



UNIVERSITE SAAD DAHLEB –BLIDA

Faculté des sciences agro-vétérinaires et biologiques

Département de Biologie

MEMOIRE DU MASTER

En vue de l'obtention du diplôme de Master en biologie

Spécialité : Biosignalisation cellulaire et moléculaire, immunologie

INTERET IMMUNOHISTOCHIMIQUE DE LA P53 DANS LES CARCINOMES HEPATOCELLULAIRES

Par

Salima GUEZAIRI

Devant le jury composé de :

F. BENAZOUZ	Chargé de cours U.S.D.B	Présidente
L. SAAIDI	Chargé de cours U.S.D.B	Examinatrice
D. DAFFAIRI	Chargé de cours U.S.D.B	Examinatrice
H. AIT KACI	Maitre assistante en anatomie pathologie	Promotrice

Blida, Octobre 2010

Dédicace

Ce modeste travail est dédié tout d'abord à mes chers parents, les deux êtres que je chéris depuis ma tendre enfance. Ces deux êtres qui me procurent toute chose essentielle pour mon parcours de vie et que je ne cesse de prier pour eux en guise d'un simple merci. Qu'ils trouvent ici un modeste témoignage de ma profonde affection.

Ma dédicace s'adresse aussi à mon unique oncle AËK qui est mon deuxième père et mama Khedidja, pilier de ma vie.

*A mes sœurs Fatiha, Sihem et Samra
A mes frères surtout le petit Redha.
A mes belles sœurs Khadija et Wahiba.*

A Ramzi, Fadwa, Bilal, Meriem et Mohamed qui me fait énormément rire

A ceux qui m'ouvrent leurs cœurs avant leurs portes, Mr Ibrahim, Mme Kheira et leurs enfants.

*A mes grands-parents que je ne cesserais d'admirer et d'aimer.
A tous les membres de ma famille sans exception surtout mes cousines avec qui mes meilleurs moments sont partagés.*

A mes copines Aicha, Kenza et Ilhem pour tous nos moments passés ensemble.

Ce mémoire est dédié également à mes professeurs d'hier d'aujourd'hui et de demain, aux étudiants 2009/2010, aux étudiants BMCs, à tous les gens que je connais de près ou de loin, à ceux qui m'aiment.

Remerciements

Je remercie tout d'abord le bon Dieu qui m'a donné le courage, la volonté et la santé afin d'accomplir ce travail.

Je tiens à remercier ma responsable d'option Mlle SAADI L. pour son soutien, sa disponibilité et pour nous avoir dirigé tout au long des trois années.

Je tiens à remercier également la maîtresse assistante Dr AIT Kaci H. ma promotrice, pour son soutien et ses conseils qui m'ont grandement aidés dans la réalisation de la partie pratique de ce travail ainsi que sa disponibilité.

Je remercie les membres du jury : Melle SAADI, Mme BENAZOUZ et Mme DAFFAIRI d'avoir accepté d'examiner ce modeste travail.

Mes vifs remerciements vont à tous les enseignants du département de biologie.

Je remercie vivement Dr CHERID, pour son aide précieuse ainsi que tout le personnel du laboratoire central d'anatomie-pathologique du CPMC surtout Fatiha et Karima.

Mes vifs remerciements s'adressent également à Rachida, signe d'amitié et de fidélité.

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFP : Alpha foetoprotéine

CHC : carcinome hépatocellulaire

CPMC : Centre Pierre et Marie Curie

H₂O₂ : Hydroxide d'hydrogène

HBS : Hématoxyline binding site

HE : Hématoxyline Eosine

HM : Hématoxyline de Mayer

IHC : Immunohistochimie

KDa : Kilodalton

LSAB2 : Labeled Straptavidin-Biotin 2

PBS : Phosphate Buffered Saline

VHB : Virus de l'hépatite B

VHC : Virus de l'hépatite C

GLOSSAIRE

Altération génétique : anomalies génétiques, modification d'un ou de plusieurs gènes, dans tout ou une partie des cellules.

Aneuploïdie : désigne l'état d'une cellule ou d'un individu comportant un lot de chromosomes se caractérisant par la présence ou la perte d'un ou de plusieurs chromosomes entiers par rapport au lot normal de chromosomes de l'organisme, responsable d'un trouble, d'une malformation ou d'une maladie.

Carcinogénèse : naissance d'un cancer à partir d'une cellule transformée par plusieurs mutations.

Cirrhose : la destruction irréversible des cellules hépatiques. Elle se caractérise par l'existence de zones fibrosées et par la destruction des hépatocytes (cellules hépatiques).

Dépistage : ensemble d'examen et de tests effectués au sein d'une population apparemment saine afin de dépister une affection latente à un stade précoce.

Diagnostic : identification de la maladie.

Dysplasie : 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.

Fibrose : processus dégénératif se traduisant par l'envahissement d'un tissu ou d'un organe (foie, poumon ou rein, par exemple).

Gène : segment d'ADN porté par les chromosomes et qui détermine la transmission des caractéristiques héréditaires des êtres vivants.

Mutation : Modification survenant dans la séquence de l'ADN d'une cellule et pouvant entraîner la disparition d'un caractère préexistant ou l'apparition d'un caractère nouveau.

Polyploïde: des cellules possèdent un ou plusieurs jeux de chromosome en surnombre.

Pronostic : l'espérance de vie.

LISTE DES ILLUSTRATIONS, GRAPHIQUES ET TABLEAUX

Figure 1	Situation anatomique du foie	2
Figure 2	Ultrastructure du foie	3
Figure 3	Représentation histologique d'un foie cirrhotique	5
Figure 4	Séquence chronologique du développement d'un carcinome hépatocellulaire	8
Figure 5	La protéine p53 liée à l'ADN	10
Figure 6	Structure de la p53	11
Figure 7	p53 et signalisation cellulaire	12
Figure 8	Vue macroscopique d'un CHC	15
Figure 9	Les étapes de l'inclusion	17
Figure 10	Confection des coupes	17
Figure 11	Etallement des coupes	17
Figure 12	Méthode indirect (PAP)	19
Figure 13	Répartition des patients selon l'âge	21
Figure 14	Répartition des patients selon Le sexe	22
Figure 15	Répartition des patients selon le siège anatomique	22
Figure 16	Répartition des patients selon le type histologique	23
Figure 17	Tissu hépatique sein	24
Figure 18	CHC bien différencié	25
Figure 19	CHC moyennement différencié	26
Figure 20	CHC peu différencié	26
Figure 21	Immunomarquage nucléaire négatif	27
Figure 22	Immunomarquage nucléaire faible	27
Figure 23	Immunomarquage nucléaire positif	28
Figure 24	Forte positivité nucléaire des cellules tumorales	28

Tableau 1	Répartition des patients en fonction des facteurs étiologique	23
Tableau 2	Expression de la p53	28
Tableau 3	Variation de l'expression de la p53 selon le type histologique	29
Tableau 4	Variation de l'expression de la p53 en fonction de la taille tumorale	29

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION.....	1
I. DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES.....	2
I.1. Rappel sur le foie.....	2
I.2. Le carcinome hépatocellulaire.....	5
I.3. Aspect moléculaire de la p53.....	9
II. MATERIEL ET METHODES.....	14
II.1. Matériel.....	14
II.2. Méthodes.....	15
III. RESULTATS ET DISCUSSION.....	21
III.1. Résultats.....	21
III.2. Discussion.....	30
CONCLUSION.....	33
APPENDICES	
A. Matériel et méthodes	
B. Résultats et discussion	
REFERENCES	

RESUME

Les mécanismes moléculaires impliqués dans le développement des carcinomes hépatiques demeurent imparfaitement élucidés. Parmi les multiples molécules dont la mutation permet le développement et la progression des tumeurs hépatiques, la protéine facteur de transcription p53. Dans ce cadre, nous nous sommes proposé de rechercher la valeur pronostique de la protéine p53 par immunohistochimie dans les carcinomes hépatocellulaires. L'étude rétrospective réalisée sur 32 cas a montré que ces cancers étaient plus fréquents chez les hommes (62,5%) par rapport aux femmes (37,5%), avec une prédominance de la localisation du lobe droit (53,13%) suivie de celle du lobe gauche (46,87%). Le pronostic histologique a donné 35 % de carcinomes hépatocellulaires bien différenciés, 45 % de carcinomes hépatocellulaires moyennement différenciés et 20 % de carcinomes hépatocellulaires peu différenciés. Le marquage immunohistochimique de la protéine p53 réalisé sur 20 prélèvements, a révélé une surexpression de la protéine dans 65 % des cas ayant une tumeur supérieure à 2cm et 35 % des cas à une taille inférieure à 2cm. Ces résultats indiquent que la protéine p53 peut avoir une valeur pronostique péjorative dépendante du type histologique et de la taille tumorale du carcinome hépatique.

Mots clés : Carcinome hépatocellulaire ; la protéine p53 ; biologie moléculaire ; immunohistochimie ; mutation.

SUMMARY

Molecular mechanism implied in the development of hepatic carcinoma remains imperfectly elucidated. Among the multiple molecules whose mutation allows development and progression of hepatic carcinoma, the transcription factor p53 protein. In the present study, we propose to seek anatomopathological characteristics and to emphasize prognostic value of p53 protein by immunohistochemistry in hepatic carcinoma. Retrospective study of 32 cases showed that these cancers are more frequent in male (62.5 %) compared female to (37.5 %) with prevalence of localization (53.13%) followed that of the (46.87 %). Histological prognosis has given 28.12 % well differentiated hepatic carcinoma, 53.13 % fairly differentiated hepatic carcinoma and 18.75 % little differentiated hepatic carcinoma. Immunohistochemistry analysis realized on 20 cases has revealed an over expression of p53 protein in 65 % of cases in particular cases. These results indicate that p53 protein can have pejorative prognostic value depending on histological type and tumor's size of hepatic carcinoma.

Keywords: hepatic carcinoma; p53 protein; Mutation; Immunohistochemistry; Molecular biology.

ملخص

الآليات الجزيئية المتدخلة في تطور سرطانات الكبد ظلت غير واضحة. من بين الجزيئات المتعددة حيث الطفرة الوراثية تسمح بتطور و تفاقم هذه السرطانات، بروتين عامل النسخ *p53*. في هذا الإطار، اقترحنا دراسة الخصوصيات التشريحية المرضية و استخراج القيمة التشخيصية للبروتين *p53* بطريقة كيمونسيجية مناعية. الدراسة الاسترجاعية المجراة على 32 حالة أظهرت أن هذه السرطانات أكثر انتشارا عند الرجال (62.5 %) مقارنة بالنساء (37.5%)، مع غالبية التمركز علي مستوى الجهة اليمنى (53.13%) تليها الجهة اليسرى (46.87 %). التقييم النسيجي أعطى 35 % جيد التمايز، 45% متمايز نسبيا و 20 % قليل التمايز. التحليل كيمونسيجي مناعي للبروتين *p53* المجرى على 20 حالة كشف وجود كمية مفرطة من البروتين في 65 % من الحالات لا سيما الحالات ذوات درجة انتشار الورم والأطوار و التي حققت نسب من الايجابية التي تفوق 2سم و 35% لها حجم اصغر من 2 سم. هذه النتائج أظهرت أن البروتين *p53* يمكن أن يكون لديها دور سلبى متعلق بدرجة انتشار الورم الخبيث ومراحل تطور سرطان الكبد .

الكلمات المفتاحية : سرطان الكبد، عامل النسخ *p53* ، البيولوجيا الجزيئية، التحليل كيمونسيجي مناعي، طفرة

INTRODUCTION

Le carcinome hépatocellulaire (CHC) est un problème de santé publique (**katarzyna et al., 2009**). A l'échelle mondiale, il vient au cinquième rang des tumeurs en terme de fréquence et au quatrième rang en terme de mortalité (**Monge, 2006**).

Le CHC est la tumeur épithéliale la plus fréquente des tumeurs malignes primitives du foie (90%) qui se développe à partir des hépatocytes dont l'incidence est en progression, ce qui pose de gros problèmes thérapeutiques car elle survient le plus souvent sur une cirrhose et en raison du nombre important de sujets infectés par le VHC ((**Treut et al., 2000**).

Les CHC évoluent par étapes successives, bien individualisables, passant successivement par les étapes d'hépatopathie chronique active, cirrhose, macronodule de régénération, dysplasie hépatocytaire puis carcinome hépatocellulaire (**Roger et al., 2005**).

La caractérisation des altérations génétiques associées au CHC est une étape indispensable pour une meilleure compréhension de l'oncogenèse hépatique ce qui permettra d'envisager de nouvelles applications thérapeutiques (**Roger et al., 2005**).

Les altérations du gène suppresseur de tumeur *p53* et de son produit d'expression, la protéine p53 constituent l'événement génétique le plus fréquent, tous cancers humains confondus (**Hammel et al., 2000 ; Chapusot et al., 2001 ; Cressey et al., 2006 et Portefaix et al., 2006**). La mise en évidence d'une accumulation intratumorale de la protéine p53 par immunohistochimie dans les CHC est actuellement réalisable en routine dans les laboratoires d'anatomie pathologique ainsi que le dosage de certains marqueurs tumoraux est insuffisant pour diagnostiquer une tumeur hépatique. Pour cela on voulait chercher le statut de la p53 dans les CHC.

Le but de notre étude est d'évaluer l'expression de la protéine P53 dans les carcinomes hépatocellulaires par immunohistochimie et de rechercher une éventuelle corrélation entre l'expression de la protéine P53 et quelques paramètres clinicohistologiques.

I.1. Rappels sur le foie :

I.1. 1. Description anatomique :

Le foie est l'organe le plus volumineux de l'organisme. Sa forme générale est triangulaire. Il est situé dans sa plus grande partie du côté droit de la cavité abdominale juste au dessus du duodénum, il est divisé en quatre lobes par des septa fibreux (**Monge, 2006**). Il occupe tout l'hypochondre droit et s'étend dans l'épigastre, et dans l'hypochondre gauche. Chez le nouveau-né, il occupe les 2/5 de l'abdomen (**Stevens et al., 2004**) (Figure 1.1).

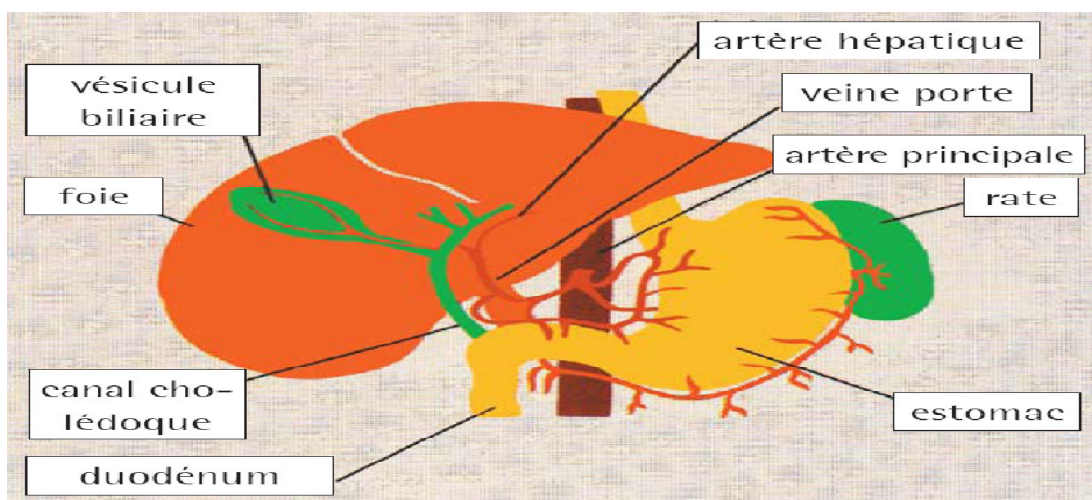


Figure 1.1 : Situation anatomique du foie (**Stefen, 2007**).

I.1.2. Vascularisation:

L'apport sanguin hépatique est double : par la veine porte qui draine le territoire splanchnique (veine splénique, veine mésentérique supérieure et veine mésentérique inférieure) et apporte les 2/3 du volume sanguin hépatique et par l'artère hépatique issue du tronc cœliaque (**Stevens et al., 2004**).

I.1.3. Organogénèse :

Le foie se forme au début de la quatrième semaine, à partir d'une invagination de l'épithélium terminal du proentéron, le diverticule hépatique glandulaire de l'intestin primitif (**Kamina et al., 2000**).

I.1.4. Histologie :

Le foie est constitué de cellules hépatiques (hépatocytes) organisées en travées autour des sinusoides. L'unité fonctionnelle du foie est le lobule hépatique. Ses échanges avec le reste du corps se font pour la plupart à travers sa double irrigation sanguine (veine porte et artère hépatique) qui se termine par une multitude de capillaires jusqu'à l'intérieur du foie, 80 % des cellules du foie sont des hépatocytes mais il existe d'autres types Cellulaires : cellules des canaux biliaires ; cellules de Küppfer (macrophage) ; cellules endothéliales ; cellules de Ito (fonction métabolique de la vitamine A et des lipides, et fabrique la matrice extra-cellulaire autour de cellules endothéliales) ; lymphocytes hépatocytaires, cellules ovales (cellules pluripotente) qui ont une fonction de régénération des hépatocytes et endothéliales (Lovel *et al.*, 2003) (Figure 1.2).

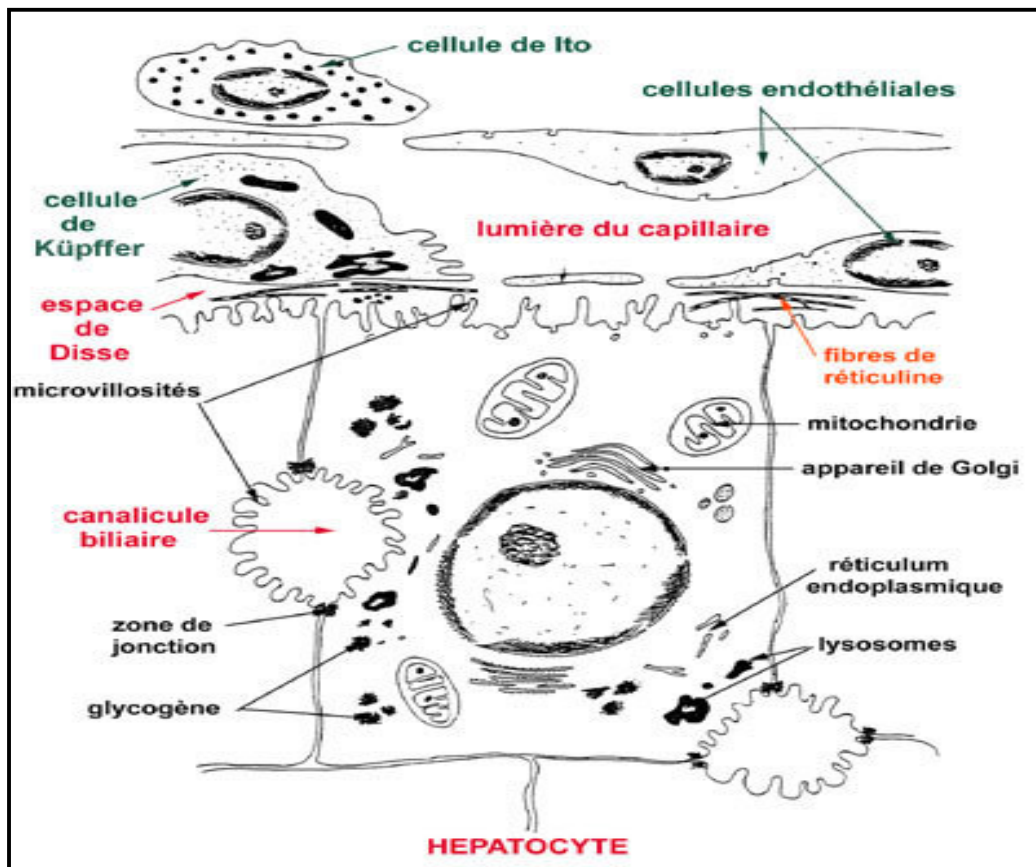


Figure 1.2 : Ultrastructure du foie (Anonyme 1)

I.1.5. Physiologie :

D'après (Cambus, 2002, Wheater et al., 2004), le foie est très richement vascularisé et assure plusieurs fonctions importantes.

C'est l'organe principal du maintien de la glycémie, par la réserve de glucose sous forme de glycogène. Il aide à digérer les graisses :

- En sécrétant la bile, qui est ensuite déversée dans le duodénum.
- En synthétisant des apoprotéines qui permettent le transport des lipides.

Il synthétise l'urée, l'albumine, les protéines de l'hémostase (fibrinogène, facteurs prothrombiniques), les protéines de transport spécifiques, les protéines de l'inflammation, certains facteurs de croissance, le cholestérol et joue un rôle majeur dans la détoxification du sang et dans le stockage des vitamines (Mange, 2006).

I.1.6. Les altérations du foie : (Monge, 2006)

➤ **Maladie de Caroli ou fibrose hépatique congénitale :**

C'est une anomalie peu fréquente, caractérisée par des kystes multiples.

➤ **La cirrhose :**

C'est une affection irréversible et diffuse du foie caractérisée par une fibrose cicatricielle évolutive ou non qui désorganise l'architecture lobulaire normale. Les conséquences sont : une hypertension portale, une insuffisance hépatique liée à la diminution de nombre d'hépatocytes et un état précancéreux du fait de la fréquence de développement de CHC sur un foie cirrhotique (Figure 1.3).

➤ **L'hyperplasie nodulaire focale (HNF) :**

C'est une transformation de nodule, unique ou multiple, développée à partir des hépatocytes. Elle survient le plus surtout chez la femme (90%). L'hyperplasie nodulaire focale (HNF) du foie est une lésion bénigne. Elle est plus fréquente chez la femme. L'hyperplasie nodulaire focale du foie apparaît comme une masse bien délimitée. Les hyperplasies nodulaires focales peuvent coexister avec d'autres lésions bénignes du foie comme les hémangiomes ou les adénomes hépatiques (Kottke et al., 2007).

I.2. Le carcinome hépatocellulaire :

I.2.1. Définition :

C'est la tumeur épithéliale la plus fréquente des tumeurs malignes primitives du foie (90%). Elle est hyper vascularisée et se développe à partir des hépatocytes (**Monge, 2006**).

Le foie est masqué par le rebord chondro-costal, seuls les CHC de taille importante peuvent être découverts à l'examen clinique (**Frédéric et al., 2002**). Par ailleurs, la réserve fonctionnelle hépatique est suffisante pour masquer pendant longtemps les perturbations biologiques produites par le CHC (**Catheline et Champault, 2000**).

Le plus souvent les CHC de petites tailles sont asymptomatiques. Ils peuvent être découverts lors d'examen de dépistage ou par hasard lors d'une échographie ou d'une tomodensitométrie abdominale. La plupart des CHC découverts sur des signes cliniques sont de taille très importante. Le patient peut présenter des douleurs de l'hypochondre droit avec une irradiation dans l'épaule. L'examen clinique peut percevoir le bord antérieur du foie dur et irrégulier en raison de la tumeur et de la cirrhose associée (**Saffroy et al., 2006**).

I.2.2. Population à risque :

- Age : supérieur à 55 ans.
- Sexe: masculin
- Patients cirrhotiques : en France, 90% des CHC surviennent sur une cirrhose quelle qu'en soit l'étiologie. L'incidence de dégénérescence de la cirrhose est de l'ordre de 2-5% par an.

Les principaux facteurs prédisposant sont :

- ✓ L'alcool : c'est le principal facteur de risque aux Etats –Unis et dans les autres pays où l'incidence de l'hépatite est plus faible (61,4%).
- ✓ Infection chronique de l'hépatite B ou C. le traitement de l'hépatite C par l'interféron diminue le risque, lorsque le patient est sensible à cette thérapeutique.
- ✓ Association alcool-virus de l'hépatite
- ✓ Exposition à l'aflatoxine B1 : une toxine produite par un champignon contaminant les céréales des pays chauds et humides (surtout en Afrique).

- CHC sur foie sain : le cancer primitif sur foie sain est exceptionnel. Il peut être favorisé par des carcinogènes chimiques (**Monge, 2006**).

I.2.3. Epidémiologie :

- Incidence :

L'incidence du CHC est de 3 à 6 /100 000 par an et quatre mille nouveaux cas par an en France (Jean-Claude., 2010). Plus fréquent chez l'homme, son incidence augmente avec l'âge avec une fréquence maximale variable en fonction des régions (40 ans en Afrique, 50 ans en Asie, 60 ans en Europe). L'incidence pourrait augmenter en France jusqu'en 2020 surtout chez les hommes de plus de 60 ans en raison de l'épidémie d'hépatite C. Il apparaît en Europe le plus souvent sur un foie cirrhotique (85 % des cas) avec une incidence de 3 à 5 % par an (VHC > VHB, alcool) (**Monge, 2006**).

Le carcinome hépatocellulaire devient une tumeur fréquente dans les pays développés en raison notamment de la propagation du virus de l'hépatite C (VHC) (**Saffroy et al., 2006**).

- Etiologie :

Les principaux facteurs étiologiques sont : en Asie du sud-est et Afrique, les hépatites B ; en Egypte, au Japon et en Europe du Sud, les hépatites C et en Europe du Nord, l'alcool et les hépatites C. En France, l'alcool est mis en cause chez 60% des patients (**Huynh-Charlier et al., 2009**). La surveillance des personnes à risque repose sur le dosage de l'alpha-foetoprotéine et l'examen aux ultrasons.

La détection précoce de la fibrose hépatique est possible avec des méthodes non invasives comme le Fibroscan et le Fibrotest (**Monge, 2006**). La prévention contrôle des dons de sang, de même que sur l'asepsie des injections pour l'infection HCV (**Lambert et al., 2009**).

I.2.4. Anatomie pathologique :

Sur le plan macroscopique, en fonction des rapports avec le parenchyme hépatique de voisinage, on distingue des CHC à développement extra hépatique appendus à la surface du foie par un pied vasculaire, des CHC encapsulés qui repoussent en périphérie les

structures vasculaires du foie de voisinage et les CHC infiltrants qui envahissent rapidement les structures vasculaires de voisinage. Cette classification à des implications sur le plan de l'aspect radiologique et sur le plan thérapeutique (**Mainguene et al., 2002**).

Le même auteur signale que sur le plan microscopique, en fonction du degré de différenciation on distingue des CHC bien, moyennement ou peu différencié. Cette classification n'a pas de valeur pronostique. Il faut individualiser le CHC fibrolamellaire qui est toujours encapsulé. Il est de meilleur pronostic et survient chez des adultes jeunes ne présentant pas de cirrhose et ayant un taux d'alpha foetoprotéine (AFP) normal.

Le CHC peut exister sous une architecture : Trabéculaire, pseudoglandulaire, compact, squirrheux ou fibrolamellaire (**Mainguene et al., 2002**).

I.2.5. Mécanisme de l'hépatocarcinogénèse :

L'oncogénèse hépatique répond au critères d'un processus multi-étapes. En effet, les différents facteurs de risque de CHC induisent des lésions d'hépatites chroniques active qui, au cours du temps, peuvent évoluer vers la cirrhose (**Roger., 2005**). Dans plus 85% des cas, les CHC se développent sur un foie cirrhotique ou présentant des lésions d'hépatites chroniques active. Des modifications de l'expression de gènes peuvent résulter de l'action de certaines protéines virales. Par exemple, au cours de l'infection chronique par le VHB, l'antigène viral se lie et inactive fonctionnellement le suppresseur de tumeur p53 (**Saffory et al., 2004**).

Par ailleurs, des altérations structurelles de l'ADN telles que mutations, amplifications et délétions apparaissent également dès les stades prénéoplasiques et s'accroissent ensuite dans les hépatocytes dysplasiques et le CHC (**Roger., 2005 ; Saffory et al., 2004**).

D'une manière générale, chaque événement génétique ou épigénétique pris isolément n'apparaît pas suffisant pour induire le phénotype malin d'un hépatocyte. C'est l'accumulation de plusieurs de ces événements, dans des combinaisons critiques pour la cellule, qui permettra ce passage, chaque tumeur présentant typiquement et de façon simultanée plusieurs altérations structurelles sur plusieurs gènes et chromosomes (**Roger, 2005**) (Figure 1.4).

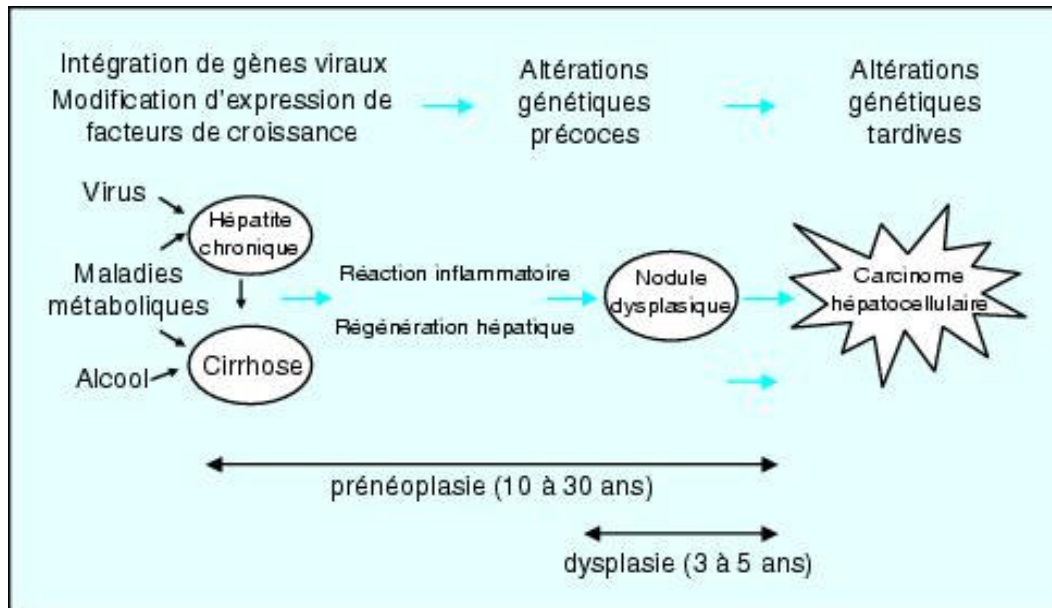


Figure 1.4 : Séquence chronologique du développement d'un carcinome hépatocellulaire (Saffory *et al.*, 2004).

I.2.6. Biologie moléculaire du carcinome hépatocellulaire :

D'après Saffory *et al* (2004), le foie humain normal contient 10 à 40 % de cellules polyploïdes dont 10-15 % sont binuclées. Une dédifférenciation et une augmentation de la capacité proliférative des hépatocytes, en particulier dans un CHC, se traduit par un taux plus important de cellules diploïdes. (Anti et ses collaborateurs ont mis en évidence ces altérations dès le stade d'hépatite chronique, de cirrhose ou au sein de nodules hyperplasiques adénomateux. Le renouvellement rapide des hépatocytes s'accompagne d'un risque d'erreurs génétiques augmenté avec parfois apparition d'une aneuploïdie.

L'étude du taux de cellules diploïdes et de l'existence d'aneuploïdie sur des biopsies de nodules de foies cirrhotiques pourrait être utile à leur prise en charge en déterminant un risque accru de dégénérescence.

En plus l'hépatocyte tumorale se caractérise par :

- Une prolifération incontrôlée
- Une perte de l'inhibition de contact et perte de fonction
- L'apoptose
- Le caractère invasif
- La métastase

I.2.7. Dépistage :

Parce que la population à risque est parfaitement définie (patients avec hépatite chronique ou Cirrhose), le dépistage ciblé pourrait se faire par une échographie tous les six mois chez les malades de plus de 55 ans atteints de cirrhose alcoolique, virale B ou C. En plus, le dépistage repose aussi sur le dosage de l'AFP qui peut servir de marqueur complémentaire lorsque sa valeur est inférieure à 500 ug/l (**Monge, 2006**).

I 2.8. Diagnostic du CHC :

Il est habituellement envisagé après la découverte d'une lésion focale nodulaire hépatique à l'échographie, ou à l'occasion de symptômes en cas de tumeur évoluée. Le scanner hélicoïdal avec triple acquisition artérielle, parenchymateuse et portale et l'IRM sont les deux examens de référence ; le signe le plus évocateur de CHC est l'existence d'un nodule hypervascularisé au temps artériel précoce (**Bai et al., 2006**)

I 2.9. Traitement :

La transplantation hépatique: C'est le traitement idéal à la fois de la tumeur et de la cirrhose associée mais l'augmentation du délai d'attente en raison de la pénurie des greffons et les contre indications fréquentes (âge, état physiologique...) limitent ce traitement (**Barbare et al., 2006**).

La chimioembolisation: Elle consiste à injecter par voie artérielle hépatique une émulsion de lipiodol pour boucher l'artère nourricière principale de la tumeur afin de la priver de son apport sanguin et de provoquer sa nécrose. La radiothérapie et la chimiothérapie sont habituellement inefficaces (**Adrian et al., 2005**).

I.3. Aspect moléculaire de la p53 :

I.3.1. Définition :

La protéine p53 est une phosphoprotéine de 393 acides aminés de poids moléculaire 53 kDa. On la trouve en très petite quantité dans les cellules normales, mais en grande abondance dans les cellules transformées en culture ou dans les tumeurs humaines (**Watson, 2005 et Portefaix et al., 2006**) (Figure 1.5).

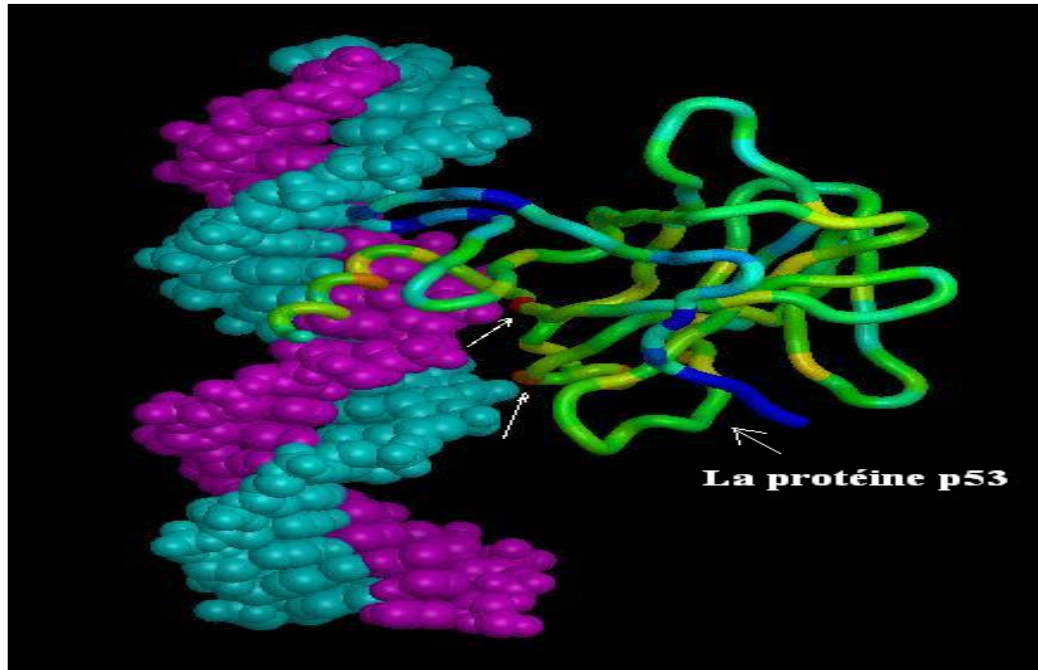


Figure 1.5 : La protéine *p53* liée à l'ADN (Martin *et al.*, 2002).

I.3.2. Structure :

Selon (Le Blanc *et al.*, 2002 et Portefaix *et al.*, 2006), la protéine *p53* est organisée en trois domaines structuraux distincts : (Figure 1.6)

- Une partie N-terminale fortement acide constituée des 100 premiers acides aminés. Cette zone renferme le domaine d'activation de la transcription ainsi que le site de fixation au produit de l'oncogène MDM2.
- Une partie centrale composée des résidus 102-292 et formant un domaine structural capable de lier spécifiquement une séquence d'ADN retrouvée dans certains promoteurs de transcription. Ce domaine, résistant à la protéolyse est replié de façon indépendante. Il nécessite la présence d'un ion Zn^{++} pour son activité.
- Une partie C-terminale, chargée positivement est constituée par 300 à 393 acides aminés. Ce domaine renferme le domaine de tétramérisation de la protéine (résidus 324 à 355), les signaux de localisation nucléaire de la *p53* et un domaine de régulation négative de l'activité de fixation spécifique à l'ADN (résidus 368 à 393).

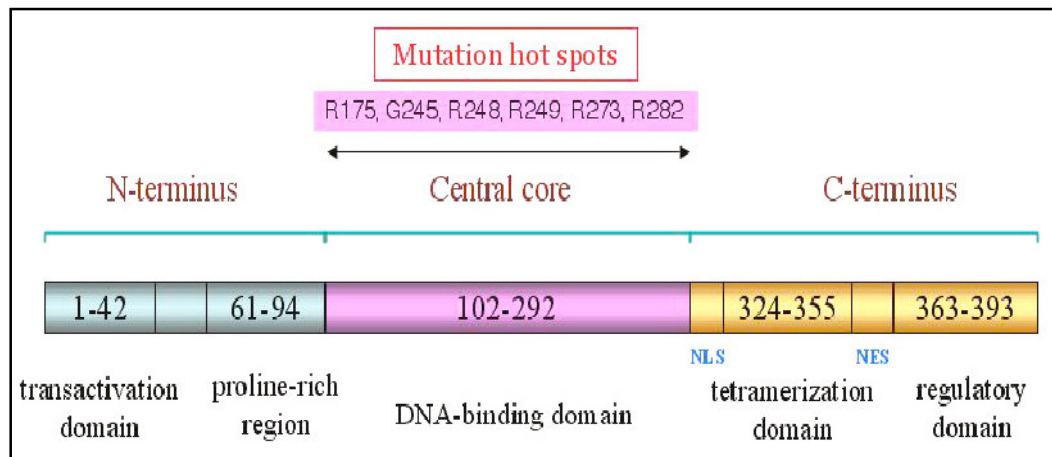


Figure1.6 : Structure de la p53 (Bai *et al.*, 2006).

I.3.3. Fonctions :

Le gène p53 a la réputation d'être le gardien du génome car il a pour fonction d'adapter la prolifération ou la mort des cellules en réponse à des agents capables de léser l'ADN. Il est situé en position sur le chromosome 17p13.1. Le gène a été très conservé pendant l'évolution. La protéine p53 au cours de la différenciation cellulaire (Bernardini *et al.*, 2001 ; Le blanc *et al.*, 2002 et Cressey *et al.*, 2006).

La p53 est une protéine impliquée dans la réparation de l'ADN ou l'induction de l'apoptose après un stress cellulaire. C'est l'un des marqueurs biologiques les plus étudiés en cancérologie; malgré le nombre de publications sur la p53, le niveau de preuve semble insuffisant pour l'utiliser en clinique comme facteur prédictif de réponse ou comme facteur pronostique (Bernardini *et al.*, 2001 ; Chapusot *et al.*, 2001 ; Le blanc *et al.*, 2002 et Piard *et al.*, 2002).

I.3.4. Mécanisme d'action :

Lorsque la cellule se trouve en situation de stress, l'association entre p53 et MDM2 est abolie ce qui conduit à une augmentation de la quantité de p53 dans la cellule (Le blanc *et al.*, 2002 et 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 de métabolisme cellulaire et l'hypoxie (Le blanc *et al.*, 2002).

Dans un second 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 blanc et al., 2002).

Le même auteur signale qu'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 la division cellulaire après que l'ADN ait été endommagé, est mis à profit par la cellule pour induire une réponse de type SOS qui présente la propriété de convertir certaines lésions pouvant être létales en mutations qui seront éventuellement détectées et réparées dans des cellules viable.

Si aucune réparation de l'ADN n'a pu avoir lieu, la p53 sauvage induit l'apoptose des cellules dont l'ADN est endommagé, conduisant ainsi à l'élimination de ces cellules. Les facteurs qui régissent ce choix "arrêt du cycle cellulaire / apoptose" ne sont pas connus à l'heure actuelle (Soussi, 1999 ; Hammel et al., 2000 ; Bernardini et al., 2001 ; Chapusot et al., 2001 ; Le blanc et al., 2002 ; Cressey et al., 2006 et Portefaix et al., 2006). (Figure 1.7)

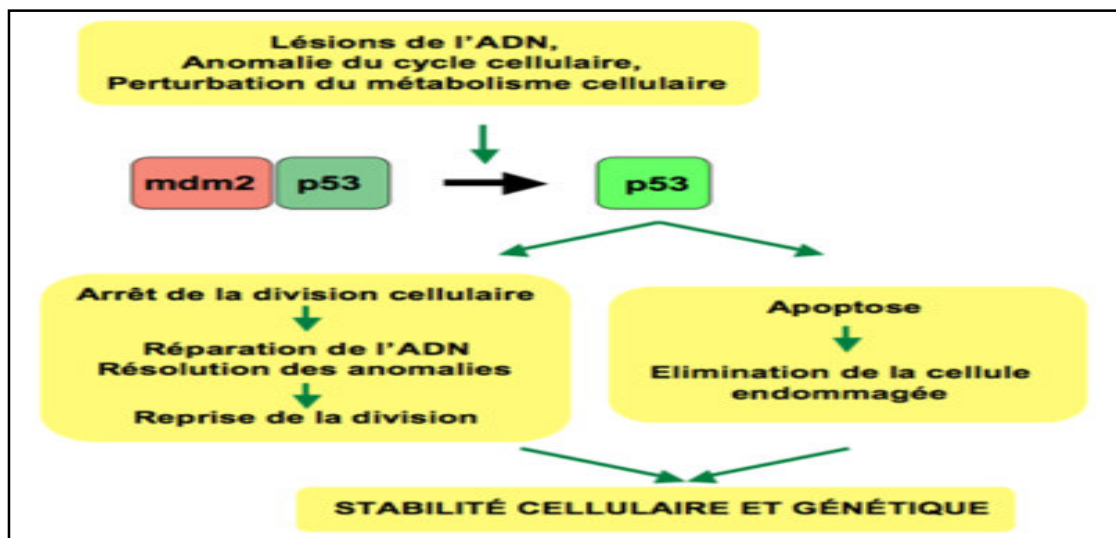


Figure 1.7 : p53 et signalisation cellulaire (Anonyme 2, 2007).

I.3.5. Altérations du gène p53 dans les cancers humains :

Près de 50% des cancers humains ont une p53 mutée qui a perdu ses capacités anti prolifératives et apoptotiques. Les études d'épidémiologie moléculaire ont démontré de manière formelle que les altérations du gène p53 étaient dues à l'exposition à des

carcinogènes dans les cas de cancers bronchiques (tabac), cancer de la peau (rayons UV) ou cancer du foie (alcool) dans les pays en voie de développement (exposition à l'aflatoxine B1). Dans les autres cancers, leurs origines sont plus incertaines (**Saffroy et al., 2004**).

II. MATERIEL ET METHODES :

Notre étude a été réalisée au niveau du laboratoire d'anatomopathologie du C.P.M.C (Centre Pierre et Marie Curie) durant 3 mois.

L'étude rétrospective a été effectuée sur 32 cas, développée à partir des fiches des malades accompagnants les prélèvements dont les numéros de dossiers étaient puisés des registres d'anatomie pathologique. Les paramètres étudiés sont :

- L'âge du malade.
- Le sexe.
- Le siège anatomique
- Le type histologique
- La taille de la tumeur

L'étude histopathologique a été réalisée sur 20 cas à partir de fragments tissulaires prélevés, fixés dans le Formol à 10 %, déshydratés et inclus dans la paraffine

II.1. Matériel :**II.1.1. Matériel biologique :**

Cette étude a été effectuée à partir de blocs de paraffine archivés comportant des fragments de lésions tumorales hépatiques malignes obtenus après exérèse chirurgicale totale ou partielle, suivie d'un examen macroscopique et anatomopathologique, tout en se référant aux fiches des malades.

La coloration à l'Hématoxyline éosine (HE) et les techniques immunohistochimiques ont été réalisées sur des lames, obtenues après recoupe des blocs en paraffine présentant des foyers de cancer fournis par le service d'anatomie pathologique du CPMC.

II.1.2. Matériel non biologique :**II.1.2.1. Appareillage :**

- Agitateur pour flacon *type Vibrofix VFR*
- Appareil de circulation automatique type *Leica R* (Appendice A).
- Appareil d'inclusion en paraffine type *Leica R* (Appendice A).
- Bain marie type *Leica* (Appendice A).

- Congélateur type **BECO.R**
- Microscope photonique type **Zeiss** (Appendice A).
- Incubateur type **Memmert** (Appendice A).
- Microtome rotatif type **Leica R** (Appendice A).
- Micro-photographie type **OLYMPUS BH-2**.

II.1.2.2. Verrerie et autre matériel : (voir Appendice A)

II.2.2.3. Réactifs et solutions : (voir Appendice A)

II.2. Méthodes :

II.2.1. Réception des prélèvements :

A son arrivée au laboratoire, le prélèvement est identifié (nom, prénom, âge, siège de la tumeur et type de chirurgie), puis enregistré sous un numéro d'immatriculation qui l'accompagne dans les différentes étapes de la technique.

II.2.2. Examen macroscopique :

C'est un examen à l'œil nu des pièces opératoires, qui doit permettre une description des caractères macroscopiques du tissu tumoral (taille, consistance, couleur, limitation, recherche d'une extension au niveau des tissus voisins, recherche de lésions associées et le nombre de ganglions), mais aussi l'étude des marges de résection, optimisée par l'utilisation des techniques de tatouage qui permettent la conservation des données topographiques (orientation anatomique, limite d'exérèse) lors de l'examen sous le microscope (Figure 2.1).

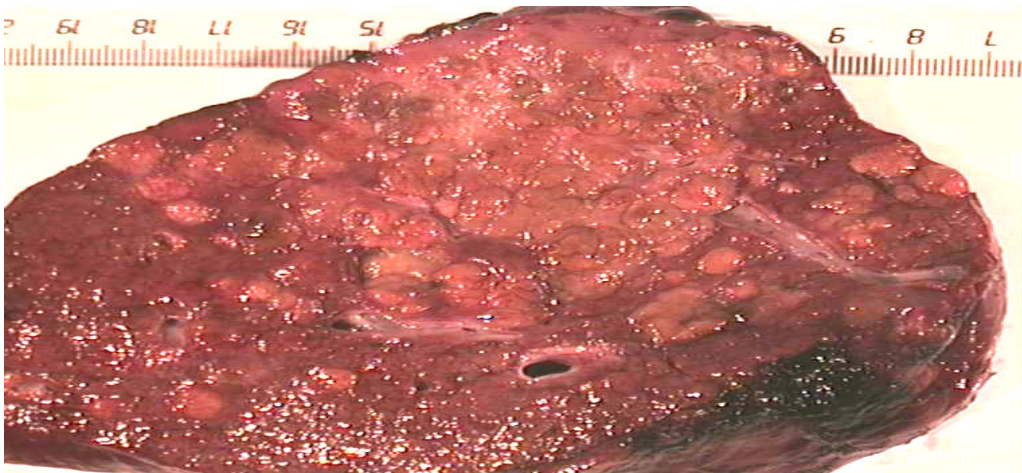


Figure 2.1 : Vue macroscopique d'un CHC (Photo originale).

Les échantillons sont ensuite disséqués selon un protocole déterminé et déposés dans des cassettes en plastiques sur lesquelles est inscrit le numéro d'immatriculation. Ces examens sont effectués sur tout prélèvement tumoral et constituent la base du diagnostic du cancer.

II.2.3. Examen microscopique :

➤ Fixation

Les cassettes contenant les prélèvements ont été plongées dans du Formol à 10 % pendant 24 heures, les échantillons ont été soigneusement rincés.

➤ Déshydratation

La déshydratation a été réalisée par un passage des fragments tissulaires dans six bains d'alcool éthylique de concentration croissante (75°, 80°, 85°, 90° et 95°). Chaque bain dure une heure, tandis que les deux derniers bains durent deux heures chacun dans le but de retirer l'eau des tissus.

➤ Eclaircissement

Un passage dans trois bains de xylène de cinq heures (deux bains de 1h30 chacun et le dernier de deux heures).

➤ Imprégnation

L'imprégnation a été effectuée à chaud dans deux cuves en acier inoxydable et thermostatées (60°C) contenant de la paraffine liquéfiée. Chaque bain dure 1 heure de temps.

➤ Confection des coupes

Après ré-inclusion en paraffine (Figure 2.2), les blocs ont été placés dans le porte objet du microtome rotatif, de façon à ce que la face à couper soit dans un plan vertical et parallèle au fil du rasoir (Figure 2.3a). Les coupes ont été réalisées à 3µm d'épaisseur (Figure 2.3b).

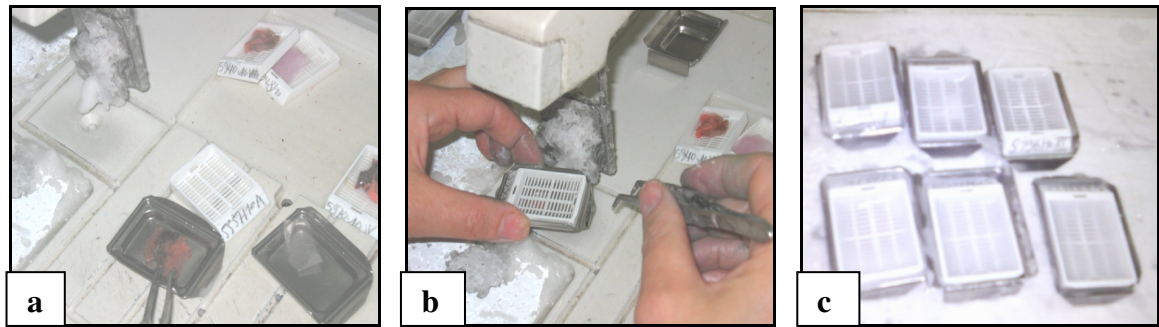


Figure 2.2 : Les étapes de l'inclusion (a-b-c) (Photos originales).

- (a) Dépôt et orientation du tissu dans le moule.
- (b) Inclusion proprement dite.
- (c) Disposition du moule sur la plaque froide.

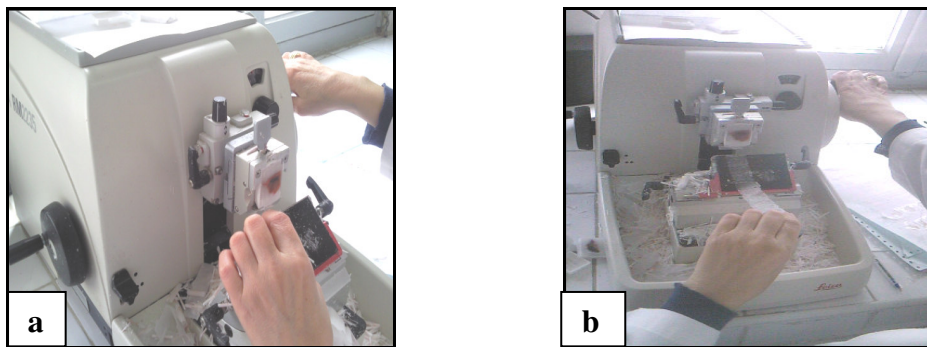


Figure 2.3 : Confection des coupes (Photos originales).

➤ Etalement sur lames

Après obtention de rubans, les coupes ont été ramollies à la surface d'un bain marie réglé à 46°C, puis recueillies sur des lames silanisées préalablement numérotées par le matricule correspondant (Figure 2.4).

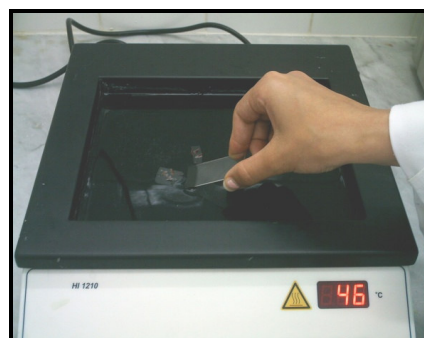


Figure 2.4 : Etalement des coupes (Photo originale).

Après séchage, les lames ont été mises dans une étuve à 60°C pendant 24 heures afin d'augmenter l'adhérence des coupes.

➤ Coloration HE :

• Principe :

La coloration HE est une coloration topographique de routine permettant l'identification des caractères histologiques de tissus biologiques en associant une coloration nucléaire par l'hématoxyline de Harris à une coloration cytoplasmique par l'éosine. L'Hématoxyline de Harris est un colorant basique qui colore les noyaux en bleu tandis que l'éosine est de nature acide qui colore le cytoplasme en rose.

• Mode opératoire :

La coloration des coupes a été effectuée comme suit :

- Passage des lames dans un bain d'Hématoxyline (2 minutes).
- Rinçage à l'eau distillée.
- Passage dans un bain d'Eosine (3 minutes).
- Rinçage à l'eau distillée.

➤ Montage

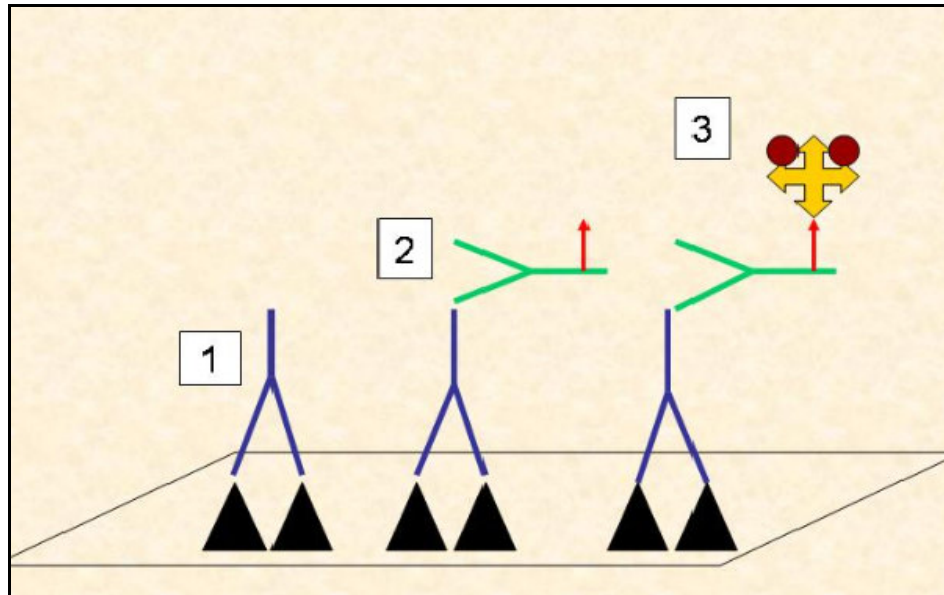
Les lames ont été parsemées de quelques gouttes d'Eukit (Monting Medium) et recouvertes de lamelles sans y laisser de bulles. L'observation et l'interprétation ont été réalisées à l'aide d'un microscope multi-têtes à différents grossissements (×100 ; ×200 ; ×250 ; ×400).

II.2.4. Etude immunohistochimique :

II.2.4.1. Principe :

Pour déterminer l'expression de la *p53* nous avons sélectionné une méthode indirecte complexe Peroxydase-Anti-Peroxydase (PAP), qui consiste à l'amplification du marquage par un système de révélation qui peut fixer deux molécules de chromogènes pour mieux visualiser le complexe Ag-Ac étant naturellement invisible. Le système

révélateur est constitué d'un deuxième Ac biotinylé lié à une molécule porteuse d'une enzyme qui est la streptavidine peroxydase, qui peut-elle même relier deux molécules de chromogène diaminobenzidine (DAB) (substrat). La réaction enzyme substrat dégage une coloration brunâtre visualisée sous microscope. L'intensité de cette coloration reflète l'expression de la *p53* au niveau du tissu tumoral.



1 Anticorps primaire 2 Anticorps secondaire 3 Complexe streptavidine peroxydase

Figure 2.5 : Méthode indirecte (PAP).

II.2.4.2. Mode opératoire :

* Préparation des lames

- Déparaffinage des lames par passage successif dans 5 bains de xylène (5 minutes chacun), puis dans 4 bains d'alcool 95°-90°-80°-70° (5 minutes chacun).
- Rinçage à l'eau distillée.
- Immersion des lames dans une solution tampon citrate pH = 6 pour le démasquage des sites antigéniques.
- Mettre les lames dans un bain marie à 92,8°C pendant 40 minutes.
- Laisser refroidir pendant 20 minutes.

- Trempage des lames dans de l'eau distillée.
- Cercler chaque fragment avec un feutre "Dako pen".

* Immunomarquage

- Appliquer suffisamment d'eau oxygénée à 3 % pendant 5 minutes.
- Rinçage à l'eau distillée.
- Placer dans un bain de solution tampon PBS à pH = 7,4 pendant 5 minutes.
- Appliquer suffisamment d'anticorps primaire anti-p53 dilué et laisser 1 heure.
- Rinçage à l'eau distillée.
- Placer dans un bain de solution tampon PBS à pH = 7,4 pendant 5 minutes.
- Appliquer suffisamment l'anticorps secondaire et laisser 30 minutes.
- Rinçage à l'eau distillée.
- Placer dans un bain de solution tampon PBS à pH = 7,4 pendant 5 minutes.
- Appliquer suffisamment le substrat chromogène DAB pour couvrir l'échantillon.

Etude de l'intensité de la coloration immunohistochimique ainsi que la quantité de noyaux des cellules tumorales colorés sous le microscope photonique. L'intensité de la coloration, allant du beige claire au brun foncé, a été évaluée comme indicateur de l'expression de la p53.

III. RESULTATS ET DISCUSSION :

III.1. Résultats :

III.1.1. Etude rétrospective :

Cette étude a été réalisée sur 32 cas atteints de carcinome hépatocellulaire (fiches des malades + blocs de paraffine archivés).

III.1.1.1. Répartition selon l'âge :

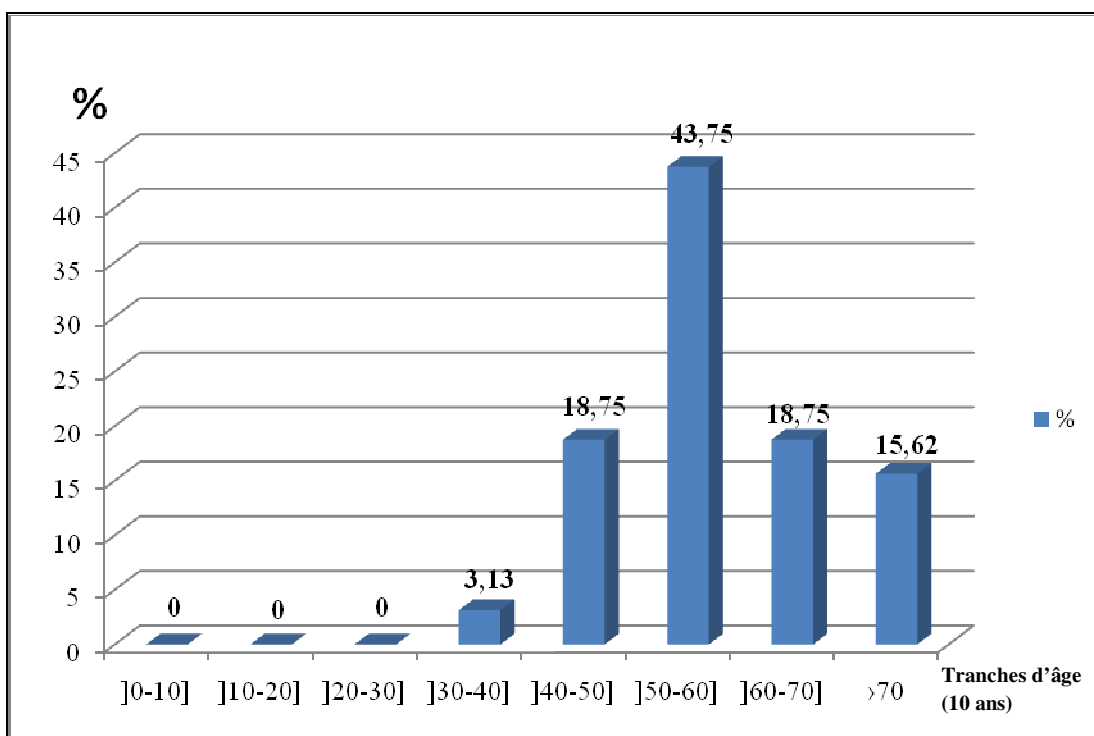


Figure 3.1: Répartition des patients selon l'âge

Le CHC survient à partir de 30 ans, aux extrêmes 37-80 ans avec un pic entre 50-60 ans (43,75 %), l'âge moyen est de 58 ans (Tableau I (Appendice B)).

III.1.1.2. Répartition selon le sexe

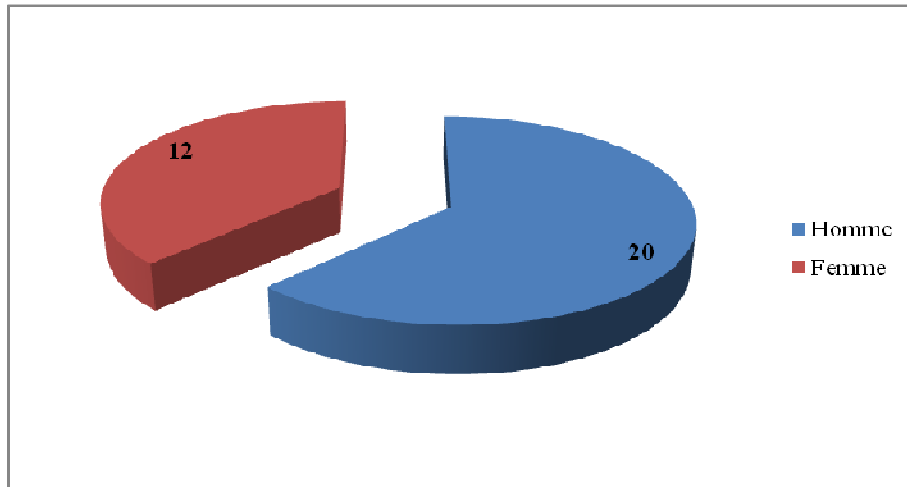


Figure 3.2 : Répartition des patients selon le sexe.

L'analyse des résultats obtenus en fonction du sexe montre que les hommes sont plus atteints (62,5%) par rapport aux femmes (37,5%) (Tableau II (Appendice B)).

III.1.1.3. Répartition selon le siège anatomique :

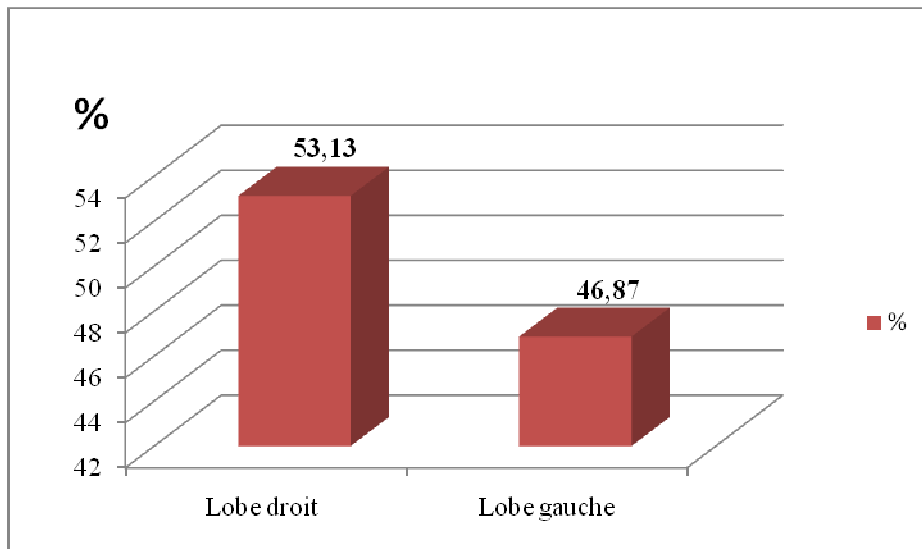


Figure 3.3 : Répartition des patients selon le siège anatomique

La fréquence du lobe droit est plus élevée (53,13%) que celle du lobe gauche (46,87%) (Tableau III (Appendice B)).

III.1.1.4. Répartition selon le type histologique

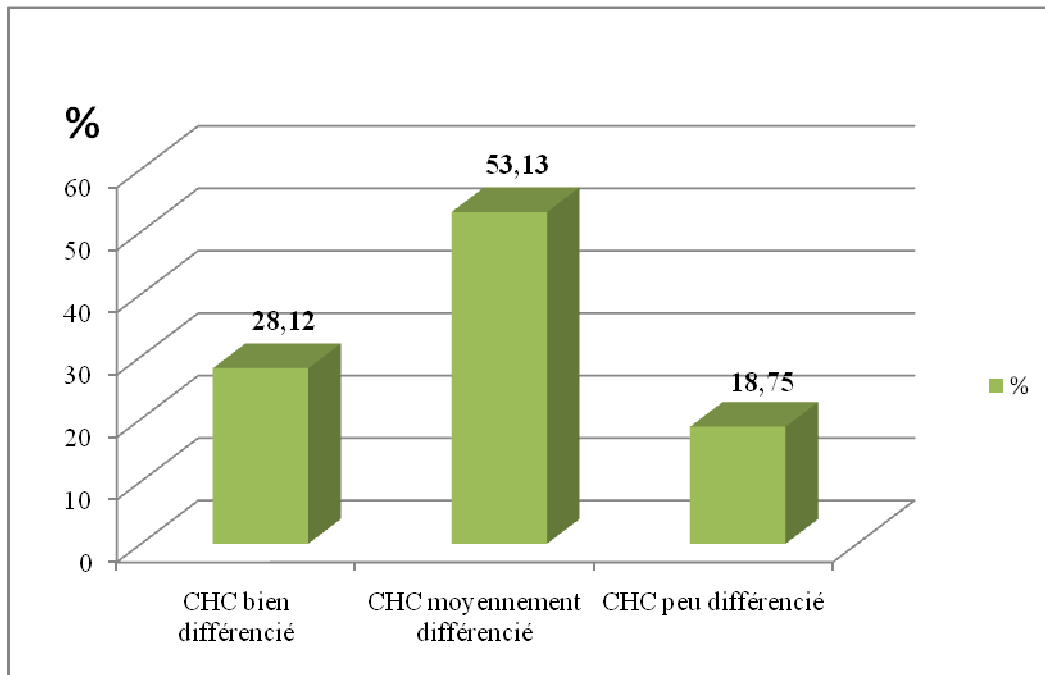


Figure 3.4 : Répartition des patients selon le type histologique

L'analyse des résultats obtenus en fonction du type histologique montre que le CHC moyennement différencié est le plus fréquent (53,13%) par rapport au bien différencié (28,12%), suivi du peu différencié (18,75 %) (Tableau VI (Appendice B)).

III.1.1.5. Répartition selon les facteurs étiologiques:

L'analyse des résultats obtenus en fonction des facteurs étiologiques (Tableau 3.1) montre que le CHC est fortement lié au VHB (62,5%) par rapport au VHC (21,87%) et les autres facteurs tels que l'alcool et d'autres facteurs favorisants (15,63%).

Tableau 3.1 : Répartition des patients en fonction des facteurs étiologiques.

Etiologie	Effectif	%
VHB	20	62,5
VHC	7	21,87
Autres	5	15,63
Total	32	100

III.1.2. Etude histologique :

L'étude histopathologique a été réalisée sur les 20 cas à partir de fragments tissulaires sains et de fragments tissulaires comportant des lésions tumorales malignes du foie.

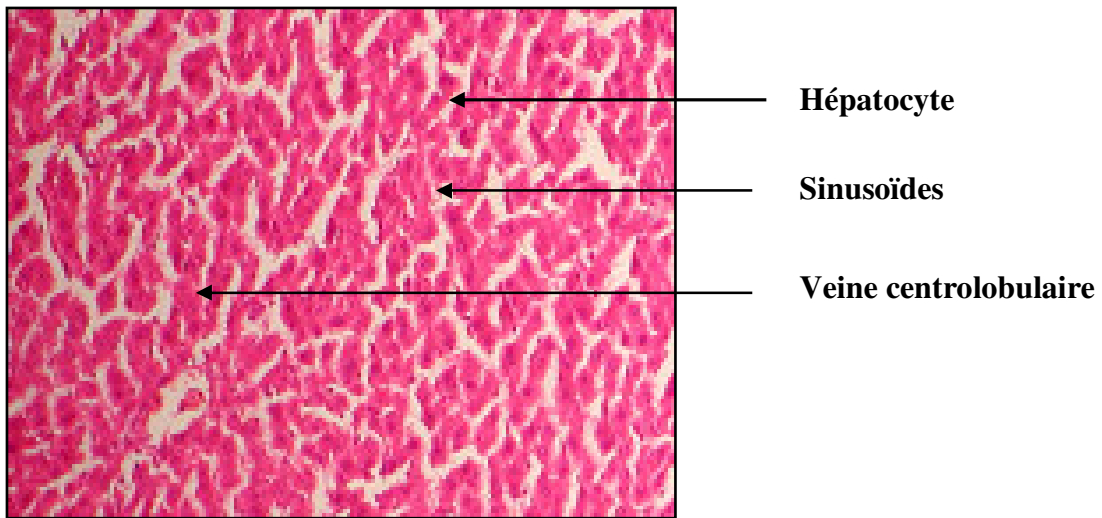
III.1.2.1. Tissu hépatique sain :

Figure 3.5 : Tissu hépatique sain. Coloration HE ; Grossissement 10×20

(Photo originale).

Les observations au microscope photonique du parenchyme hépatique montrent les cellules parenchymateuses (hépatocytes) et les cellules sinusoidales (Cellules endothéliales, cellules de Kupffer (des macrophages) et cellules étoilées du foie).

Le lobule hépatique est caractérisé par une veine centro-lobulaire, des travées hépatocytaires délimitant des sinusoides et des espaces portes constitués par la triade (veine porte, artère hépatique et canalicule biliaires) (Figure 3.5)

III.1.2.2. Tissu hépatique tumorale :

Les 20 cas retenus présentaient tous des CHC dont 45% (9 cas) étaient moyennement différenciés, 35% (7 cas) étaient bien différenciés et 20 % (4 cas) étaient peu différenciés.

A/ CHC bien différencié :

Au microscope photonique, l'architecture est trabéculaire et les travées sont régulières. Les cellules sont généralement plus petites que les cellules non tumorales et le rapport nucléo-cytoplasmique est plus élevé (Figure 3.6).

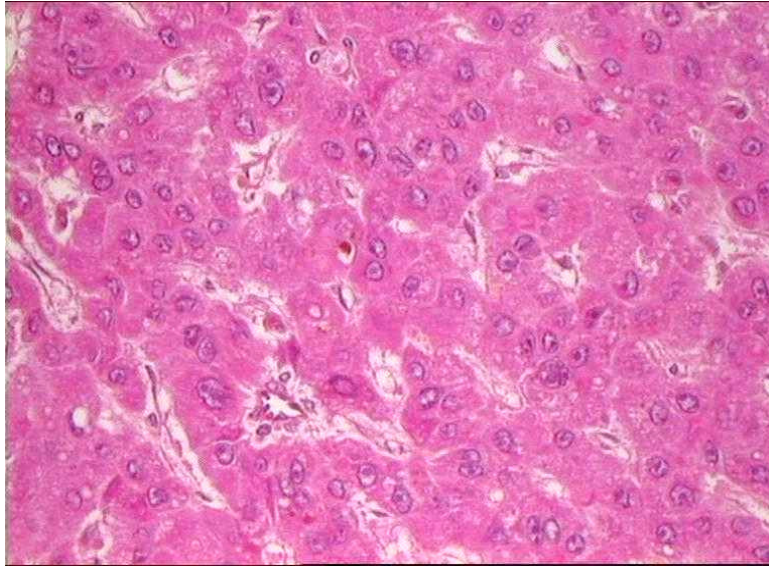


Figure 3.6 : CHC bien différencié. Coloration HE ; Grossissement 10×20
(Photo originale).

B/ CHC moyennement différencié:

Au microscope photonique l'architecture est trabéculaire, cytoplasmes abondants, noyaux plus larges, hyperchromatiques, nucléolés, avec rares aspects acineux ou glandulaires. Les structures pseudoglandulaires sont nombreuses. Beaucoup de sinusoides sont observés (Figure 3.7).

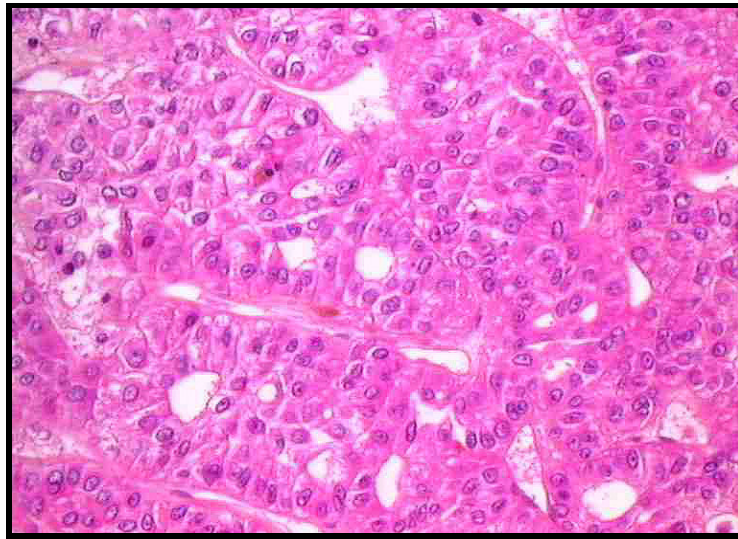


Figure 3.7 : CHC moyennement différencié. Coloration HE ; Grossissement 10×20

(Photo originale).

C/ CHC peu différencié :

Au microscope photonique, certains secteurs présentent encore des aspects trabéculaire. La tumeur d'architecture compacte, contient peu de vaisseaux. Une perte de l'architecture est observée avec un aspect massif. L'absence des sinusoides est observée. atypies nucléaires marquées, cellules géantes multinucléées, la bile est moins abondante (Figure 3.8).

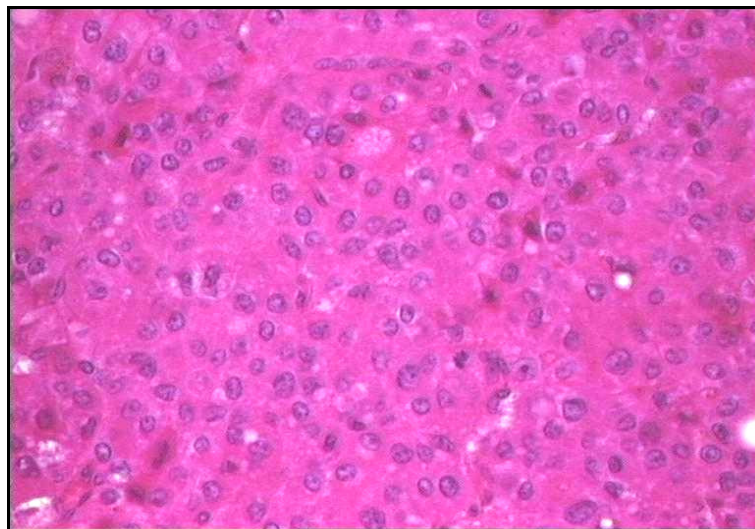


Figure 3.8 : CHC peu différencié. Coloration HE ; Grossissement 10×20

(Photo originale).

III.1.3. Etude immunohistochimique :

L'étude immunohistochimique a été réalisée sur 20 prélèvements tumoraux parmi les 32 cas. Le marquage nucléaire était négatif dans 4 cas (20%) « Figure 3.9 », faible dans 6 cas (30%) « Figure 3.10 » et positif dans 10 cas (50%) « Figure 3.11 » dont les cellules tumorales exprimaient une forte positivité nucléaire « Figure 3.12 ».

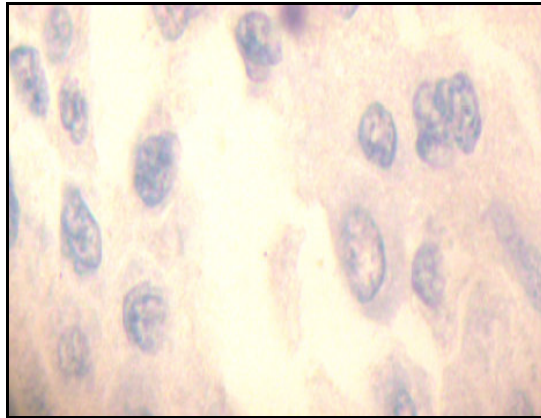


Figure 3.9 : Immunomarquage nucléaire négatif. Grossissement×100

(Photo originale).

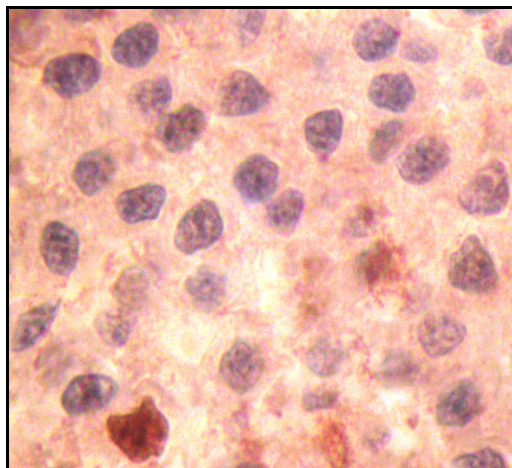


Figure 3.10 : Immunomarquage nucléaire faible. Grossissement×100

(Photo originale).

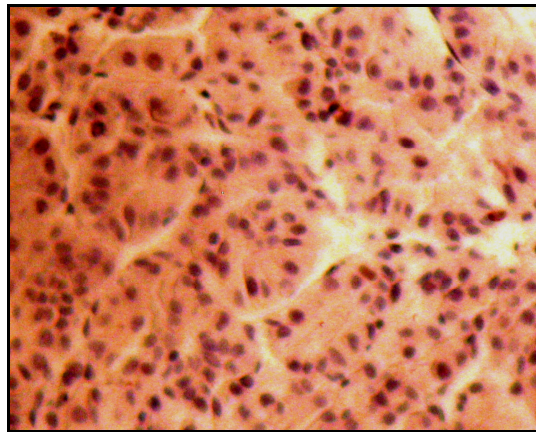


Figure 3.11 : Immunomarquage nucléaire positif. Grossissement×100

(Photo originale).

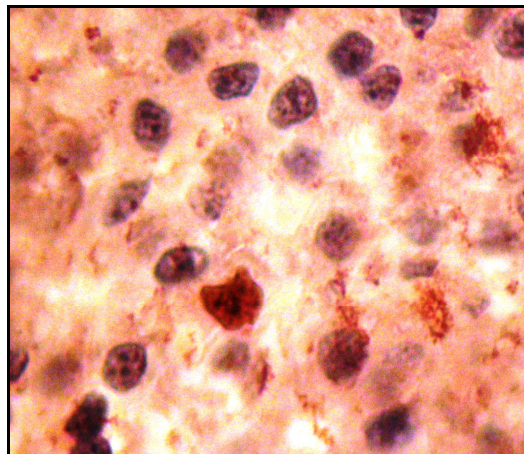


Figure 3.12 : Forte positivité nucléaires des cellules tumorales. Grossissement×400

(Photo originale).

III.1.3.1. Expression de la p53 :

Tableau 3.2 : Expression de la p53

Expression de la p53	n	%
+++	10	50
+	6	30
-	4	20
Total	20	100

(+++): Forte positivité (+): Faible Positivité (-): Négativité

III.1.3.2. Relation entre l'expression de la p53 et quelques paramètres :

Tableau 3.3 : Variation de l'expression de la p53 selon le type histologique.

Type histologique	Expression de p53 (n)	%
CHC bien différencié	7	35
CHC moyennement différencié	9	45
CHC peu différencié	4	20
Total	20	100

L'analyse de l'expression de la p53 en fonction du type histologique (Tableau 3.3) révèle une forte expression dans les CHC moyennement différenciés (45%), moyenne dans les CHC bien différenciés (35%) et faible dans les CHC peu différenciés (20%).

Tableau 3.4 : Variation de l'expression de la p53 en fonction de la taille tumorale.

Taille (cm)	Effectif (n)	%
≥2cm	13	65
< 2cm	7	35
Total	20	100

L'analyse de l'expression de la p53 en fonction de la taille tumorale (Tableau 3.4) révèle une forte expression dans les CHC dont la taille est supérieure à 2cm (65%) par rapport à ceux dont la taille est inférieure à 2cm.

III.2. Discussion :

Le CHC est un problème de santé publique majeur en occident (**katarzyna et al., 2009**). C'est le cancer primitif du foie le plus fréquent (80-90 % des cas) : 5ème cancer dans le monde et 3ème cause de mortalité. Il enregistre 620 000 nouveau cas / an dans le monde et 595 000 décès / an. C'est la première cause de mortalité chez les malades cirrhotiques (**Parkin DM et al., 2001 ; Young et al., 2008**).

L'étude de notre série (32 patients) nous a permis de conclure que l'âge moyen est de 58 ans (extrêmes 37 à 80 ans) et le sex-ratio (hommes/femmes) est de 1.66. S'il l'on divisait la population par tranches d'âge de 10 ans, le pic se situait entre 50-60 ans. Ces résultats se rapprochent à ceux retrouvés par (**Treut et al., 2000**), chez qui, sur un échantillon de 77 entre 21 et 79 ans malades, la moyenne d'âge était de 57,6 ans et le sex-ratio de 1.1.

Dans notre travail, nous avons enregistré une prédominance masculine, 20 (62.5 %) hommes / 12cas (37,5%) femmes. Cette prédominance masculine, a été retrouvée par beaucoup d'autres études.

D'après **Reynès (2002)**, le CHC survient chez les sujets âgés de 50-70 ans .La prédominance masculine est constate. En occident, il complique le plus souvent une hépatopathie chronique acquise alcoolique ou due au VHC.

La localisation anatomique des tumeurs de CHC indique une prédominance de la localisation du lobe droit avec un pourcentage de (53,13%) suivie de (46,13%). Ces résultats ne concordent pas avec les travaux de (**Dewantoro et al., 2006**) qui n'ont pas enregistré une différence significative entre les deux lobes.

Dans notre travail, nous avons enregistré 20 cas (62,5%) liés au VHB, 7 (21,87) cas liés au VHC et 5 cas (15, 63%) étaient liés à d'autres facteurs étiologiques tels que l'alcool...Ces résultats concordent avec ceux de (**Treut et al., 2000**) qui ont bien identifié les principaux facteurs de risque dans leurs études épidémiologiques : 71% liés au VHB, 13,5% liés au CHC et 26% étaient des consommateurs excessifs d'alcool.

Le CHC survient après une infection chronique prolongée, la particule virale HBx du VHB s'intègre dans le génome des hépatocytes et provoque par mutagenèse des anomalies d'expression de gènes y compris le gène p53. (Reynès, 2002).

Le gène suppresseur de tumeur p53 exerce un contrôle négatif sur la prolifération tumorale. Son altération est une des étapes les plus fréquentes de la transformation cancéreuse d'une cellule normale. Une mutation du gène p53 a été trouvée dans plus de 50% des cancers humains et semble être associée à un mauvais pronostic (Sitruk et al., 2000)

L'analyse immunohistochimique effectuée sur les 20 prélèvements tumoraux a révélé une surexpression de la protéine p53 dans 50 % des cas étudiés, 30 % des cas expriment une faible positivité et 20% des cas ayant un marquage négatif. Ces résultats sont conformes à ceux de la littérature qui signalent une accumulation de la protéine p53 dans plus de 50 % des CHC. (Mei-Fang Zhang et ses collaborateurs, 2009) ont démontré que la P53 était surexprimée dans 69% dans une population de 181 patients avec un seuil de positivité supérieur ou égal à 10%. Ils ont constaté que la P53 pourrait être considérée comme un facteur prédictif de pronostic des patients ayant un CHC.

Dans notre travail, nous avons constaté que la surexpression de la p53 et le type histologique des CHC pourraient être corrélés étant donné que dans le CHC moyennement différencié, la positivité était de 45 %. Le CHC bien différencié a enregistré un pourcentage de 35%. Quant à le CHC peu différencié, des taux de 20 %.

Notons que la notion du grade est substituée par la notion du degré de différenciation dont : Le CHC bien différencié correspond au grade I et/ou II, le CHC moyennement différencié correspond au grade II et/ou III et le CHC peu différencié qui correspond au grade III et/ ou IV, on a trouvé que le grade III est le plus fréquent. ces résultats ne concordent pas avec ceux de (Mei-Fang Zhang et ses collaborateurs, 2009) qui ont constaté que l'expression de la P53 avec les grades I et II.

Dans notre travail, on a constaté que l'expression de la p53 est corrélée avec la taille tumorale : On a révélé que la p53 est surexprimée dans les tumeurs dont la taille est supérieure à 2 cm. ces résultats concordent avec ceux de Nogueira et al (2009).

Bien que de nombreuses études aient montré que le gène *p53* était fréquemment muté dans les CHC, la valeur pronostique de telles mutations reste très discutée. Certains auteurs lui reconnaissent une valeur pronostique péjorative indépendante alors que d'autres en font un critère évolutif péjoratif dépendant du stade tumoral qu'on n'a pas pu étudier grâce au manque de renseignements. Cependant, sur un nombre important d'études réalisées sur le CHC, peu d'entre-elles ont été consacrées à l'expression de la *p53* dans les cellules tumorales s'accordent pour souligner la gravité des CHC qui seraient plus agressifs avec un plus mauvais pronostic (**Mei-Fang Zhang et al., 2009**).

Cependant le nombre de variables associés à l'immunohistochimie d'une part et aux patients n'ayant pas subi le même traitement (chirurgie seule, associée à une radiothérapie ou une chimiothérapie variée) d'autre part rend difficile la comparaison des résultats des différentes études.

CHAPITRE I

DONNEES BIBLIOGRAPHIQUES



CHAPITRE II

MAERIEL ET

METHODES



CHAPITRE III

RESULTATS ET DISCUSSION



APPENDICE

1. Appareillage :



**Etuve thermostatée
(type DRYING OVEN TK-11)**



**Appareil d'enrobage
(type Leica EG 1160)**



Incubateur (type Memmert)



Bain marie (type Leica HI 1210)



**Microtome rotatif
(type Leica RM 2235)**



**Appareil de circulation automatique
(type Leica)**



**Microscope photonique multi-têtes
(type Leica DM LB2)**



**Microscope optique
(type Zeiss)**

2. Verrerie et autre matériel :

- ✓ Cassettes en plastique.
- ✓ Moules en métal (port cassettes).
- ✓ Lames type **DAKO**.
- ✓ Porte-lames.
- ✓ Lamelles.
- ✓ Lame de bistouri.
- ✓ Eprouvette graduée.
- ✓ Pince.
- ✓ Crayon et DAKO pen.

3. Réactifs et solutions :

- ✓ Formol à 10 %.
- ✓ Ethanol (75° à 100°)
- ✓ Eau distillée.
- ✓ Hémalun.
- ✓ Eosine.
- ✓ Paraffine.
- ✓ Peroxyde d'hydrogène 3 %.

- ✓ Phosphate Buffered Saline (PBS) pH = 7, 4.
- ✓ Tampon citrate à pH = 6.
- ✓ Xylène.
- ✓ Substrat chromogène 3-3 Diaminobenzidine (DAB).
- ✓ Anticorps primaire anti-*p53* de type IG-g, proposé sous forme de surnageant de culture tissulaire dans 0,05mol/L de Tris-Hcl à pH = 7,6 contenant un stabilisant protéique et 0,015 mol/L d'azide de sodium (Réf : N1581) DakoCytomation.
- ✓ Anticorps secondaire anti-Ac proposé sous forme de surnageant de culture tissulaire dans 0,05 mol/L de Tris-Hcl à pH = 7,6 contenant un stabilisant protéique et 0,05 mol/L d'azide de sodium (Réf : NP010) DakoCytomation.
- ✓ Eukit type Mounting Medium (Réf : S 3025).

4. Fiche technique : (Préparation des solutions et dilutions)

A. Tampon citrate 10 Mm, pH = 6,0 :

Solution A : 14,7 gr de citrate de sodium dans 500 ml d'eau distillée.

Solution B : 10,5 gr d'acide citrique dans 500 ml d'eau distillée.

Mélanger 41 ml de solution A + 9 ml de solution B et compléter à 500 ml par l'eau distillée.

B. H₂O₂ à 3 %:

100 ml d'eau distillée + 7 ml de H₂O₂.

C. PBS (Phosphate Biffered Saline) :

2l ml de NaCl + 5,7 gr de sodium phosphate di sodique + 6,2 gr de sodium phosphate mono sodique.

5. Tableau I: Dilution de l'alcool (d'après la table de Gay-Lussac).

ALCOOL A OBTENIR	ALCOOL A DILUER	
	100°	96°
95°	6,50	1,25
90°	13,25	7,73
85°	20,54	14,73
80°	28,59	22,45
75°	37,58	34,08
70°	47,75	40,85
65°	59,37	52
60°	72,82	64,92
55°	88,60	80,06
50°	107,44	98,15

Quantité d'eau en cm³ à ajouter à 100 cm³ d'alcool à diluer.

6. Calcul statistique :

6.1. La moyenne :

Soit X1, X2, X3,.....Xn une suite finie de nombre.

La moyenne arithmétique est le rapport:

$$m = \frac{X1 + X2 + X3 + \dots + Xn}{n} = \frac{\sum Xi}{n}$$

m : La moyenne arithmétique.

n : L'effectif.

X : Caractère quantitatif.

7. La classification d Edmonson : (Adrian et *al.*, 2005)

Elle établit 4 grades :

- Grade I : CHC bien différencié d'aspect trabéculaire
- Grade II : CHC bien différencié, trabéculaire, avec cytoplasmes abondants, noyaux plus larges, hyperchromatiques, nucléolés, avec rares aspects acineux ou glandulaires
- Grade III : atypies nucléaires marquées (>grade II), cellules géantes multinucléées, bile moins abondante, rares formations acineuses.
- Grade IV : CHC peu différencié.

Noyaux très hyperchromatiques, volumineux, rapport N/C très augmenté, travées difficiles à identifier, nappes cellulaires peu cohésives, bile très peu abondante.

Cellules fusiformes petites cellules parfois. Les tumeurs renferment souvent des territoires de différenciation variable, ce qui doit être spécifié dans le compte-rendu.

Tableau I : Répartition des patients selon l'âge

Tranches d'âge (an)	Effectif	%
]0-10]	0	0
]10-20]	0	0
]20-30]	0	0
]30-40]	1	3,13
]40-50]	6	18,75
]50-60]	14	43,75
]60-70]	6	18,75
>70	5	15,62
Total	32	100

Tableau II: Répartition des patients selon le sexe

Sexe	Effectif	%
Homme	20	62,5
Femme	12	37,5
Total	32	100

Tableau III: Répartition des patients selon le siège anatomique

Siège anatomique	Effectif	%
Lobe droit	17	53,13
Lobe gauche	15	46,87
Total	32	100

Tableau IV : Répartition des patients selon le type histologique

Type histologique	Effectif	%
CHC bien différencié	9	28,12
CHC moyennement différencié	17	53,13
CHC peu différencié	6	18,75
Total	32	100

Tableau récapitulatif des 32 patients.

N°	Sexe	Age (ans)	Siège anatomique	Taille des tumeurs (cm)	Type histologique	IHC
1	F	58	Lobe droit	3	CHC moyennement différencié	/
2	M	55	Lobe gauche	2,5	CHC moyennement différencié	+++
3	M	45	Lobe droit	2	CHC moyennement différencié	/
4	M	43	Lobe gauche	2,7	CHC bien différencié	+
5	M	60	Lobe droit	3,5	CHC moyennement différencié	+++
6	M	59	Lobe gauche	2	CHC peu différencié	/
7	M	57	Lobe droit	1,5	CHC moyennement différencié	+++
8	M	58	Lobe droit	3	CHC moyennement différencié	+++
9	M	44	Lobe gauche	2	CHC moyennement différencié	/
10	M	68	Lobe droit	1,5	CHC bien différencié	+++
11	F	70	Lobe gauche	3	CHC bien différencié	+++
12	M	58	Lobe gauche	1	CHC moyennement différencié	+++
13	M	37	Lobe droit	3	CHC moyennement différencié	/
14	M	57	Lobe gauche	2	CHC bien différencié	+
15	F	68	Lobe droit	3,5	CHC moyennement différencié	+++
16	F	46	Lobe droit	/	CHC moyennement différencié	/
17	M	51	Lobe gauche	/	CHC bien différencié	/
18	M	60	Lobe droit	/	CHC moyennement différencié	/
19	F	80	Lobe droit	/	CHC bien différencié	+
20	M	70	Lobe droit	1	CHC peu différencié	-
21	F	57	Lobe gauche	3	CHC moyennement différencié	+++
22	F	58	Lobe gauche	1,5	CHC moyennement différencié	+++
23	M	45	Lobe gauche	2	bien différencié	+
24	M	55	Lobe droit	/	CHC moyennement différencié	/

25	F	79	Lobe droit	1,5	CHC peu différencié	-
26	M	64	Lobe gauche	1	CHC bien différencié	+
27	F	46	Lobe droit	/	CHC moyennement différencié	/
28	F	55	Lobe droit	3	CHC peu différencié	-
29	M	79	Lobe gauche	2,5	CHC bien différencié	+
30	F	50	Lobe gauche	1,5	CHC peu différencié	-
31	M	70	Lobe droit	2	CHC bien différencié	+
32	F	57	Lobe gauche	/	CHC peu différencié	/

IHC : Immunohistochimie. M : Masculin ; F : Féminin. (+++) : Forte positivité nucléaire des cellules tumorales. (+) : Faible positivité nucléaire des cellules tumorales.

(-) : immunomarquage nucléaire négatif.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'étude rétrospective, histopathologique et immunohistochimique des CHC ont permis de ressortir les faits suivants :

- Les CHC se caractérisent par une prédominance du sexe masculin (62,5%) et de la localisation du lobe droit (53,13%).
- Selon le pronostic histologique, les CHC moyennement différenciés sont plus fréquents (53,13%).
- L'étude de la corrélation entre l'expression de la p53 et quelques paramètres clinico-histologiques nous a permis de ressortir les faits suivants :
 - ✓ La p53 est surexprimée dans les CHC moyennement différenciés (45%).
 - ✓ La p53 est surexprimée dans les CHC dont la taille est supérieure à 2cm (65%).

Cependant, la protéine p53 pourrait avoir un rôle dans l'évolution tumorale. La biologie moléculaire peut compléter les données de l'immunohistochimie mais elle reste une technique lourde, difficilement utilisable en routine. L'application d'une méthode immunohistochimique hautement sensible et spécifique et qui a l'avantage d'être rapide et facilement utilisable en routine, apparaît indispensable à la précision du diagnostic histopathologique. Donc, la combinaison des deux techniques représente un outil intéressant car c'est le seul moyen de prouver que la mutation de p53 décelée par le séquençage de l'ADN affecte le taux de la protéine.

A l'heure actuelle, il n'y a donc pas de preuves assez concluantes pour considérer le statut de la p53 comme un facteur histopronostique validé par la communauté scientifique.

En perspective, l'évaluation des altérations de la p53 dans les CHC par de nouvelles méthodes de biologie moléculaire s'avèrent indispensables pour confirmer la gravité des altérations génétiques de cette molécule « gardienne de l'intégrité du génome » dans la progression maligne des CHC.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- ❖ Alves V.A; Nita M.E ; Carrilho F.J, 2004. Rev Inst Med.V°46 (1): 25-31.
- ❖ Andrian L; Michael B; Celia P; Vera G; Kristmundur S; Galina S; Jo M et Elena V.O, 2005: The structure of p53 tumour suppressor protein reveals the basis for its functional plasticity. The EMBO Journal.V° 25 : 5191 – 5200 .
- ❖ Anonyme 1: Ultrastructure du foie.
- ❖ Anonyme 2, 2007: La protéine *p53*. Site net : www.baclesse.fr.
- ❖ Bai J; Can L; lovet J.M et Bruix J, 2003 : Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma:chemoembolization improves survival. Hepatology.V°37: 429-42.
- ❖ Bai L et Zhu W.G, 2006 : p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. Journal of Cancer Molecules. V° 2(4): 141-153.
- ❖ Barbare J.C ; Boige V ; Boudjema K ; Lescesne R et Trinchet J.C, 2006 : Hepatocellular carcinoma (primary cancer of the liver). Gastroenterol Clin Biol. V° 30:2S57-2S61.
- ❖ Barbare J.C, 2004 : Carcinome hépatocellulaire. La revue du praticien. V°54 : 587-590.
- ❖ Bernardini S ; Chabannes E et Bittard H, 2001: Utilité du *p53* dans la prise en charge clinique des tumeurs vésicales. Progrès en Urologie. V° 11: 201-208.
- ❖ Blanc J.F et Balabaud C, 2006 : Tumeurs du foie, primitives et secondaires. La revue du praticien. V°56 : 679-688.
- ❖ Cambus J.P, 2002: Physiologie de l'hémostase. Module Cardiovasculaire PCEM II Ranguel
- ❖ Catheline J et Champault G, 2000: Echographie du foie. Masson. V°124 : 568-76.
- ❖ Chapusot C ; Assem M ; Martin I ; Chalabreysse L ; Benhamiche A.M ; LIGNIER M.A ; Chauffert B ; Teyssier JR ; Faivre J et Piard F, 2001: Expression de la protéine p21^{WAF1/CIP1} dans les cancers colorectaux: étude de sa relation avec les mutations du gène *p53* et l'expression de la protéine *p53* et de l'antigène Ki67. Pathol Biol.V° 49:115-123.

- ❖ Cressey F, Bin S and Gilbert F.M, 2006: Binding sequence-dependent regulation of the human proliferating cell nuclear antigen promoter by p53. Dewantoro O; Gani R.A et Akbar N, 2006 : Hepatocarcinogenesis in viral Hepatitis B infection “The role of HBx and p53. J Intern Med. V°38 (n°3) : 154-159
- ❖ Frédéric J.C; Degos F ; Christidis C; Ganne C; Farmachidi J; Degott C; Guettier C et Trinchet J, 2002 : Hepatitis C virus related cirrhosis: time to occurrence of hepatocellular carcinoma and death. Elsevier. V°47:131-6.
- ❖ Hammel P et Soursi T, 2000 : Le dosage sérique des anticorps anti –P53 : application au cancer colorectal .Med interne. V°20 : 167-173 .
- ❖ Huynh C et *al.*, 2009: Hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. Hepatology. V°37: 42-429.
- ❖ Huynh-Charlier I ; Taboury J ; Charlier P ; Vaillant JC ; Grenier P et Lucidarme O, 2009 : Imagerie du foie opéré. J Radiol. V°90 :888-904.
- ❖ Kamina P et Dimarino V, 2000 :Abdomen, appareil digestif . Masson. page 23.
- ❖ Koskinas J; Petraki K; Kavantzias N; Rapti I; Kountouras I D et Hadziyannis S, 2005. Journal of Viral Hepatitis. V° 12: 635–641
- ❖ Kottke M ; Marra G ; Rapaccini GL ; Rumi C ; Bussa S et Fadda G, 2007 : DNA ploidy. Pattern in human chronic liver diseases and hepatic nodular lesions. Cancerologie. V°73 : 281-8.
- ❖ Lambert R et *al.*, 2009: Épidémiologie du carcinome hépatocellulaire (CHC) dans le monde. Cancéro digest. V°1 (n°2).
- ❖ Le blanc V et May P, 2002 : Activation et modification post traductionnelles de p53 après dommage de l’AND. Médecine/Science. V°18 :577-584.
- ❖ Lovet JM et Bruix J, 2003: Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: chemoembolization improves survival. Hepatology. V° 37: 429-42.
- ❖ Mainguene E et Pham P, 2002 : Dépistage, diagnostic et suivi biologique du carcinome hépatocellulaire ; John Libby. V°14 : 501–505.
- ❖ Martin L et Basingstoke S, 2002: The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation library. Royaume-Uni.V° 24 (46) 6976- 6981.

- ❖ Monge M, 2006 : Cancérologie et biologie « marqueurs tumoraux organe par organe ». Elsevier Masson SAS. p313.
- ❖ Nogueira J.A ; Nita S.K ; Nita M.E ; De Souza M.M et Do Carmo E.P, 2009 : 249 TP53 mutation has high prevalence and is correlated with larger and poorly differentiated HCC in Brazilian patients. BioMed Central. V° 9 (204) :1-8.
- ❖ Piard S; Kawaguchi T; Kato S; Otsuka K ; Watanabe G ; Kumabe T; Tominaga T ; Yoshimoto T et Ishioka C, 2002 : The relationship among p53 oligomer formation, structure and transcriptional activity using a comprehensive missense mutation. Library.V° 24(46): 6976-6981.
- ❖ Portefaix M ; Cals L ; Maille N ; Sohn C ; Tchiknavorian X et Poirot F, 2006 : p53 son rôle dans les mécanismes de résistance. Sait-on s'en servir en pratique oncologique en 2006?. Pathol Biol.V° 7.
- ❖ Roger L, 2005 : Tumeurs hépatiques. John Libbey Eurotext. P 192-196.
- ❖ Saffroy R et al., 2006 : Gastroentérologie Clinique et Biologique. Médecine/Science (26) 1 : 109-110 .
- ❖ Saffroy R ; Pham P ; Lemoine A et Debuire B, 2004 : Biologie moléculaire et carcinome hépatocellulaire « données actuelles et développements futurs ». Ann Biol Clin. V°62 : 649-56.
- ❖ Sitruk V; Vaysse J; Chevret S; Ganne-Carrie N; Christidis C; Trinchet J.C et Beaugrand M, 2000 : Prévalence et valeur pronostique des anticorps sériques anti-p53 au cours du carcinoma hépatocellulaire. Gastroenterol Clin Biol. V°24 : 1159-1163.
- ❖ Soussi T, 1999 : Interêt clinicolologiques de l'étude des altérations du gène supresseur de tumeur p53 dans les cancers humains. Acomen. V°3 : 312-324.
- ❖ Stefan Z, 2007 : Hépatite B Risques, prévention et traitement. European Liver Patients Association. p23
- ❖ Stevens ; Lowe et Young, 2004 : Anatomie pathologique. Masson. p68.
- ❖ Szymanska K; Chen J.G; Cui Y; Gong Y.Y; Turner P.C ; Villar S; Wild C.P; Parkin D.M et Hainaut P, 2009. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.V° 18 (5) : 1638-1643.
- ❖ Treut Y.P; Pons J; Hardwigsen J; Castellani P; Campan P; Hanna X ; Garcia S, 1999: Carcinome hépatocellulaire sur foie non cirrhotique « Présentation d'une série de 77 patients opérés ». Elsevier SAS. V°124 : 485-93.

- ❖ Watson Y ; May P et May E, 2005 : Rôle de la p53 dans le cycle cellulaire, l'apoptose et le cancer.Revue Francaise des laboratoires. V° 311 : 35-42.
- ❖ Wheater H et Young C, 2004 : Histologie fonctionnelle. Elsevier. page 274.
- ❖ Yoon Y.J; Chang H.Y; Ahn S.H; Kim J.K; Park Y.K; Kang D.R; Park J.Y; Myoung S.M; Kim D.Y; Chon C.Y et Han K.H, 2008 : MDM2 and p53 polymorphisms are associated with the development of hepatocellular carcinoma in patients with chronic hepatitis B virus infection. Oxfordjournals. V°29 (n°6) : 1192-1196.
- ❖ Zhang M.F ; Zhang Z.Y ; Fu J ; Yang Y.F et Yan J.P, 2009 : Correlation between expression of p53, p21/WAF1, and MDM2 proteins and their prognostic significance in primary hepatocellular carcinoma. BioMed Central. p1-8.