteurs qui régissent ce choix « arrêt de cycle cellulaire /apoptose » ne sont pas connus à l'heure actuelle (Soussi et al . ;1999 ; Hammel et al . ;2000 ; bernardini et al . ; 2001 ; chapusot et al . ; 2001 ; le Blanc et al 2002 ; Cressey et al . ;2006 ; portefaix et al . ; 2006) .

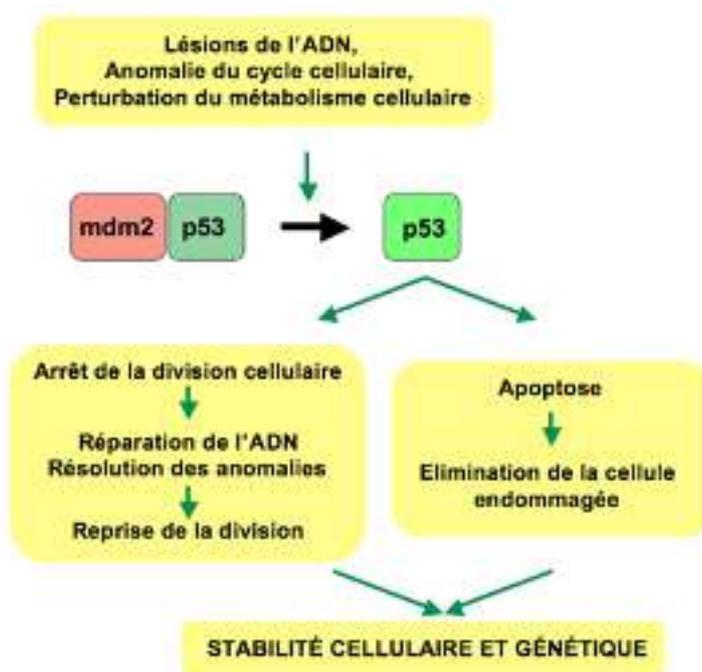


Figure 8 : Schéma montrant les mécanismes enclenchés par p53 en cas de lésions de l'ADN.(Anonyme 2)

Ces phénomènes sont inexistant dans les cellules tumorales expriment une p53 mutée dans ce cas cette dernière retrouvée a des niveaux cellulaires élevés du fait d'un allongement de sa demi vie (5-10h) c'est- a- dire qu'il n'y a ni arrêt du cycle cellulaire ni apoptose après que l'ADN ait été endommagé (Soussi,1999 ; Bernardini et al,2001; Piad et al .,2002 ;Cressey et al ., 2006 ; Portefaix et al .,2006) .

Ainsi, les mutations de p53 se trouvent dans la vaste majorité des cancers de la vésicule biliaire envahissantes (Wistuba et Albores-Saavedra,1999 ; Wistuba et al.,1995).Les altérations du gène p53 les plus fréquemment observées dans les cancers humains sont des mutations ponctuelles (faux sens : mutation d'un codon spécifiant un acide aminé en un codant spécifiant un autre acide aminé) localisées à l'intérieur de la séquence codante. Plus de 90% de ces mutations sont retrouvées entre les exons 5 et 8, et la plupart sont localisées dans les régions fortement conservées au cours de l'évolution. Il est possible de distinguer 4 points « hot-spot » situés sur les acides aminés 175, 248, 273 et 282 représentant 30% de mutations du gène p53 (Soussi, 1999; Bernardini et al,2001; Portefaix et al.,2006).

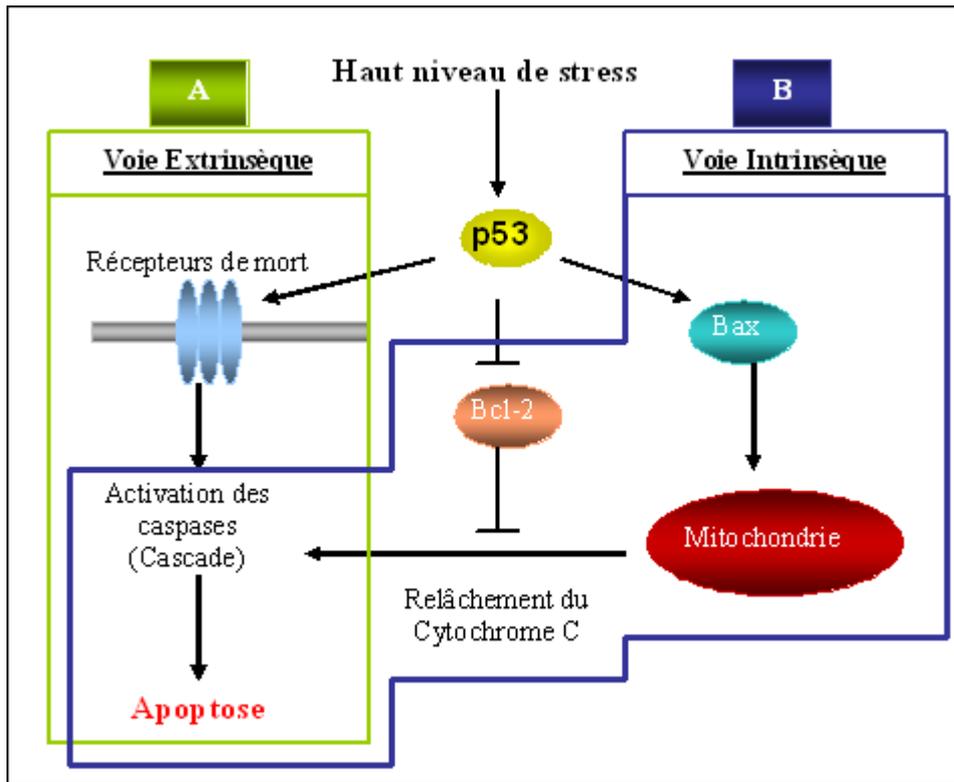


Figure 9 : Deux voies induites par p53 menant à l'apoptose caspases-dépendantes (Klein et Vassilev, 2004).

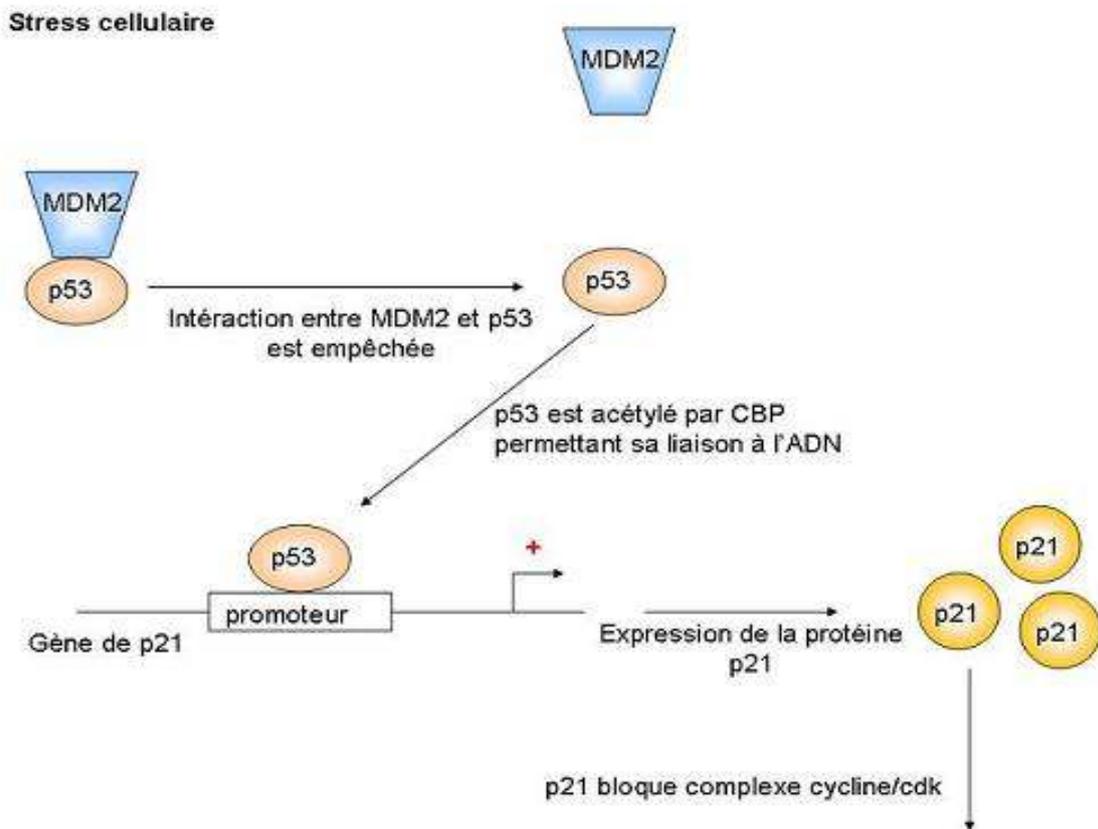
La voie extrinsèque implique la liaison d'un ligand de mort extracellulaire à un récepteur de mort, ce qui active la cascade des caspases. La voie intrinsèque est enclenchée lorsque des protéines pro-apoptotiques, telle que Bax, permettent le relâchement du cytochrome c à l'extérieur de la mitochondrie. S'en suit de l'activation des caspases.

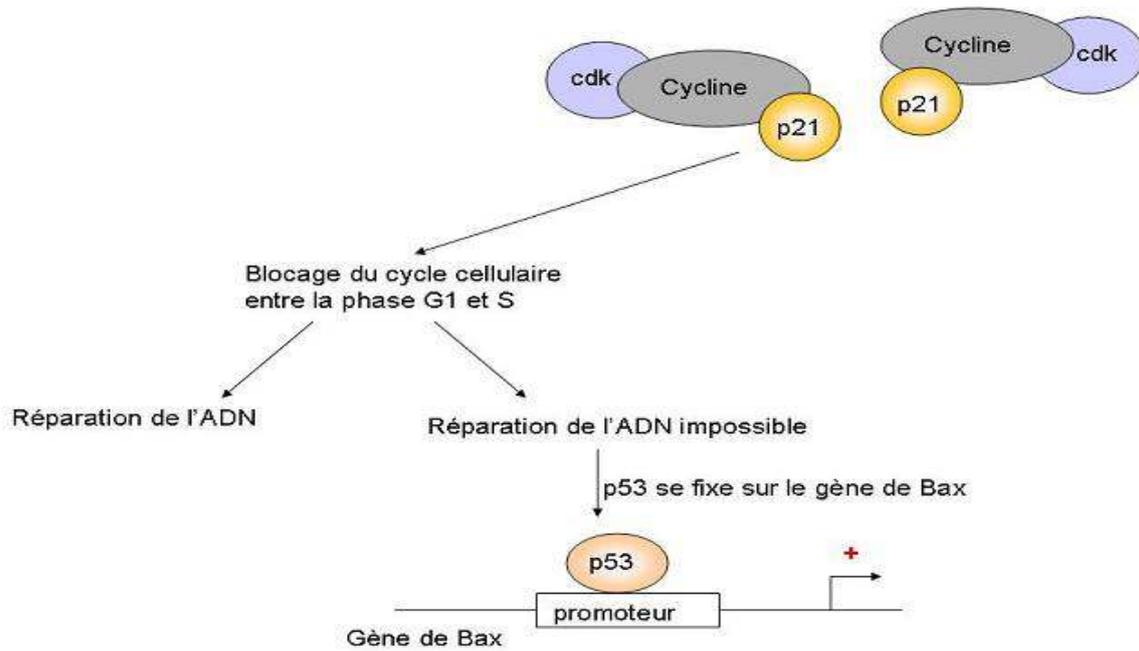
I. 6. 3. Mode d'action de la p53 (FARCY, 2006;Anonyme3)

En condition normale, la p53 se trouve en faible quantité. En effet la protéine MDM2 se fixe sur la partie NH2 terminale de la protéine p53 ce qui entraine sa dégradation via le protéasome.

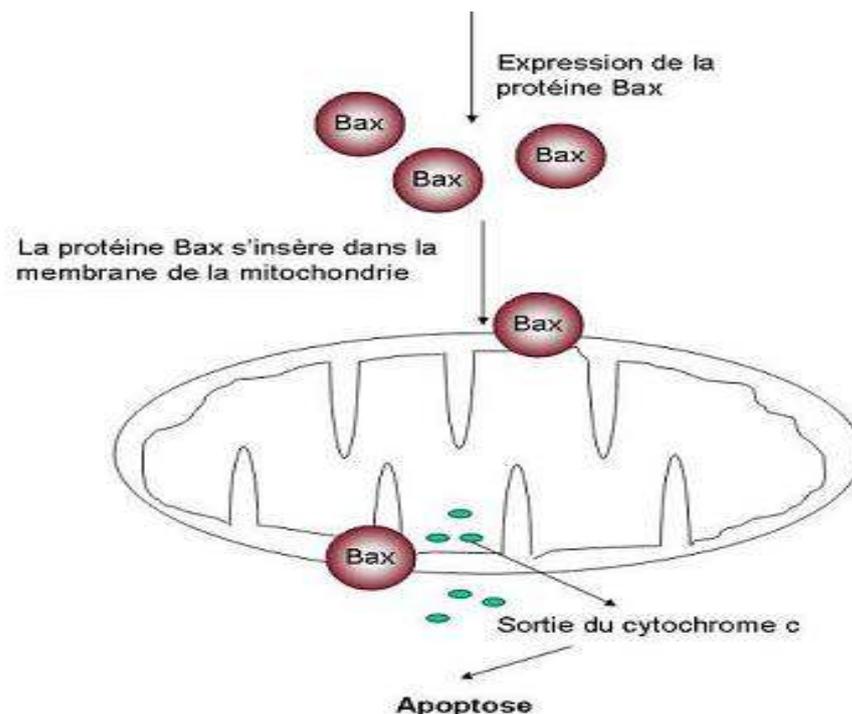
Cependant, lorsque la cellule subit un stress cellulaire (cassure de l'ADN, hypoxie, choc thermique), il existe des mécanismes contribuant à la stabilisation et l'augmentation de l'expression de p53.

Tout d'abord la protéine p53 change sa conformation de plus, l'interaction MDM2 /p53 est inhibée, libérant alors p53 sous une forme active. Ensuite p53 va être acétylée par CBP ce qui permet d'avoir accès à l'ADN et ainsi de s'y lier. En effet, la protéine p53 se fixe sur le promoteur du gène p21 afin d'activer l'expression de la protéine p21. Celle-ci inhibe tous les complexes cyclines/cdk. Ainsi p21 bloque le cycle cellulaire entre la phase G1 et S de façon transitoire afin de permettre aux différents systèmes de réparation de restaurer l'ADN et de poursuivre le cycle cellulaire.





Lorsque la réparation de l'ADN n'est pas possible, la protéine p53 dirige la cellule vers un processus de mort cellulaire l'apoptose. Pour se faire, la protéine p53 se fixe le promoteur de Bax (protéine pro -apoptotique) ce qui entraine l'expression de la protéine Bax. Celle -ci se fixe sur la membrane de la mitochondrie et permet alors la sortie du cytochrome c, entrainant l'apoptose de ces cellules.



En résumé ;

La protéine p53 est un facteur de transcription de localisation nucléaire. Suite à un endommagement de l'ADN cellulaire, la protéine p53 est stimulée et son taux augmente considérablement. Elle se fixe alors sur les séquences de l'ADN régulatrice permettant ainsi l'expression ou la répression de nombreux gènes (p21, mdm2, bax, gadd 45). Ces gènes permettent de bloquer la prolifération de la cellule de façon transitoire en bloquant l'interphase en phase G1-S. durant cet arrêt, des mécanismes réparateurs de l'ADN sont activés évitant ainsi la fixation des mutations qui surviendraient s'il y avait une réplication de l'ADN endommagée. En absence d'une réparation complète, la protéine p53 oriente la cellule vers l'apoptose. Yong-Tae Kim et al. (2001).

En effet, lorsque le gène qui code pour la protéine p53 subit une mutation, il n'y a plus d'action de blocage du cycle cellulaire ni d'orientation vers l'apoptose. La cellule réplique son ADN sans aucun contrôle, les mutations s'accumulent et la tumeur se développe.

Annexe 1 -Classification histologique des cancers de la vésicule biliaire

-La classification anatomopathologique de mise est celle de l'OMS 2000

❖ Tumeurs épithéliales

➤ **Carcinome :**

- Adénocarcinome
- Adénocarcinome papillaire
- Adénocarcinome type intestinal
- Adénocarcinome mucineux
- Adénocarcinome à cellules claires
- Carcinome à cellules indépendantes
- Carcinome adénoquameux
- Carcinome épidermoïde
- Carcinome à petites cellules
- Carcinome neuroendocrine à larges cellules
- Carcinome indifférencié
 - Tumeurs carcinoïdes
 - Carcinoïde à cellules en « Goblet »
 - Carcinoïde tubuleux
 - Carcinome mixte endocrine-exocrine
 - Autres

❖ **Tumeurs non épithéliales**

- Tumeurs à cellules granuleuses
- Leiomyosarcomes
- Sarcomes de Kaposi
- Lymphomes malins
- Autres

❖ **Métastases**

Annexe 3- Classification TNM UICC 2010

TNM

TNM signifie Tumeur, Nodes (terme anglais pour les ganglions lymphatiques) et Métastases. La classification TNM prend en compte :

- le degré d'envahissement de la paroi de la vésicule biliaire par la tumeur primitive et sa propagation dans des organes ou tissus voisins
- le nombre de ganglions lymphatiques régionaux qui contiennent des cellules cancéreuses et leur emplacement
- la propagation du cancer, ou métastases, vers un autre organe ou une autre partie du corps

Tumeur primitive (T)

TX	Impossible d'évaluer la tumeur primitive
T0	Aucun signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ – cellules cancéreuses observées seulement dans la couche interne (muqueuse) de la vésicule biliaire
T1	La tumeur a envahi la lamina propria ou la couche musculaire de la vésicule biliaire. T1a – La tumeur s'est propagée à la lamina propria. T1b – La tumeur s'est propagée à la couche musculaire.
T2	La tumeur a envahi le tissu conjonctif périmusculaire. Le cancer ne s'est pas propagé au delà de la séreuse ou au foie.
T3	La tumeur a traversé la séreuse de la vésicule biliaire ou bien le cancer s'est propagé au foie ou à l'une des autres structures ou l'un des autres organes voisins, dont l'estomac, le duodénum (première partie de l'intestin grêle), le côlon, le pancréas,

	l'épiploon ou les canaux biliaires situés à l'extérieur du foie (canaux biliaires extrahépatiques).
T4	La tumeur a envahi l'un des principaux vaisseaux sanguins qui mènent au foie (veine porte ou artère hépatique) ou bien le cancer s'est propagé à 2 organes voisins ou plus autres que le foie.

Ganglions lymphatiques régionaux (N)

NX Impossible d'évaluer les ganglions lymphatiques régionaux

N0 Absence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux

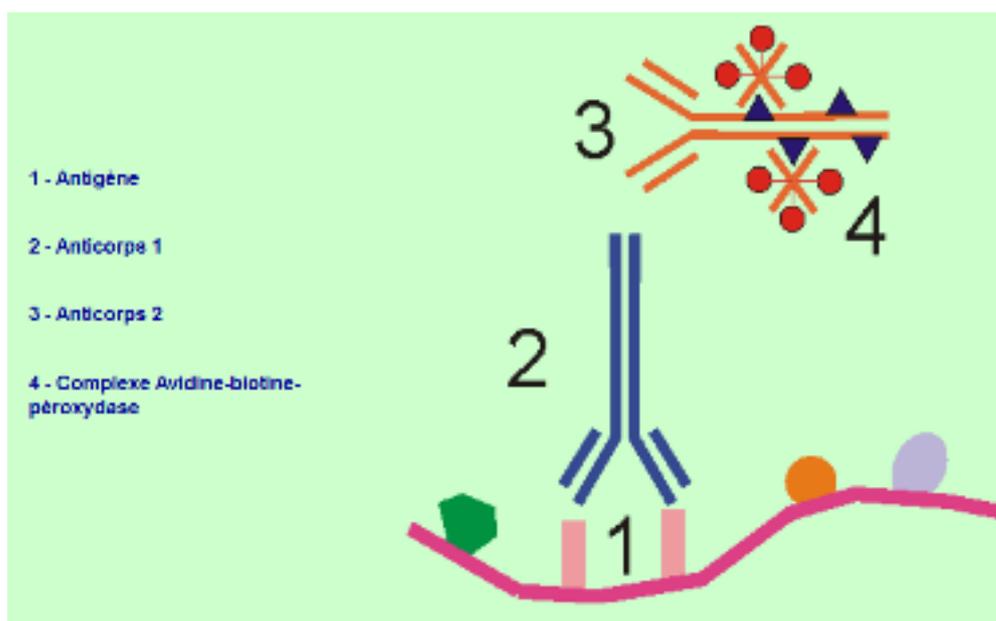
N1 Présence de métastases dans les ganglions lymphatiques régionaux

Métastases à distance (M)

M0 Absence de métastases à distance

M1 Présence de métastases à distance

Annexe 2 : principe de la technique immunomarquage



Annexe 4:

Matériel non biologique ;

Microtome

Lames de verre portes objet

Lamelles de verres couvres objet

Appareil d'inclusion

Dako pen

Micropipettes (1-10 ,10-100,100-1000)ul

Microscope optique

Colorateur automatique

Etuve

Produits

Alcool

Anticorps primaires (Monoclonal ,mouse (anti haumain) ,réf (IR616)

Anticorps secondaire .

Diluent

Eau distillé

Eosine

Hématoxyline

DAB (Liquide DAB+ substrat chromogène)

Formol 10%

Xylène

Liste des figures

	Page
Figure 1 : Anatomie de la vésicule Biliaire.....	2
Figure 2 : Structure des différentes couches histologiques de la vésicule biliaire.....	3
Figure 3 : Incidence du cancer de la vésicule biliaire dans le monde.....	4
Figure 4 : Adénocarcinome bien différencié de la vésicule biliaire.....	6
Figure 5 : Structure de la protéine p53	8
Figure 6 : Schématisation du rôle de MDM2 dans la voie de la p53.....	10
Figure 7 : Niveau d'introduction de la P53 dans le contrôle de cycle cellulaire.....	11
Figure 8 : Schéma montrant les mécanismes enclenchés par p53 en cas de lésions de l'ADN.....	12
Figure9 : Deux voies induites par p53 menant à l'apoptose caspases-dépendantes....	13
Figure10 :Répartition des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire en fonction d'un intervalle d'âge de trente ans. Avec des extrêmes allant de 42 à 80 ans.....	22
Figure 11 : Répartition des patients porteurs d'un cancer de la vésicule biliaire selon le sexe.....	23.
Figure 12 : Répartition des patients en fonction type histologique du cancer de la vésicule biliaire.....	24
Figure13 : Répartition des patients en fonction de stade de la tumeur du cancer de la vésicule biliaire.....	25
Figure 14 : Répartition des patients en fonction de l'expression de p53 dans le cancer de la vésicule biliaire.....	27
Figure 15 :Absence d'expression de p53 dans la muqueuse normale et très faible expression de p53 dans l'adénome papillaire.....	28
Figure 16 : Adénocarcinome bien différencié.....	29
Figure17 : Adénocarcinome moyennement différencié	30
Figure 18 :Adénocarcinome peu différencié.	31

Références bibliographique

- 1- Albores-Saavedra J, Henson DE, Klimstra DS et al . Tumors of the gallbladder . D.C.: Armed Forces Institute of Pathology; 2000.)
- 2- Albores-Saavedra, J. (1986): Tumors of the gallbladder and extrahepatic bile ducts: atlas of tumor pathology. Fasc, 22, Ser. 2, Washington, D.C.: Armed Forces Institute of Pathology.
- 3- Albores-Saavedra J, Henson DE, Klimstra D (2000). Tumors of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. Atlas of Tumor Pathology. Third series, AFIP: Washington, D.C.)
- 4- Albores SJ, Nadji M, Henson DE (1986). Intestinal-type adenocarcinoma of the gallbladder. A clinicopathologic study of seven cases. Am J Surg Pathol 10: 19-25.).
- 5- Albores-Saavedra J, Henson DE, Sobin LH (1991). WHO: Histological Typing of Tumours of the Gallbladder and Extrahepatic Bile Ducts. 2nd ed, Springer-Verlag: Berlin.
- 6- Bartoli et al , (2000)E, Capron JP. Epidémiologie et histoire naturelle de la lithiase biliaire. Rev Prat 2000, 50 : 2112-2116.)
- 7- Bittinger A, Altekruiger I, Barth P (1995). Clear cell carcinoma of the gallbladder. A histological and immunohistochemical study. Pathol Res Pract 191:1259-1265.
- 8- Copyright Johns Hopkins Hospital - Traductions Hepato web.com)
http://hepatoweb.com/Anatomie_vesicule.php
- 9- Chow WH, Johansen C, Gridley G, et al. Gallstones, cholecystectomy and risk of cancers of the liver, biliary tract and pancreas. Br J Cancer 1999;79:640-4.)
- 10- Cressay, R., Pimpa, S., Tontrong, W., Watananupong, O., Leatrprasertsuke, N., 2006, Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal adenocarcinoma is associated with p53 accumulation and MDM2 overexpression. cancer Letters, 223 :232-239
- 11- Del Pozo AC, DeBattista S, Velasco D, et al (2005) Epidermoid carcinoma of gallbladder: analysis of our casuistic. Acta Gastroenterol Latinoam 35:162–164)
- 12- Diehl, A. K. (1980): Epidemiology of gallbladder cancer: a synthesis of recent data. J. Natl Cancer Inst., 65: pp.1209–14) .

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 13- Duffy A, Capanu M, Abou-Alfa GK, et al. Gallbladder cancer (GBC): 10-year experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre (MSKCC). *J Surg Oncol* 2008; 98:485.)
- 14- Dabaja BS, Suki D, Pro B, Bonnen M, Ajani J . Adenocarcinoma of the bowel :presentation, prognostic factors, and outcome of 217 patients .*cancer* 2004 ;101 ;518-26).
- 15- Diehl AK. Gallstone size and the risk of gallbladder cancer. *JAMA* 1983;250:2323-6.
- 16- A ,Duffy,M ,Capanu,G.K.Abdou Alfa et al .Gallbladder cancer (GBC) :10-Year Experience at Memorial Sloan-Kettering Cancer Centre(MSKCC).*Journal of Surgical oncology* 2008 ;98-485-489.
- 17- Friedman LS, Roberts MS, Brett AS, et al. Management of asymptomatic gallstones in the diabetic patient. A decision analysis. *Ann Intern Med* 1988;109:913-9.
- 18- E . Felekouras , A. Petrou , K, Bramis et al. Malignant Carcinoid tumor of the cystic duct :a rare cause of bile duct obstruction ,*Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2009 ;8 :640-646
- 19- Geoffrey,M.,2004-Inhibition de la dégradation de p53 par le protéasome-Interaction MDM2-p53 :1-19P.
- 20- R.D.Goldin,J.Croc.Gallbladder cancer :a morphological and molecular update *Histopathology* 2009 :55,218-229
- 21- Hsing AW, Gao YT, Devesa S, et al. Rising incidence of biliary tract cancers in Shanghai, China. *Int J Cancer* 1998;75:368-70).
- 22- Henson DE, Albores-Saavedra J, Corle D. Carcinoma of the gallbladder. Histologic types, stage of disease, grade, and survival rates. *Cancer* 1992; 70: 1493–1497.) (. Geradts J, Ingram CD. Abnormal expression of cell cycle regulatory proteins in ductal and lobular carcinomas of the breast. *Mod Pathol.* 2000; 13(9):945-53.)
- 23- -Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (Eds.):*World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* IARC Press: Lyon 2000
- 24- J.P. DADOUNE. *Histologie. Médecine-Sciences Flammarion, Paris. 1990.*
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.1.4.2.html>

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 25- Journées Francophones d'Hépatogastroentérologie et d'Oncologie Digestive 2010
M Zins, I Boulay-Coletta, V Molinié ;Les Lésions Pariétales de la Vésicule Biliaire paris 2010 .
- 26- Kuroki T, Tajima Y, Matsuo K, Kanematsu T. Genetic alterations in gallbladder carcinoma. *Surg Today*. 2005; 35(2):101-5.).
- 27- Kim, Y. T., Kim, J., Jang, Y. H., Lee, W. J., Ryu, J. K., Park, Y. K., Kim, S. W., Kim, W. H., Yoon, Y. B., Kim, C. Y. (2001): Genetic alterations in gallbladder adenoma, dysplasia and carcinoma. *Cancer Lett*. 169: pp. 59–68.
- 28- Keng-Hao Liu, Ta-Sen Yeh, Tsann-Long Hwang et al. Surgical management of gallbladder Sarcomatoid Carcinoma. *World J Gastroenterol* 2009 April 21 : 15(15) :1876-1879
- 29- Lowenfels AB, Walker AM, Althaus DP, et al. Gallstone growth, size, and risk of gallbladder cancer: an interracial study. *Int J Epidemiol* 1989;18:50-4.)
- 30- L. Abid, S. berkane, F. Ali. Benamara. Cancer de la vésicule biliaire et coelioscopie. Hospital Bologhine Alger. Journées Nationales de Chirurgie. Tlemsan. Mars 2004.)
- 31- Levin B. Gallbladder carcinoma. *Ann Oncol* 1999; 10: S129–S130.)
- 32- Maringhini A, Moreau JA, Melton LJ, et al. Gallstones, gallbladder cancer, and other gastrointestinal malignancies. *Ann Intern Med* 1987;107:30-5.)
- 33- Modlin IM, Shapiro MD, Kidd M. An analysis of rare carcinoid tumors: clarifying these clinical conundrums. *World J Surg* 2005; 29:92-101.
- 34- Murphy KG, Bloom SR. Gut hormones and their regulation of energy homeostasis. *Nature* 2006;444: 854-9.
- 35- - Moerman CJ, Lagerwaard FJ, Bueno de Mesquita HB, et al. Gallstone size and the risk of gallbladder cancer. *Scand J Gastroenterol* 1993;28:482-6.)
- 36- Mainprize KS, Gould SW, Gilbert JM. Surgical management of polypoid lesions of the gallbladder. *Br J Surg* 2000; 87:414-417.
- 37- Nishihara K, Nagai E, Izumi Y Yamaguchi K, Tsuneyoshi M (1994). Adenosquamous carcinoma of the gallbladder: a clinicopathological, immunohistochemical and flow-cytometric study of twenty cases. *Jpn J Cancer Res* 85:389-399.
- 38- Piehler JM, Crichlow RW. Primary carcinoma of the gallbladder. *Surg Gynecol Obstet*. 1978; 147(6): 929-42.)
- 39- Pawlik TM, Gleisner AL, Vigano L, Kooby DA, Bauer TW, Frilling A et al. Incidence of finding residual disease for incidental gallbladder carcinoma : implications for re-resection. *J Gastrointest Surg* 2007;11:1478-86.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 40- Pr. A. Raisonier , Digestion – Détoxification ,2004 ;Université Pierre et Marie Curie
- 41- -Pr Martin Catala, Dr Jean Michel André et Pr Jacques Poirier.CHU Pitié Salpêtrière.
Histologie : organes, systèmes et appareils
<http://www.chups.jussieu.fr/polys/histo/histoP2/POLY.Chp.1.4.2.html>
- 42- - Ransohoff DF, Grassie WA, Wolfenson LB, et al. Prophylactic cholecystectomy or expectant management for silent gallstones. *Ann Intern Med* 1983;99:199-204.
- 43- Rustagi T, Dasanu CA. Risk factors for gallbladder cancer and cholangiocarcinoma: similarities, differences and updates. *J Gastrointest Cancer* 2011. [Epub ahead of print].
- 44- G.Randi ,S.Franceschi and C. la Vecchia .Gallbladder cancer worldwide : Geographical distribution and risk factors. *Int .J.cancer* :118,1591-1602(2006)
- 45- Registre des tumeurs de la wilaya d'Alger 2010.
- 46- Roa I, Araya JC, Villaseca M, Roa J, de Aretxabala X, Ibacache G. Gallbladder cancer in a high risk area: morphological features and spread patterns. *Hepatogastroenterology*. 1999;46:1540-6.
- 47- . Randi G, Franceschi S, La Vecchia C. Gallbladder cancer worldwide: geographical distribution and risk factors. *Int J Cancer* 2006; 118:1591-1602.
- 48- Sautereau D. Cessot F. Letard JC. Paraf F. Pillegand B. et Gainant A.Cancers des voies biliaires extrahépatiques, *encycl Méd Chir (Elsevier,Paris),Hépatologie, 7-057-A-10, 1998, 16p.)*
- 49- Strom BL, Soloway RD, Rios-Dalenz JL, et al. Risk factors for gallbladder cancer: an international collaborative case-control study. *Cancer* 1995;76:1747-56.
- 50- Shih SP, Schulick RD, Cameron JL, et al. Gallbladder cancer:the role of laparoscopy and radical resection. *Ann Surg* 2007;245: 893-901)
- 51- Silik YN,Douglass Jr Ho ,Nava HR ,Driscoll DL, Tartarian G . Carcinoma of the gallbladder . The Roswell Park experience . *Ann surg* A1989 ; 210 : 751-7.)
- 52- . Sugaya Y, Sugaya H, Kuronuma Y,Hisauchi T, Harada T (1989). A case of gallbladdercarcinoma producing both alphafetoprotein(AFP) and carcinoembryonic antigen (CEA). *Gastroenterol Jpn* 24:325-331.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 53- Suster S, Huszar M, Herczeg E, BubisJJ (1987). Adenosquamous carcinoma of the gallbladder with spindle cell features. A light microscopic and immunocytochemical study of a case. *Histopathology* 11:209-214
- 54- Stavros Gourgiotis, Hemant M. Kocher et al. Gallbladder cancer. *The American Journal of Surgery* (2008) 196, 252–264
- 55- Tewari M, Mishra RR, Shukla HS. Salmonella typhi and gallbladder cancer: report from an endemic region. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2010;9:524-30.
- 56- Urbach DR, Stukel TA, Rate of elective cholecystectomy and the incidence of severe gallstone disease, *CMAJ*, 2005;172:1015-1019
- 57- Yagyu K, Kikuchi S, Obata Y, et al. JACC Study Group. Cigarette smoking, alcohol drinking and the risk of gallbladder cancer death: a prospective cohort study in Japan. *Int J Cancer* 2008;122: 924-9.
- 58- Yong-Tae Kim et al. Genetic alterations in gallbladder adenoma, dysplasia and carcinoma. *Cancer Letters* 169 (2001) 59-68
- 59- Yamaguchi K, Chijiwa K, Saiki S, Shimizu S, Takashima M, Tanaka M (1997). Carcinoma of the extrahepatic bile duct: mode of spread and its prognostic implications. *Hepatogastroenterology* 44: 1256-126.
- 60- Vousden, KH, Lu X, 2002: live or let die: the cell's response to p53. *Nat Rev cancer*
- 61- Wistuba II, Sugio K, Hung J, Kishimoto Y, Virmani AK, Roa I, Albores SJ, Gazdar AF (1995). Allele-specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res* 55: 2511-2515).
- 62- Wistuba II, Albores-Saavedra J (1999). Genetic abnormalities involved in the pathogenesis of gallbladder carcinoma. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* 6:237-244
- 63- White, R. 1998. Tumor suppressor pathways. *Cell* 92: 591-592).
- 64- Wistuba, I. I., Sugio, K., Hung, J., Kishimoto, Y., Virmani, A. K., Rao, I., Albores-Saavedra, J., and Gazdar, A. F. Allele-specific mutations involved in the pathogenesis of endemic gallbladder carcinoma in Chile. *Cancer Res.*, 55: 2511–2515, 1995.)

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 65- Weston, A., Godbold, J.H., 1997-polymorphisms of H-ras-1 and p53 in Breast cancer and lung cancer : A Metaanalysis. Environmental Health Perspectives, volume 105
- 66- I.I. Wistuba and A.F. Gazdar . Gallbladder cancer : lessons from a rare tumour. Nature review cancer Volume 4 / September 2004 / 695.

ANONYME :

Anonyme 1 : la protéine p53. Site net : www.baclesses.fr-2006

Anonyme 2 : p53 et signalisation cellulaire, <http://fr.wikipedia.org>-200

Glossaire

Adénome : c'est une tumeur bénigne de l'épithélium glandulaire (néoplasie intra-épithéliale) qui est généralement polyploïde, unique et bien délimitée. Il est plus fréquent chez les femmes que chez les hommes. (Levy et al 2002) .

Adénocarcinome : Tumeur maligne développée aux dépens d'un épithélium glandulaire. Le terme est à distinguer de celui d'adénome qui désigne une tumeur bénigne développée aux dépens d'un épithélium glandulaire. En pratique, une tumeur est reconnue comme adénocarcinome lorsque son analyse microscopique anatomo-pathologique démontre un aspect de glande (tubes glandulaires) ou la présence de sécrétions mucineuses (muco-sécrétions). (Modlin et al .,2005).

Cholécystokinine :

C'est une hormone peptidique de 33 acides aminés .Sécrétée par la paroi du duodénum, lors de la digestion en présence de lipides, Il provoque la contraction de la vésicule biliaire, au début de la digestion. (Murphy et Bloom 2006) .

Cholecystite : C'est une inflammation de la vésicule biliaire, due en général à une obstruction du canal cystique (canal qui relie la vésicule biliaire au canal biliaire) par un calcul.(Urbach et Stukel,2004)