

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE**  
**LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



**Université Mohamed Khider - Biskra -**

**Faculté des Sciences Exactes et Sciences de la Nature et de  
la Vie**

**Département des Sciences de la Nature et de la Vie**



**Mémoire**

**En vue de l'obtention du diplôme de Magistère en Biologie**

**Option : Biologie appliquée**

**Thème**

**Identification de quelques facteurs pronostiques et  
prédictifs de réponse aux traitements dans les tumeurs  
colorectales métastatiques de patients Algériens.**

**Présenté par : M<sup>elle</sup> ARIECH Chérifa**

**Jury :**

**Présidente : Dr.BOUATROUS Yamina (MC'A) Université de Mohamed KHIDER de Biskra.**

**Promotrice : Pr.AMIR Zine Charaf CHU de Mustapha.**

**Membres : Pr.HANNACHI Leila CHU de Mustapha.**

**Dr.MOUSSI Abdelhamid(MC'A) Université de Mohamed KHIDER de Biskra.**

**-Année Universitaire : 2017-**

## *Dédicaces*

### *Je dédie ce travail*

*À la perle rare et précieuse, à ma source d'amour et d'affection, qui pense et prie tous les jours pour moi, à toi Maman.*

*À la lumière et le symbole de ma vie, et qui est toujours fier de moi, à toi Papa.*

*Aux plus chères personnes du monde, à mes parents à qui je dois offrir mon éducation et ma réussite. De tous le temps, leur affection a été ma plus grande joie qui me rappelle que je dois travailler même pendant des jours de tristesse. Que Dieu les garde en bonne santé.*

*À mes frères Khaled et Moustapha dont la collaboration à mes recherches étaient inestimables, ils m'ont porté l'aide essentielle à la réalisation de ce travail.*

*À toute ma famille : ma grand- mère, ma tante, mes oncles, mes cousins, mes cousines, à leurs époux et épouses et à leurs enfants.*

*À mes amies : Wissame, Afafe, Ikram, Achouek, Zina, Khensa, Bahia, Sabrina ,Alia, Hakima, Fatima , Nawal, Zahra, Aicha, Amel, Fatiha, Hanane Kenza, Dalel et Halima .*

## **Remerciements**

*De toute grâce Je remercie notre "**Dieu**" de m'avoir donné cette force et cette patience pour suivre rigoureusement mon cursus d'études universitaires.*

*En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce mémoire.*

*J'adresse en particulier un grand merci à **Monsieur le Professeur BOUZID Kamel.**, Chef de Service d'Oncologie Médicale pour son accueil au sein de son service , et surtout pour nous avoir permis une initiation aux techniques de biologie moléculaire et en particulier à la PCR en temps réel au niveau de son laboratoire d'Oncologie Moléculaire Fondamentale et Appliquée (L.O.M.F.A) à l'EHS Pierre et Marie Curie(CPMC).*

*Je tiens également à exprimer mes chaleureux remerciements à ma promotrice **Madame le Professeur AMIR Zine-Charaf** (Chef de Service d'Anatomie et de Cytologie pathologiques au CHU Mustapha- Bacha, Alger) pour le soutien qu'elle m'a apporté et la confiance qu'elle m'a accordée, pour ses conseils et orientations avisés, pour son humanisme et professionnalisme, et à Madame AIT –KACI H. (Maitre de Conférence B en Anatomie pathologique au CPMC) pour sa disponibilité, ses conseils, ses orientations.*

*Je tiens à remercier vivement **monsieur le professeur BOUTARFAYA Ahmed**, directeur de l'université Mohamed KHIDER-Biskra- et **monsieur le professeur BAHRI Mubarek** pour leur confiance et leur soutien incontournable.*

*À mes maîtres et honorables membres de jury :*

**Madame le docteur BOUATROUS Yamina**

*Vous m'avez fait l'honneur d'avoir accepté de jury ce travail, je tiens à vous remercier vivement de toute votre confiance et aide incontournable tout au long mon cursus en DES et en magistère de biologie appliquée.*

**Madame le professeur HANNACHI Leila**

*Vous m'avez fait l'honneur d'avoir accepté de jury ce travail, je tiens à vous remercier infiniment de votre soutien, votre simplicité, votre habituelle collaboration et votre disponibilité au service d'Anatomopathologie du CHU Mustapha.*

***Monsieur le docteur MOUSSI Abdelhamid***

*Vous m'avez fait l'honneur d'avoir accepté de jury ce travail, je vous remercie de votre sérieux, votre éventuelle aide, votre sens de responsabilité à la tête du département des Sciences de la Nature et de la Vie -Biskra-.*

*Mes vifs remerciements à toute l'équipe du Laboratoire d'Anatomie pathologique du centre Pierre et Marie Curie(CPMC) et celle du Service d'Anatomie pathologique du CHU Mustapha Bacha.*

# Sommaire

Abréviations

Glossaire

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction..... 1

## Chapitre I. Étude bibliographique

I.1. Anatomie du colon-rectum..... 3

I.1.1. Aspect macroscopique..... 3

I.1.1.1. Le côlon..... 3

I.1.1.2. Le rectum ..... 4

I.1.2. Etude histologique..... 5

I.1.2.1. Histologie du côlon et organisation de la crypte ..... 5

I.2. Données épidémiologiques sur le cancer colorectal..... 7

I.2.1. Epidémiologie du cancer colorectal..... 7

I.2.2. Classification des cancers colorectaux ..... 7

I.2.2.1. La classification pTNM..... 7

I.3. Carcinogénèse colique..... 7

I.3.1. Séquence adénome -carcinome..... 7

I.3.2. La séquence adénome-cancer: un modèle stochastique..... 9

I.3.3. De la crypte aberrante vers un adénome..... 9

I.4. Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse colorectale..... 10

I.4.1. Voie APC/B-Caténine..... 10

I.4.2. La voie TGF b..... 11

I.4.3. La voie de KRAS..... 12

I.4.3.1. Les mutations du gène KRAS..... 13

I.4.3.2. Les mutations de KRAS et la carcinogénèse colorectale..... 14

I.4.3.3. Les isoformes du gène Kras..... 14

I.4.4. La voie de p53..... 15

I.4.4.1. Structure de p53..... 15

I.4.4.2. p53 et le cancer colorectal..... 16

I.4.4.3. Le mécanisme d'action de p53..... 16

I.4.4.4. p53 et l'arrêt cellulaire..... 17

I.5. La classification moléculaire des cancers colorectaux.....	18
I.5.1. L’instabilité chromosomique (CIN) .....	18
I.5.2. L’instabilité des microsatellites (MSI).....	19
I.5.3.CIMP.....	21

## Chapitre II. Matériel et méthodes

II.1. Matériel .....	23
II .1.1. Matériel biologique .....	23
II.1 .2. Matériel non biologique (annexe 02) .....	23
II.2.Méthodes .....	23
II .2.1 Technique histopathologique.....	23
II .2.1.1 Examens macroscopique.....	24
II.2.1.2. Technique de coloration à l’hématoxyline – Eosine (HE).....	26
II .2.2 Technique immunohistochimique .....	27
II.2.2.1. Principe .....	27
II.2.2.2. Mode opératoire .....	28
II.2.3 Technique de PCR en temps réel .....	30
II.2.3.1 Principe.....	31
II.2.4 Etude Statistique .....	35

## Chapitre III. Résultats et discussion

III.1. Caractéristiques des patients.....	36
III .1.1. Répartition des adénocarcinomes selon le sexe .....	36
III .1.2 .Répartition en fonction de l’âge .....	36
III .1.3. Répartition des adénocarcinomes selon la localisation de la tumeur.....	37
III .1.4. Répartition des adénocarcinomes on fonction de stade pTNM (AJCC, 7ème édition 2009) .....	37
III .1.5. Répartition des adénocarcinomes selon le grade de différenciation .....	38
III.2. Etude histopathologique .....	39
III.2.1. Aspect macroscopique.....	39
III.2.2. Aspect microscopique.....	40
III.3. Etude immunohistochimique de la p53, EGFR, MLH1 et MSH2.....	44
III.3.1.Immunodétection de p53 .....	44
III.3.2.Immunodétectiond’EGFR.....	47

III.3.3.Immunodétection de MLH1.....	49
III.3.4.Immunodétection de MSH2.....	51
III.4. Etude des corrélations entre l'expression EGFR avec les différents paramètres clinicopathologiques.....	53
III.4.1. Corrélation entre l'âge et l'expression d'EGFR.....	53
III.4.2. Corrélation entre le sexe et l'expression d'EGFR .....	54
III.4.3. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression d'EGFR.....	55
III.4.4. Corrélation entre le stade pTNM/ AJCC et l'expression d'EGFR.....	56
III.4.5. Corrélation entre le grade de différenciation et l'expression d'EGFR.....	57
III.5.Etude des corrélations entre l'expression de p53 avec les différents paramètres clinicopathologiques.....	58
III.5.1 .Corrélation entre l'âge et l'expression de p53.....	58
III.5.2. Corrélation entre le sexe et l'expression de p53.....	59
III.5.3. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de p53.....	60
III.5.4. Corrélation entre le stade et l'expression de p53.....	61
III.5.5. Corrélation entre le grade de différenciation et l'expression de p53.....	62
III.6. Etude des corrélations entre l'expression de MLH1 et de MSH2 avec les différents paramètres clinicopathologiques.....	63
III.6.1. Corrélation entre l'âge et l'expression de MLH1 et de MSH2.....	63
III.6.2. Corrélation entre le sexe et l'expression de MLH1 et MSH2.....	65
III.6.3. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de MLH1 et de MSH2..	66
III.6.4. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de MLH1 et de MSH2...	67
III.6.5. Corrélation entre le grade et l'expression de MLH1 et de MSH2 .....	68
III.7 . Détection des mutations du gène KRAS par PCR en temps réel.....	69
III.7.1. Résultats de la phase analytique donnée par l'automate cobas Z 480.....	69
III .7.2. Evaluation du statut KRAS .....	70
III.7.3.Etudes des corrélations entre le statut KRAS est les différents paramètres clinicopathologiques.....	71
III.7.3.1. Corrélation entre l'âge et le statut KRAS.....	71
III.7.3.2. Corrélation entre le sexe et le statut KRAS.....	72
III.7.3.3. Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS.....	73
III.7.3.4. Corrélation entre le stade et le statut KRAS.....	74
III.7.3.5.Corrélation entre le grade et le statut KRAS.....	75

III.7.4. Répartition de l'expression de p53, MLH1 et MSH2 avec le statut KRAS.....	76
III.8. Répartition de l'expression de MLH1 et de MSH2 avec le statut de p53.....	77
III.9.Discussion.....	78
Conclusion .....	86
Références bibliographiques	
Annexes	
Résumé	

## *Abréviations*

5-FU : 5 FluoroUracile.  
ADN : Acide désoxyribonucléique.  
AKT: Protein kinase B.  
APC : Adenomatous Polyposis Coli.  
ARNm : Acide RiboNucléique messenger.  
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated.  
ATP : Adénosine TriPhosphate.  
AXIN : Axis inhibition protein.  
BAX : Bcl2-associated X protein.  
B-RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma B.  
CCR : Cancer Colo-Rectal.  
CCRM : Cancer Colo-Rectal métastatique.  
CDC2 : Cell Division Cycle 2.  
CDC25 : Cell division cycle 25.  
CD44 : Cell adhesion molecules.  
CDKN1A (p21) : Cyclin dependent kinase inhibitor.  
CIMP : CpG Island Methylator Phenotype.  
CIMP-H : CIMP-High.  
CIMP-L : CIMP-Low.  
CIN: Chromosomal Instability.  
CHK2 : Checkpoint kinase 2.  
c-Myc : Myelocytomatosis .  
CpG : Séquence riche en C et G.  
Cyclin B : Dependent Kinase Inhibitor B.  
DCC: Deleted in Colorectal Cancer.  
GAP: GTPase-accelerating protein.  
GDP : Guanosine Diphosphate.  
GL: Glande de Liberkühn.  
Grb2: Growth factor Receptor-Bind protein 2.  
GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3.  
GSK-3B : Glycogen synthase kinase 3 beta.  
GTP : Guanosine Triphosphate.  
EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: Hydroxyde d'Hydrogène.  
HE: Hématoxyline-Eosine.  
hMLH1: Human MutL Homolog 1.  
hMSH2: Human MutS Homolog 2.  
HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer.  
hPMS1: Human Post-Meiotic Segregation 1.  
HRAS : Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog.  
HRP : Peroxydase de Raifort.  
IL-6: Interleukin 6.

kDa : Kilo Dalton.

K-ras : Kirsten rat sarcoma viral oncogene.

LOH : Loss of Heterozygosity .

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MEK/ MAPK: Mitogen-activated protein kinase.

MDM2 : Murin Double Minute 2-

MGAC : Acétate de Magnésium.

MMP-7 :matrix metalloproteinase 7.

MMR : MisMatch Repair.

MSH6 : MutS protein homolog 6.

MSI : Micro-Satellite Instability.

MSI-H : MSI-High.

MSI-L : MSI-Low.

MSS :Microsatellite Stability.

NES: Nestin.

Noxa :(Pmaip1) phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1.

NRAS: Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog.

NS : Non Significant.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

p21 (WAF1/CIP1) : Cyclin-dependent kinase inhibitor.

p110 : Protéine 110.

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale.

PBS : Phosphate Buffered Saline.

PCR : Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaine par polymérase).

PTGS2 : Prostaglandin-endoperoxide synthase 2.

PIK3: phosphatidylinositol 3-kinase.

PIK3CA: Phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha isoform.

PKB: Protéine Kinase B.

PMS2 : Postmeiotic Segregation Increased 2.

PUMA : p53 upregulated modulator of apoptosis.

RTK: Receptor Tyrosine Kinase.

pTNM: pathologic Tumor Nodes Metastasis.

UICC: Manual of Clinical Oncology International Conference on Gene Therapy of Cancer.

RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma.

RALGDS: Ral guanine nucleotide dissociation stimulator.

RAS: Rat Sarcoma.

RCPG: Récepteur couplé aux protéines G.

SH2: Src Homology domain 2.

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4.

STAT-3 : Signal Transducer and Activator of Transcription 3.

TGF- $\beta$  : Transforming growth factor beta.

Tp53 : Tumor protein 53.

TRS: Target Retrieval Solution.

WNT : Wingless-type.

## *Glossaire*

**Adénocarcinome :** tumeur maligne développée à partir d'un épithélium glandulaire.

**Adénome :** tumeur bénigne glandulaire définie par la présence de lésions de dysplasie

**Adjuvant :** chimiothérapie ou radiothérapie administrée après la chirurgie afin de réduire le risque de récurrence du cancer.

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

**Carcinome** ou **épithélioma** est un cancer développé à partir d'un tissu épithélial.

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

**Néoplasie :** il s'agit littéralement «d'une nouvelle formation : néo = nouveau, plasie = tissu» l'appellation de néoplasie est toutefois réservée à la prolifération cellulaire pathologique qui n'est pas contrôlée par les lois de la croissance cellulaire normale ou homéostasie.

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

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

**Polype :** terme macroscopique désignant une excroissance anormale en saillie se développant sur les muqueuses. Certains sont plats (polypes sessiles), d'autres possèdent un 'pied ou tige ' plus ou moins long (polypes pédiculés). de la maladie, de l'issue du traitement et du risque de récurrence.

**Système de stadification TNM :** un système permettant de décrire l'étendue du cancer ; T décrit la taille de la tumeur et si celle-ci a envahi les tissus avoisinants, N décrit tout ganglion lymphatique envahi par le cancer et M décrit les métastases (propagation à distance du cancer d'un endroit du corps à l'autre).

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

## *Liste des figures*

<b>Figure 1.</b> Anatomie du colon-rectum.....	4
<b>Figure 2.</b> Histologie du côlon et des cryptes .....	5
<b>Figure 3.</b> Structure de la crypte.....	6
<b>Figure 4.</b> Organisation de la crypte.....	6
<b>Figure 5.</b> Séquence Adénome-Carcinome.....	8
<b>Figure 6.</b> Voie APC.....	11
<b>Figure 7.</b> Voie TGF- $\beta$ .....	12
<b>Figure 8.</b> Voie de signalisation RAS.....	13
<b>Figure 9.</b> Structure de p53.....	16
<b>Figure 10.</b> Schéma de la modélisation de la cancérogenèse au cours du cancer du côlon sporadique.....	18
<b>Figure 11.</b> Mécanisme de mésappariement – Principe général.....	20
<b>Figure 12.</b> Pièce de résection colique gauche .....	24
<b>Figure 13.</b> Immunomarquage (système de révélation EnVision).....	28
<b>Figure 14.</b> Schéma récapitulatif de l'expérimentation PCR en temps réel Cobas z 480 .....	34
<b>Figure 15.</b> Principe de la sonde Taqman.....	35
<b>Figure 16.</b> Répartition des adénocarcinomes en fonction du sexe.....	36
<b>Figure 17.</b> Répartition des adénocarcinomes en fonction de l'âge.....	36
<b>Figure 18.</b> Répartition des adénocarcinomes selon la localisation de la tumeur.....	37
<b>Figure 19.</b> Répartition des adénocarcinomes en fonction du stade.....	38
<b>Figure 20.</b> Répartition des adénocarcinomes selon le grade de différenciation.....	39
<b>Figure 21.</b> Aspect macroscopique d'une tumeur du colon. (A) : pièce fermée (B et C) .....	40
<b>Figure 22.</b> Aspect microscopique de la muqueuse colique saine après coloration HE .....	41
<b>Figure 23.</b> Aspect d'un adénocarcinome bien différencié, coloration HE .....	42
<b>Figure 24.</b> Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié, coloration HE .....	42
<b>Figure 25.</b> Aspect microscopique des différents types histologiques du cancer colorectal après coloration HE.....	43
<b>Figure 26.</b> Evaluation de l'expression de p53.....	45
<b>Figure 27.</b> Profil IHC de l'expression nucléaire de la p53.....	46
<b>Figure 28.</b> Evaluation de l'expression d'EGFR.....	48
<b>Figure 29.</b> Profil IHC de l'expression membranaire d'EGFR.....	49
<b>Figure 30.</b> Evaluation de l'expression de la protéine MLH1.....	50
<b>Figure 31.</b> MLH1 positive.....	50
<b>Figure 32.</b> MLH1 négative .....	50

<b>Figure 33.</b> Evaluation de l'expression de la protéine MSH2.....	51
<b>Figure 34.</b> MSH2 positive.....	52
<b>Figure 35.</b> MSH2 négative.....	52
<b>Figure 36.</b> Evaluation du statut MSI.....	53
<b>Figure 37.</b> Expression d'EGFR en fonction de l'âge.....	54
<b>Figure 38.</b> Expression d'EGFR en fonction du sexe.....	55
<b>Figure 39.</b> Expression d'EGFR en fonction de la localisation tumorale.....	56
<b>Figure 40.</b> Expression d'EGFR en fonction du stade pTNM.....	57
<b>Figure 41.</b> Expression d'EGFR en fonction du grade de différenciation.....	58
<b>Figure 42.</b> Expression de p53 en fonction de l'âge.....	59
<b>Figure 43.</b> Expression de p53 en fonction du sexe.....	60
<b>Figure 44.</b> Expression de p53 en fonction de la localisation tumorale.....	61
<b>Figure 45.</b> Expression de p53 en fonction du stade.....	62
<b>Figure 46.</b> Expression de p53 en fonction du stade.....	63
<b>Figure 47.</b> Expression de MLH1 et MSH2 en fonction de l'âge.....	64
<b>Figure 48.</b> Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du sexe.....	65
<b>Figure 49.</b> Expression de MLH1 et MSH2 en fonction de la localisation tumorale.....	66
<b>Figure 50.</b> Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du stade.....	67
<b>Figure 51.</b> Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du grade.....	68
<b>Figure 52.</b> Evaluation du statut KRAS et des codons mutés.....	70
<b>Figure 53.</b> Mutation de KRAS en fonction de l'âge.....	71
<b>Figure 54.</b> Mutation de KRAS en fonction du sexe.....	72
<b>Figure 55.</b> Mutation de KRAS en fonction de la localisation tumorale.....	73
<b>Figure 56.</b> Mutation de KRAS en fonction du stade.....	74
<b>Figure 57.</b> Mutation de KRAS en fonction du grade.....	75
<b>Figure 58.</b> Expression de p53, de MLH1 et de MSH2 en fonction du statut KRAS.....	76
<b>Figure 59.</b> Expression MLH1 et MSH2 en fonction du statut p53.....	77

## *Liste des tableaux*

<b>Tableau 1.</b> Expression de p53 en IHC en fonction des scores et selon l'intensité du marquage nucléaire .....	45
<b>Tableau 2.</b> Expression d'EGFR en fonction des scores et selon l'intensité du marquage membranaire .....	47
<b>Tableau 3.</b> Expression de MLH1 au niveau des adénocarcinomes colorectaux .....	50
<b>Tableau 4.</b> Expression de MSH2 au niveau des adénocarcinomes colorectaux .....	51
<b>Tableau 5.</b> Perte d'extinction d'une protéine MMR .....	52
<b>Tableau 6.</b> Répartition de l'expression d'EGFR en fonction de l'âge.....	53
<b>Tableau 7.</b> Répartition de l'expression d'EGFR en fonction du sexe.....	54
<b>Tableau 8.</b> Répartition de l'expression de l'EGFR en fonction de la localisation tumorale. ....	55
<b>Tableau 9.</b> Répartition de l'expression d'EGFR en fonction de stade pTNM/AJCC.....	56
<b>Tableau 10.</b> Répartition de l'expression d'EGFR en fonction du grade de différenciation.....	57
<b>Tableau 11.</b> Répartition de l'expression de p53 en fonction de l'âge.....	58
<b>Tableau 12.</b> Répartition de l'expression de p53 en fonction du sexe.....	59
<b>Tableau 13.</b> Répartition de l'expression de p53 en fonction de la localisation tumorale.....	60
<b>Tableau 14.</b> Répartition de l'expression de p53 en fonction de la localisation tumorale.....	61
<b>Tableau 15.</b> Répartition de l'expression de p53 en fonction du grade de différenciation.....	62
<b>Tableau 16.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction de l'âge....	63
<b>Tableau 17.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du sexe....	65
<b>Tableau 18.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction de la localisation tumorale.....	66
<b>Tableau 19.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du stade...	67
<b>Tableau 20.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du grade...	68
<b>Tableau 21.</b> Résultats du KRAS.....	69
<b>Tableau 22.</b> Génotypage du gène KRAS et des codons mutés.....	70
<b>Tableau 23.</b> Corrélacion entre l'âge et le statut KRAS.....	71
<b>Tableau 24.</b> Corrélacion entre le sexe et le statut KRAS.....	72
<b>Tableau 25.</b> Corrélacion entre la localisation tumorale et le statut KRAS.....	73
<b>Tableau 26.</b> Corrélacion entre le stade et le statut KRAS.....	74
<b>Tableau 27.</b> Corrélacion entre le grade et le statut KRAS.....	75
<b>Tableau 28.</b> Répartition de l'expression de p53, MLH1 et MSH2 avec le statut KRAS	76
<b>Tableau 29.</b> Répartition de l'expression de MLH1 et de MSH2 avec le statut de p53..	77

## ***Introduction***

---

Le cancer colorectal est une pathologie fréquente et grave. L'incidence est régulièrement croissante dans le monde. En Algérie, il est le plus souvent diagnostiqué tardivement au stade localement avancé avec franchissement de toutes les tuniques [1]. Leur pronostic est dans la majorité des cas assez sombre. Cependant, depuis quelques années, de nombreux progrès ont permis une meilleure prise en charge des patients.

La médecine personnalisée est un nouveau concept devenu un des plus grands enjeux de la médecine de demain. Les biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitements font partie intégrante du diagnostic.

Le choix de la thérapeutique se fait en fonction du profil génétique du patient et assure ainsi une meilleure prise en charge de la maladie et une bonne maîtrise du coût de la santé.

L'avenir des traitements en cancérologie et en particulier dans le cancer colorectal, de même que les stratégies de prévention et dépistage sera modelé par l'utilisation des biomarqueurs.

Les oncogènes codent des protéines qui entraînent la perte du contrôle de la croissance. La signalisation dérégulée par l'intermédiaire de KRAS en raison des mutations conduit à une activation constitutive de la voie de signalisation d'EGFR et aboutit à une prolifération cellulaire incontrôlée et à une augmentation de l'angiogenèse.

L'activation constitutive de cette voie se retrouve dans des nombreux cancers y compris le cancer colorectal. Grâce à l'utilisation des techniques de biologie moléculaire, de nombreux types d'anomalies génétiques, en particulier les mutations au niveau des gènes impliqués dans cette voie de signalisation, ont été déterminées.

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

Notre étude, ayant porté sur une série de 60 patients, avait pour objectifs :

- D'individualiser les différents types histologiques du cancer colorectal (**par l'étude histopathologique**).
- Une immunodétection (**par IHC**) des marqueurs pronostiques et prédictifs « p53 et EGFR, MLH1 et MSH2 ».

## *Introduction*

---

- L'évaluation du statut KRAS en vue d'une prescription thérapeutique adaptée (Thérapie ciblée). **Par la technique de biologie moléculaire (PCR en temps réel).**

### **I.1. Anatomie du colon-rectum**

#### **I.1.1. Aspect macroscopique**

##### **I.1.1.1. Le côlon**

Le colon est la portion du tube digestif qui s'étend de la valvule iléo-cæcale à l'anus. Son diamètre est supérieur à celui de l'intestin grêle, mais sa longueur est moindre (environ 1,5 m). Il comporte les segments suivants : le cæcum avec l'appendice vermiculaire, le côlon ascendant, le côlon transverse, le côlon descendant, le sigmoïde, le rectum et le canal anal [2].

Si la limite d'amont du côlon est toujours évidente, sa limite d'aval est moins facile à reconnaître. La « charnière recto-sigmoïdienne » ou « courbure recto-sigmoïdienne » répond pour les anatomistes au segment intestinal situé devant la partie la plus basse de la racine verticale médiane (racine primitive) du mésocôlon sigmoïde, en regard de la troisième pièce sacrée, au niveau où disparaissent les bandelettes coliques, là où se divise l'artère rectale supérieure.

On peut distinguer anatomiquement huit parties successives : le cæcum, le côlon ascendant, l'angle droit, le côlon transverse, l'angle gauche, le côlon descendant, le côlon iliaque et le côlon sigmoïde ou pelvien.

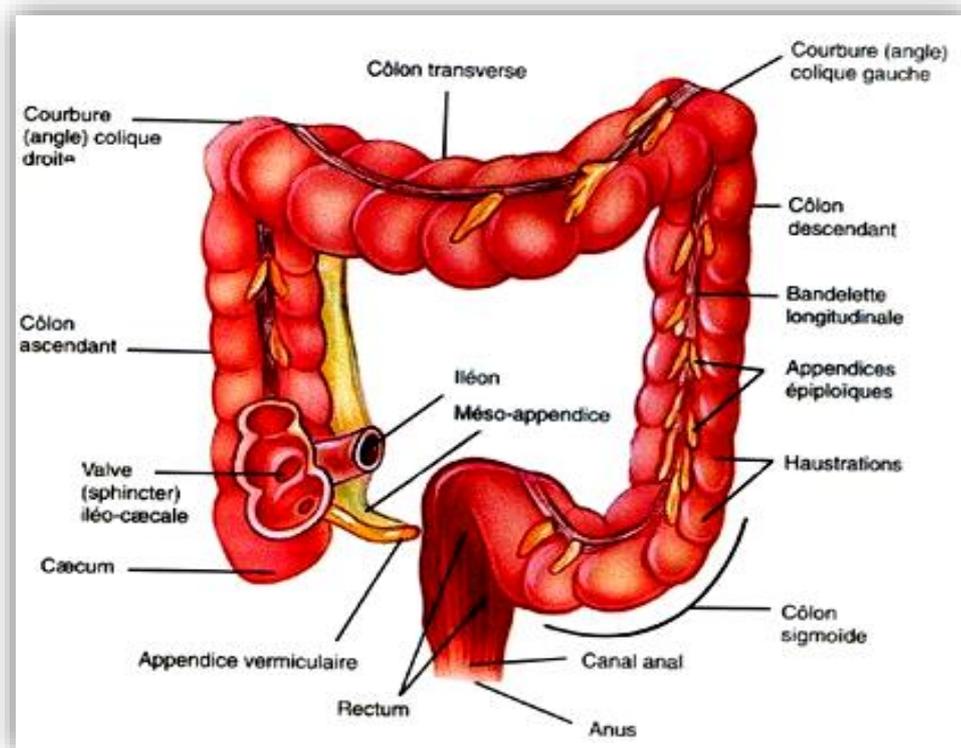
- ✓ Le côlon droit comporte le cæcum, segment initial du côlon situé en dessous de l'abouchement iléal ;
- ✓ le côlon ascendant, relativement superficiel, qui remonte dans le flanc droit pour s'infléchir au niveau de l'angle droit (angle hépatique).
- ✓ Le côlon transverse barre l'abdomen que son méso partage en deux étages. La portion droite du côlon transverse se positionne presque horizontalement le long de la grande courbure gastrique. Le côlon transverse gauche s'enfonce en se dirigeant en haut dans l'hypocondre gauche.
- ✓ L'angle gauche (angle splénique) est profondément situé.
- ✓ Le côlon se recourbe alors vers le bas pour descendre dans le flanc gauche (côlon descendant). En regard de l'aile iliaque, il prend une direction oblique en dedans pour rejoindre le bord interne du muscle psoas (côlon iliaque). Il croise ainsi la fosse iliaque gauche.

## Chapitre I : Etude bibliographique

- ✓ La portion terminale, pelvienne, du côlon gauche (anse sigmoïde) va, en décrivant une boucle à concavité inférieure, des vaisseaux iliaques gauches à la face antérieure de la troisième pièce sacrée [3].

### I.1.1.2. Le rectum

Le rectum est la portion du tractus alimentaire qui établit la continuité entre le côlon sigmoïde et le canal anal. La jonction recto-sigmoïdienne se situe en avant de la troisième vertèbre sacrale. A ce niveau, les ténias (bandelettes musculaires longitudinales) du côlon sigmoïde s'étalent pour former une couche musculaire lisse continue tandis que les appendices (franges) épiploïques disparaissent [4]. Malgré son origine étymologique (rectum=droit), le rectum présente trois courbures latérales qui forment intérieurement trois replis appelés plis transverses du rectum. Ces plis séparent les fèces des flatuosités (c'est-à-dire qu'ils empêchent les fèces de passer avec les gaz intestinaux) [2].



**Figure 1.** Anatomie du colon-rectum (<http://www.hydrocolon-naturopat.com/anatomie.html>).

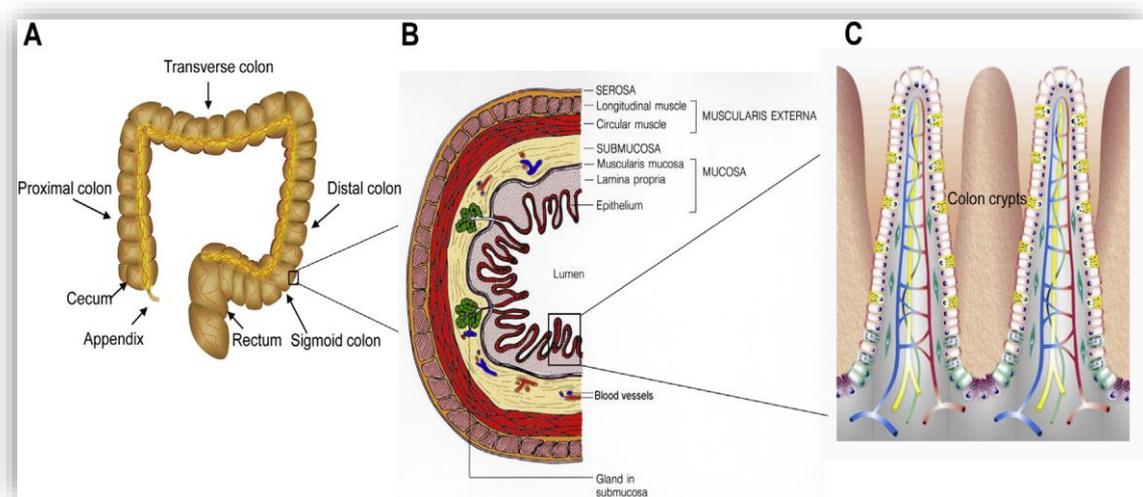
# Chapitre I : Etude bibliographique

## I.1.2. Etude histologique

### I.1.2.1. Histologie du côlon et organisation de la crypte

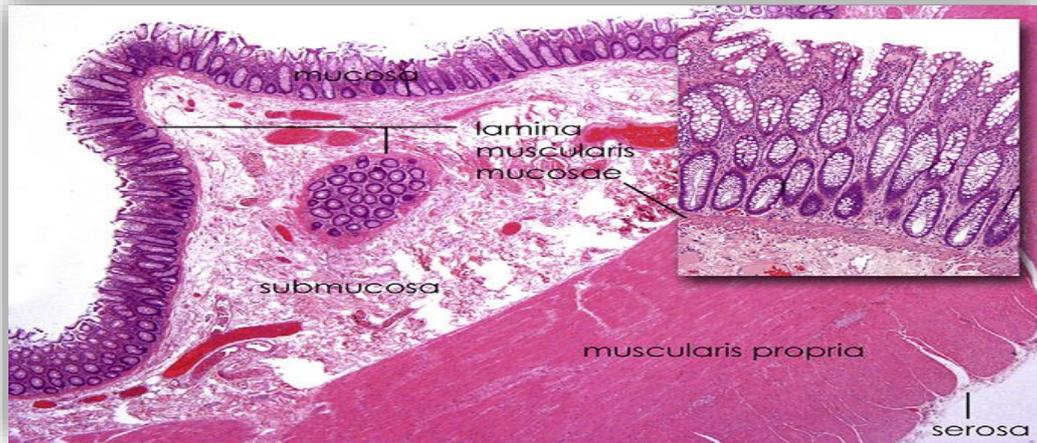
La paroi colique comporte quatre tuniques, superposées de dehors en dedans :

- ✓ La séreuse, constituée par le péritoine viscéral (entourant la surface libre du côlon, jusqu'aux zones fixes).
- ✓ La musculieuse, formée de la superposition de deux couches (comme au niveau de l'intestin grêle) ; externe, longitudinale, incomplète, épaisse uniquement en regard des bandelettes et interne, circulaire.
- ✓ La sous-muqueuse, lâche (plan de glissement entre les deux couches adjacentes).
- ✓ La muqueuse, dépourvue de plis circulaires (valvules conniventes) et de villosités (contrairement à l'intestin grêle [5])



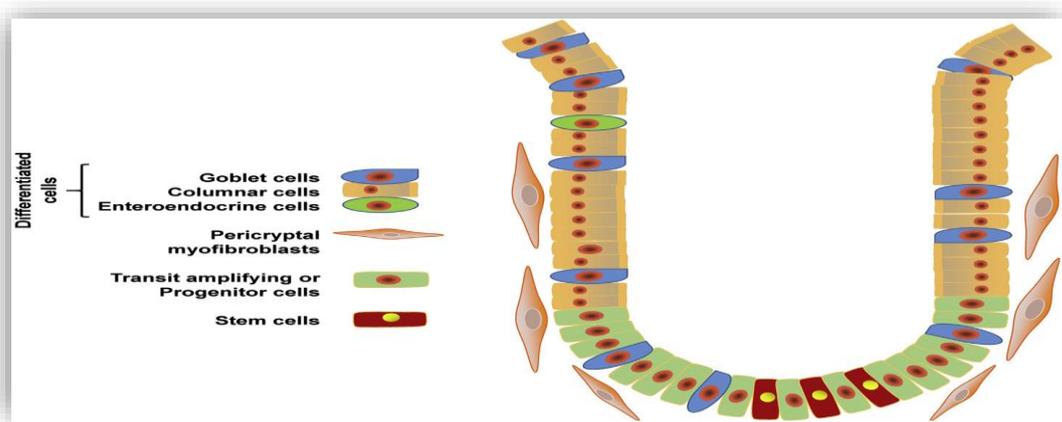
**Figure 2.** Histologie du côlon et des cryptes : il existe quatre couches de la paroi du côlon; de l'intérieur vers l'extérieur de la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculieuse externe, et la séreuse (B). La muqueuse est composée de cryptes de structures distinctes, qui représentent l'unité fonctionnelle du côlon (C) [6].

L'aspect luminal de la muqueuse est composé d'une couche de cellules épithéliales principalement et solidement jointives, pliées dans des saillies en forme de doigt supportés par la lamina propria (Fig. 3). Les cryptes de structures distinctes, nommées les cryptes de Lieberkühn, représentent l'unité fonctionnelle du côlon (Fig. 2 C) [7]. Elles offrent une surface d'absorption maximum en maintenant le renouvellement continu de la barrière étanche que constitue l'épithélium [6][8][9].



**Figure 3.** Structure de la crypte [6].

Le côlon normal est constitué de millions de cryptes, chaque crypte contenant environ 2000 cellules [7]. Au total, trois principales lignées de cellules épithéliales différenciées composent une crypte: premièrement des cellules absorbantes appelées des cellules cylindriques (colonocytes ou entérocytes), des cellules caliciformes sécrétant du mucus, et des cellules endocrines sécrétant des hormones [9][10]. Le renouvellement de ces lignées cellulaires est un processus constant, se produisant tous les 2 à 7 jours lors de l'homéostasie et augmentant après les dommages [11]. Les cellules sont repeuplées continuellement par les cellules souches qui se trouvent près du fond de la crypte [6][12].



**Figure 4.** Organisation de la crypte. Une représentation schématique des cryptes du côlon [6].

Dans le côlon, les cellules souches sont situées à la base de la crypte où elles communiquent avec les cellules de la niche- myofibroblastes pericryptales, qui se trouvent autour de la crypte mais elles communiquent signalisation cellulaire [6][13]. Dans la crypte, la majorité de la prolifération cellulaire se produit dans la zone d'amplification transitaire et la

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

différenciation terminale de l'ensemble des trois lignées, les cellules cylindriques, caliciformes et entéro-endocrines se produisent généralement en distal par rapport à cette région [6].

### **I.2. Données épidémiologiques sur le cancer colorectal**

#### **I.2.1. Epidémiologie du cancer colorectal**

Le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux (CCR) ne cesse d'augmenter depuis 1975. Selon le **GLOBOCAN 2012**, ce cancer occupe le troisième rang à l'échelle mondiale chez les hommes (746 000 cas, 10,0% du total) et le second chez les femmes (614 000 cas, 9,2% du total). L'incidence du CCR varie largement entre les pays, elle est très élevée dans les pays industrialisés (Australie, Nouvelle-Zélande (44,8 et 32,2 pour 100 000 ASR) chez les hommes et les femmes respectivement) et plus faible en Afrique de l'Ouest (4,5 et 3,8 pour 100 000) [14].

En Algérie, son incidence paraît croissante et il est au deuxième rang, après le cancer du poumon, chez les hommes et le cancer du sein, chez les femmes, avec une incidence de 14 pour 100 000 habitants [15].

#### **I.2.2. Classification des cancers colorectaux**

##### **I.2.2.1. La classification pTNM**

La classification internationale pTNM (tumeur maligne [T], atteinte de ganglions [N : nodes], et présence de métastases [M]) de l'UICC est considérée comme la meilleure classification histopronostique, car elle distingue de façon indépendante cinq stades d'envahissement pariétal et trois stades d'extension ganglionnaire. En fonction de l'envahissement locorégional de l'extension ganglionnaire et de la présence de métastases est attribué à un stade pTNM. Les équivalences entre les différentes classifications sont mentionnées dans le tableau 30 (Annexe I)[16].

### **I.3. Carcinogénèse colique**

#### **I.3.1. Séquence adénome-carcinome**

Vers le milieu des années 1970, plusieurs éléments de preuve indirects suggèrent que les adénocarcinomes colorectaux peuvent progresser des adénomes, d'une part une adénomateuse résiduelle a été trouvée adjacente aux carcinomes, d'autre part des foyers carcinomateux ont

## Chapitre I : Etude bibliographique

été observé dans les gros polypes, en plus, il y avait de rares observations d'un polype adénomateux apparaissant dans le développement d'un carcinome invasif [17].

Les personnes touchées par la prédisposition au syndrome d'un cancer tel que FAP, développent invariablement un CCR par la troisième ou quatrième décennie de leurs vies si leurs colons ne sont pas résectionnés [18].

L'étude sur les Polypes confirme l'hypothèse que les carcinomes colorectaux se développent à partir des adénomes à travers l'observation d'une polypectomie par coloscopie qui peut réduire le risque d'un CCR ultérieur [19]. En 1990, Fearon et Vogelstein ont proposé un modèle génétique en plusieurs étapes de la cancérogenèse colorectale dans lequel l'inactivation du gène suppresseur de tumeur le responsable de la polypose adénomateuse coli (APC) se produit d'abord dans la muqueuse colique normale, suivie par l'activation des mutations dans le gène KRAS et d'autres mutations supplémentaires (par exemple, PIK3CA, TP53, et TGF- $\beta$  gènes de la voie de  $\beta$ ) [20][21][22].

Plusieurs principes clés dans la séquence dite adénome-carcinome ont été mis en place ; de multiples coupes génétiques sont nécessaires ; il y a des intermédiaires discrets dans la progression vers le cancer [23][24] et les adénomes proviennent des foyers de cryptes aberrantes dans l'épithélium du côlon [25][6].

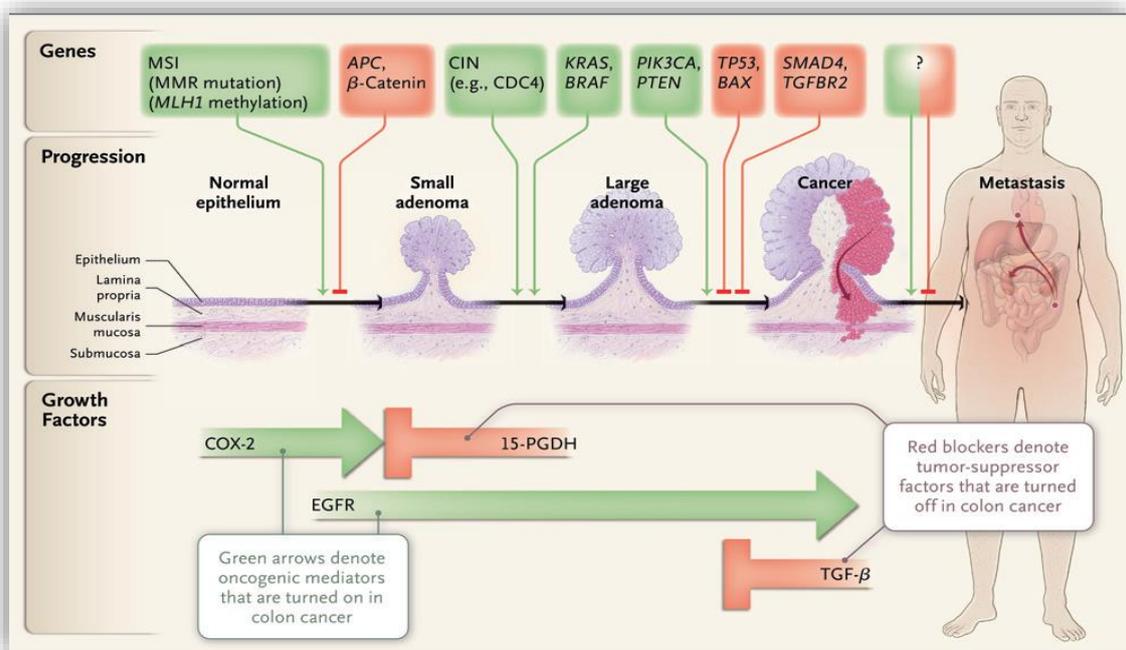


Figure 5. Séquence Adénome-Carcinome [26].

### **I.3.2. La séquence adénome-cancer: un modèle stochastique**

Chaque cancer épithélial, à savoir tous les carcinomes, y compris l'adénocarcinome du colon, est précédé d'une phase pré-invasive des néoplasies intra-épithéliales qui évolue à bas bruit pendant des années. Le processus néoplasique est donc singulier, un seul continuum indivisible qui commence et qui est confiné à l'intérieur de l'épithélium (ici le nom "d'une néoplasie intra-épithéliale) jusqu'à ce que l'invasion à travers la membrane basale se produise, au cours de laquelle le terme «cancer infiltrant» s'applique.

Du point de vue morphologique, le terme «dysplasie» est classiquement utilisé à un cumule de modifications de la morphologie cellulaire et l'architecture des tissus qui définissent une néoplasie intra-épithéliale. La gravité de la néoplasie intra-épithéliale est estimée à partir du degré de déviation de la morphologie cellulaire normale et la structure de la différenciation : le processus néoplasique est supposé progresser vers un carcinome à travers la dysplasie de gravité croissante (bas grade puis haut grade vers carcinome in situ puis infiltrant)[27].

### **I.3.3. De la crypte aberrante vers un adénome**

La néoplasie colorectale est associée à des changements complexes dans la prolifération cellulaire à travers la muqueuse du gros intestin, qui peut être décomposée en deux altérations élémentaires, hyperprolifération et le déplacement vers le haut du compartiment prolifératif [27][28].

Les profils de prolifération cellulaire d'une crypte adénomateuse récapitulative, sont en accord avec l'unification du modèle de «morphogenèse top-down», ces anomalies de prolifération: quel que soit le niveau de dysplasie, en fait, le stade précoce dans la genèse d'un adénome est l'évolution de la zone de prolifération suivie d'une migration rétrograde des cellules en phase S de la base de la crypte et, partant, de la genèse d'un adénome de crypte-unique.

Les cycles ultérieurs du bourgeonnement de la crypte et les fissions soutiennent l'expansion progressive de cryptes dysplasiques par des micro-adénomes de crypte (appelées : des foyers de cryptes aberrantes, ACF) à des adénomes grossièrement évidents ou des polypes adénomateux du gros intestin [27][29]. Des preuves cliniques, épidémiologiques et biologiques soutiennent le rôle d'ACF dans la tumorigenèse colorectale humaine comme un précurseur putatif à des adénomes colorectaux [27][30].

### **I.4. Les voies de signalisation impliquées dans la cancérogenèse colorectale**

#### **I.4.1. Voie APC/B-Caténine**

Le gène APC est nommé le gardien de l'adénome colorectal, localisé sur le chromosome 5q et son altération est généralement associée avec la polypose adénomateuse familiale (PAF) [23][31]. Le gène APC code pour une grande protéine constituée de 2843 acides aminés qui a été impliquée dans diverses fonctions cellulaires. En particulier, la protéine APC est mieux comprise comme un régulateur négatif du facteur de transcription  $\beta$ -caténine, l'effecteur de la voie de signalisation Wnt (le nom est dérivé des ailes *Drosophila melanogaster* mutant), qui contrôle l'expansion coordonnée et la différenciation des cellules souches des cryptes intestinales (homéostasie épithéliale du côlon) [31][32]. Lorsque la protéine Wnt est absente, la  $\beta$ -caténine est également absente, car elle est phosphorylée et ensuite dégradée par un complexe trimérique appelé "complexe de destruction", qui contient des produits de gènes de la GSK-3 $\beta$ , APC et AXIN.

En présence de la protéine Wnt, le signal du «complexe de destruction" est inactivé et les niveaux de  $\beta$ -caténine intracellulaire augmentent, comme résultat la protéine  $\beta$ -caténine est transloquée vers le noyau et stimule des proliférations cellulaires, par l'activation de la transcription de c-myc, cycline D1, le gène codant les facteurs membranaires (MMP-7, CD44), des facteurs de croissance et le feed-back de la voie Wnt se régule [31][33]. Normalement, la voie de signalisation Wnt est inactive, ce qui permet la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine pour ubiquitination et la dégradation protéolytique [31] [32].

Les mutations du gène APC dans le cancer du côlon surviennent tôt au cours de la tumorigenèse et les mutations les plus communes qui atteignent le gène APC sont soit des mutations ponctuelles ou des délétions et des insertions conduisant à des codons stops et donc à des troncatures de la protéine. Dans la plupart des cas, la mutation du gène APC résulte dans la troncature C-terminale de la protéine. Les mutations du gène APC résulte d'une protéine incapable simultanément de réguler et de baisser la voie Wnt et d'induire la phosphorylation de la  $\beta$ -caténine. Dans cette voie, les niveaux cytoplasmiques de la  $\beta$ -caténine augmentent et la prolifération cellulaire est active ce qui conduit finalement à la formation de l'adénome [31] [33]. Cette voie de signalisation explique comment une mutation du gène APC est suffisante pour provoquer la croissance des petits polypes adénomateux intestinaux [31][34].

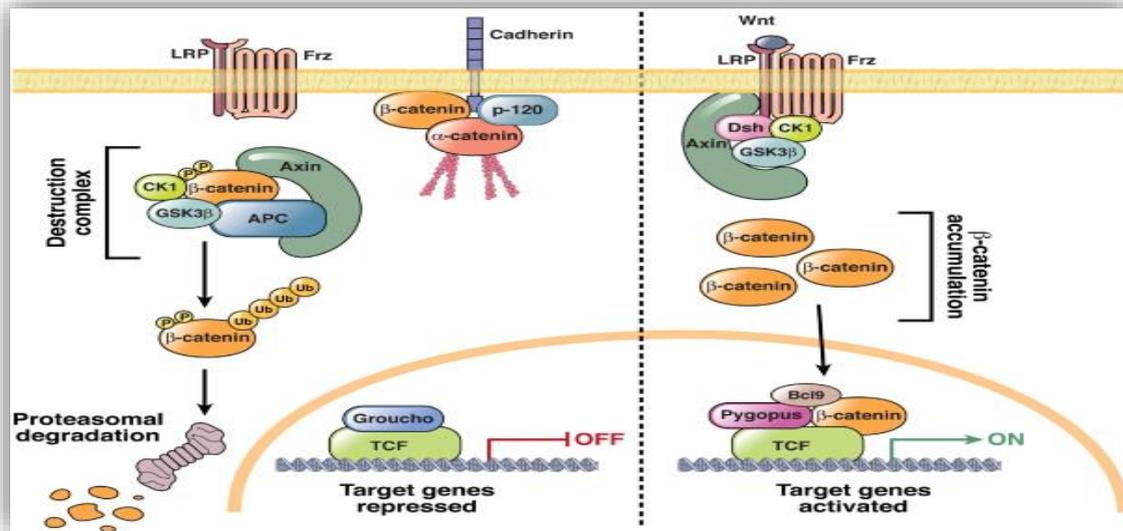


Figure 6. Voie APC [23].

#### I.4.2. La voie TGF b

Les TGF-bs sont des cytokines de 25 kDa qui jouent un rôle principal et central dans l'homéostasie, la cicatrisation des plaies, la fibrose, l'angiogenèse, la carcinogenèse et la différenciation de la cellule [35].

Des mutations observées dans le cancer colorectal comprennent également des gènes qui sont impliqués dans la réponse immunitaire comme TGFBR2 et SMAD4, qui sont tous les deux impliqués dans la transformation du facteur de croissance b (TGF-b) et la transduction du signal. En outre, plusieurs associations d'études du génome-entier ont identifié des variantes génétiques de plusieurs composants de la voie de signalisation TGF-b [36][37]. TGF-b est une cytokine pléiotropique qui se caractérise principalement par une action anti-inflammatoire [37][38]. La liaison du TGF-b à sa cible cellulaire aboutit à la formation de complexes TGFBR1 et TGFBR2, qui interviennent dans la signalisation dans la cellule via l'activation des protéines SMAD y compris SMAD4, qui ensuite se transmet vers le noyau pour conduire l'expression du gène SMAD-reveur.

Toutefois, les données expérimentales sur les mécanismes détaillés de la signalisation de TGF-b au cours du développement du CCR ne sont pas bien définies. D'une part, le TGF-b a exercerait des effets directs sur les cellules tumorales y compris l'inhibition, mais aussi l'activation des voies de prolifération pertinents, y compris la voie PI3K ou la voie WNT [37][39]. D'autre part, le TGF-b interviendrait dans la suppression du système immunitaire grâce à l'induction de cellules T régulatrices [37] [40].

## Chapitre I : Etude bibliographique

Ainsi, le TGF- $\beta$  pourrait atténuer la réponse immunitaire anti-tumorale de l'hôte, mais pourrait aussi diminuer l'inflammation du promoteur tumoral [37] [38]. L'effet protecteur de TGF- $\beta$  a été observé dans la régulation de la transduction du signal et l'activation de la transcription du gène (STAT-3) par l'intermédiaire de l'interleukine-6 (IL-6).

L'importance de l'activation médiatée par IL-6 de STAT-3 a également été démontré dans deux études qui montrent que STAT-3 peut protéger les cellules tumorales contre l'apoptose, favoriser la progression du cycle cellulaire, l'inflammation et participer ainsi à la formation de tumeurs [37][41][42].

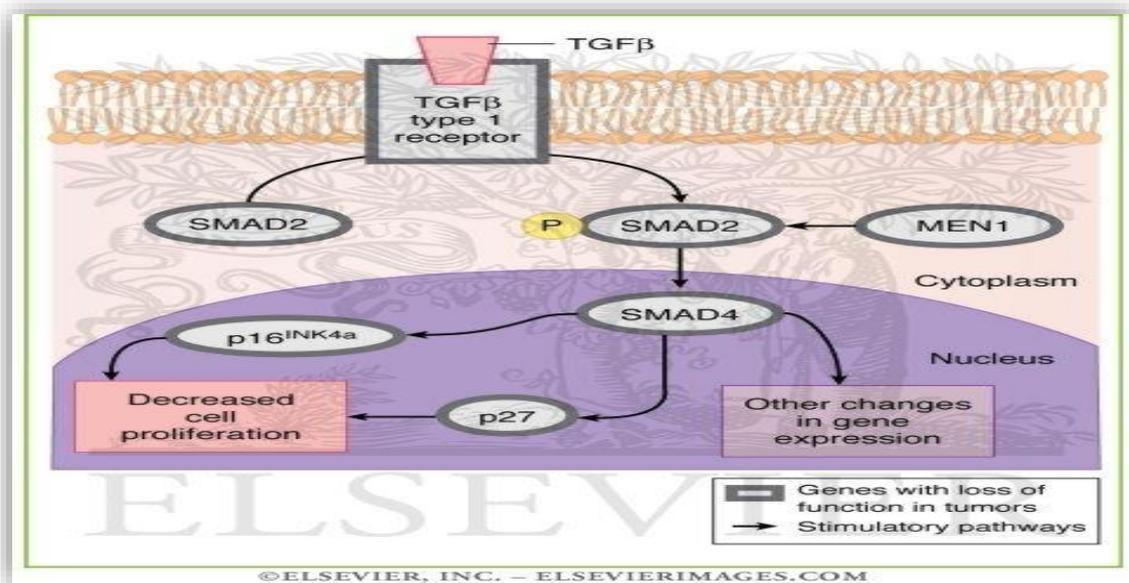


Figure 7. Voie TGF- $\beta$  [43].

### I.4.3. La voie de KRAS

La protéine KRAS sert comme un interrupteur moléculaire binaire impliquée dans les voies de signalisation intracellulaires qui régulent une variété de fonctions cellulaires, y compris la prolifération, l'apoptose, la survie, la différenciation, l'intégrité du cytosquelette, l'adhésion et la migration cellulaire. La protéine KRAS est une protéine G (ou guanosine nucleotide binding proteins) qui se lie soit au CDP lorsqu'il est inactif ou au GTP à l'état actif, et possède une activité GTPase intrinsèque faible. Le changement de l'état inactif (lié au GDP) à l'état actif RAS (GTP) implique l'activation des récepteurs en amont, tels que les récepteurs de tyrosines kinases (RTK), les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG), les récepteurs de serpentes et de cytokines, en se liant à des facteurs de croissance, des cytokines, des mitogènes, et des hormones.

## Chapitre I : Etude bibliographique

La signalisation en amont médiate le mouvement des deux régions commutées pour libérer le GDP du KRAS et lier le GTP. La conformation active liée au GTP du KRAS a une forte liaison d'affinité pour les RAF, PI3K, RalGDS et d'autres intermédiaires de la voie de signalisation, d'où la transduction du signal dans la cellule via d'autres voies. KRAS-GTP a une activité de GTPase intrinsèque lente et inefficace qui est renforcée par la liaison des protéines activant les GTPase (GAP), comme les RasGAP. Cette augmentation de l'activité GTPase libère un phosphate minéral du GTP pour changer au GDP, ainsi le complexe de commutation à un gène KRAS-GDP inactif et le signal transduction cesse [44].

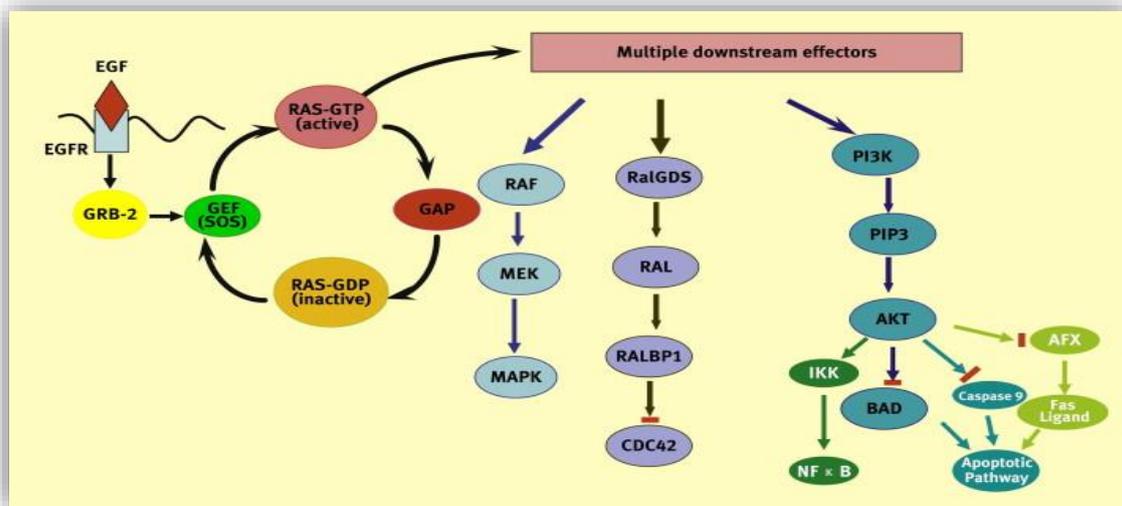


Figure 8. Voie de signalisation RAS [44].

### I.4.3.1. Les mutations du gène KRAS

De la famille des gènes RAS, KRAS, HRAS et les NRAS, l'activation mutationnelle se trouve dans environ 30% de tous les cancers humains, et les KRAS étant les plus fréquemment touchés. L'oncogène KRAS est généralement activé dans les néoplasmes humains par les mutations ponctuelles (substitution d'un acide aminé par un autre) au niveau des codons 12 et 13, moins souvent au niveau du codon 61, et très rarement au niveau des autres sites tels que les codons 59, 146, 19 ou 20 [45]. Ces mutations affectent les régions du polypeptide du KRAS qui sont impliquées dans le GTP-ligand, GAP-ligand et l'activité GTPase. Ces mutations inhibent ou réduisent l'activité GTPase intrinsèque de la protéine KRAS, piégeant ainsi dans une conformation GTP-actif qui génère une signalisation accrue ou constitutive des voies effectrices en aval telles que celles impliquées dans la RAF-MEKMAPK, RalGDS et PI3K-AKT [44] [46][47].

### **I.4.3.2. Les mutations de KRAS et la carcinogénèse colorectale**

Les mutations du KRAS ont été observées à tous les stades de la carcinogénèse colorectale y compris les microadénomes / les foyers de cryptes aberrantes dysplasiques (ACF) [48], les polypes hyperplasiques [49], dans 40 à 50% des adénomes et 40 à 50% des carcinomes [47][48][50]. Les mutations du KRAS ont été retrouvées dans les adénomes de grande taille, suggérant l'association avec une croissance précoce anormale dans la carcinogénèse. Les méta-analyses de données sur la mutation Kirsten RAS dans cancer colorectal (étude RASCAL II) ont montré que sur les 12 mutations possibles du KRAS affectant les codons 12 et 13, il y a que la mutation de glycine en valine au niveau du codon 12 qui a eu un impact statistiquement significatif sur la survie globale et sans récurrence [50], suggérant que cette mutation peut conférer des propriétés de croissance agressives plus tard dans la carcinogénèse de certains cas [44].

Des modèles de souris qui permettent l'expression inductible du KRAS dans l'épithélium intestinal murin ont démontré que l'expression KRAS<sup>Val12</sup> ou KRAS<sup>Asp12</sup> dans l'épithélium intestinal ne fonctionne pas de manière significative dans l'initiation de la croissance seule de l'adénome intestinal, mais le KRAS mutant peut coopérer soit avec d'autres gènes mutants ou cancérogènes à promouvoir la formation de la tumeur intestinale [44][51][52].

### **I.4.3.3. Les isoformes du gène KRAS**

Le gène KRAS utilise l'épissage alternatif pour exprimer deux isoformes, utilise l'épissage des protéines KRAS 4A et KRAS 4B, qui partagent au moins en partie, certaines voies de signalisation communes, conduisant à des réponses cellulaires similaires, mais qui montrent également des différences fonctionnelles distinctes.

Il a été récemment montré que le KRAS 4A a un effet suppresseur de tumeur sur la formation cancérogène-induite de l'adénome colique murin [53]. Cette constatation explique l'avantage sélectif du rapport 4A: 4B de l'isoforme du KRAS modifié vu dans les cancers colorectaux, avec une réduction du KRAS 4A et / ou une augmentation de la transcription du gène KRAS 4B ou les niveaux de protéines [54]. Les niveaux d'expression relatifs de transcription du gène KRAS 4B ont augmenté de façon significative dans les adénomes de souris avec le knock-out complet de l'exon du gène KRAS 4A comparé avec knock-out de l'hétérozygote de l'exon du gène KRAS 4A et le KRAS de type sauvage des souris, suggérant un mécanisme complexe qui régule l'expression des deux isoformes [44].

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

Une preuve d'étude in vitro a suggérée l'implication du KRAS mutant dans une instabilité chromosomique (CIN). De nombreuses études ont montré une fréquence élevée des transitions KRAS G>A après la formation des substances cancérigènes induites par foyers de cryptes aberrantes de l'intestin et les tumeurs, mais ces mutations n'étaient pas associées à la présence de l'aneuploïdie. Cependant, les résultats du KRAS mutant et les cancérigènes induits de la cancérogénèse colorectale étudiée chez les rongeurs ne démontrent pas un lien direct entre la mutation KRAS et l'une ou l'autre causalité ou l'amélioration de CIN dans les tumeurs intestinales [44][52][55].

### **I.4.4. La voie de p53**

#### **I.4.4.1. Structure de p53**

La p53 humaine est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa MW, codée par un gène de 20 kb, contenant 11 exons et 10 introns, situé sur le petit bras du chromosome 17. Ce gène appartient à une famille de gènes hautement conservés contenant au moins deux autres membres, p63 et p73.

La protéine p53 contient 393 acides aminés, composée de trois domaines fonctionnels, à savoir un domaine d'activation N-terminal, un domaine de liaison à l'ADN et un domaine de tétramérisation C-terminal. Le domaine N-terminal comprend un sous-domaine de transactivation et une région de PXXP qui est un fragment riche en proline. Le domaine de liaison à l'ADN central est nécessaire pour la liaison de l'ADN spécifique de la séquence, et les résidus d'acides aminés au sein de ce domaine sont fréquemment mutés dans les cellules cancéreuses humaines et les tissus tumoraux. L'Arg175, Gly245, Arg248, Arg249, Arg273 et Arg282 sont rapportés comme étant des points chauds de mutation dans des divers des cancers humains. La région C-terminale aurait une fonction de régulation.

Les résidus de ce domaine basique C-terminal subissent des modifications post-traductionnelles, y compris la phosphorylation et l'acétylation. NLS, une séquence signale de localisation nucléaire ; NES, une séquence signale d'exportation nucléaire [56].

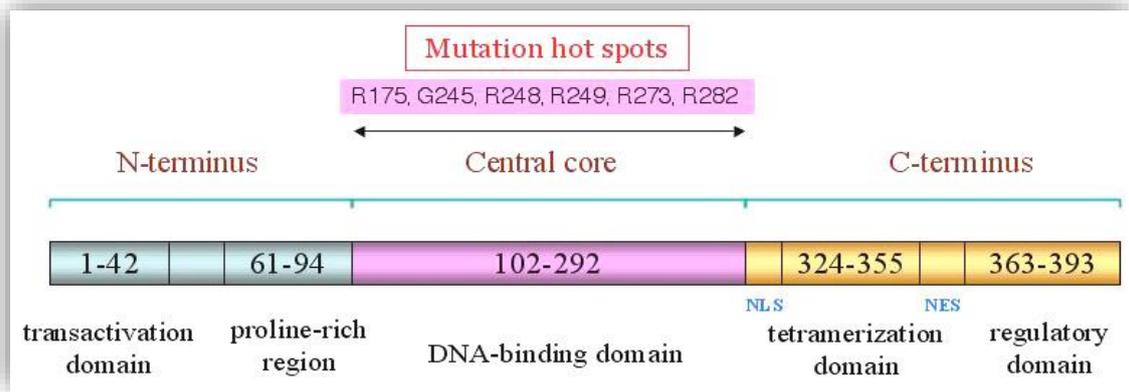


Figure 9 .Structure de p53 [56].

### I.4.4.2.p53 et le cancer colorectal

Des études de génétique moléculaire ont révélé que le bras court du chromosome 17 (17p) est l'un des plus fréquents des sites de perte allélique dans la néoplasie colorectale.

Environ 70% des cancers colorectaux démontrent la perte d'hétérozygotie sur le chromosome 17p. Des études portant sur la cartographie génétique ont bien montré la plus petite région de délétion commune. L'analyse de la séquence de p53 dans les tumeurs avec une perte allélique sur 17p a souvent démontré une mutation dans les autres allèles, impliquant le gène suppresseur de tumeur p53 comme la principale cible dans cette région. La plupart de ces mutations conduisent à la production d'une protéine avec une demi-vie accrue, ce qui est plus facilement détectable par coloration immunohistochimique. Depuis sa première identification, p53 a été décrit comme le gène le plus fréquemment muté dans les cancers humains [57].

Le gène suppresseur de tumeur p53 est muté dans environ 50% de tous les cancers humains dans le monde [58]. Bien qu'il semblait qu'il a une activité oncogénique après avoir été d'abord identifié, p53 a été démontré par la suite comme un gène suppresseur de tumeur qui est muté dans le cancer colorectal [59]. Le gène p53 est un facteur de transcription qui inhibe normalement la croissance cellulaire et stimule la mort cellulaire induite lors du stress cellulaire [60].

### I.4.4.3. Le mécanisme d'action de p53

Le mécanisme le plus commun qui pourrait perturber la voie p53 se fait par une mutation faux-sens qui inactive son aptitude à se lier spécifiquement à sa séquence de reconnaissance apparentée. Cependant, il existe plusieurs autres façons de réaliser le même effet, y compris l'amplification du gène codant pour le MDM2, une ligase ubiquitine qui se lie et dégrade

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

p53 [61], l'inactivation de p14 / p19<sup>ARF</sup> qui se lie et inactive le MDM2 [62], et l'infection par des virus tumoraux à ADN dont les produits (tels que la protéine E6 du virus du papillome humain) lient et inactivent p53.

La protéine p53 a une myriade de fonctions. Elle serait impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, le développement, la différenciation, la recombinaison homologue, la réparation de l'ADN par l'excision, la sénescence, et la ségrégation des chromosomes [63].

La quantité et l'activité de p53, qui est dans la plupart du temps latente en l'absence de contraintes, est augmentée en réponse à une variété de signaux, tels que les dommages de l'ADN, l'épuisement d'un nucléoside, l'hypoxie et la présence d'oncogènes [64]. La régulation de l'activité de p53 par les divers stimuli est hautement complexe et implique plusieurs protéines telles que l'ataxie telangiectasia mutée (ATM), les checkpoints du contrôle du cycle cellulaire, les kinases (CHK), les bris du syndrome de Nimègue (NBS), et la protéine kinase dépendante de l'ADN (de DNAPK). La phosphorylation de p53 par certains de ces médiateurs en amont est cruciale pour son activation. En outre, plusieurs autres formes de modifications, y compris l'acétylation, la méthylation et l'ubiquitination joueraient un rôle important dans la modulation de l'activité du p53 [65].

### **I.4.4.4. p53 et l'arrêt cellulaire**

Une fois activé, p53 déclenche un programme de transcription qui reflète la nature du stress. Les gènes impliqués dans ce réseau initient un des plusieurs programmes, y compris l'arrêt du cycle cellulaire dans les frontières G1 / S et G2 / M, l'apoptose et la sénescence, entre autres [65].

Un important acteur dans l'arrêt en G1 médié par p53 est à la charge de la cycline inhibiteur de la kinase p21(WAF1 / CIP1) [66]. L'arrestation de G2 est atteinte par la capacité de p53 à inhiber l'expression de cycline B et CDC2 [67], ce qui est essentiel pour la transition des phases G2 / M, et pour stimuler l'expression de 14-3-3 $\delta$ , qui séquestre CDC25 dans le cytoplasme le rendant incapable d'activer la cycline B / CDC2. Un autre événement important ; p53 est contrôlé par l'apoptose. p53 active un grand nombre de gènes qui contribuent à l'apoptose [65].

Plusieurs gènes réglementés par p53 (BAX, NOXA, PUMA) améliorent la sécrétion du cytochrome C à partir des mitochondries dans le cytoplasme, ce qui conduit à l'activation de l'apoptose [65]. Il s'agit de la voie apoptotique intrinsèque initié par divers signaux du stress

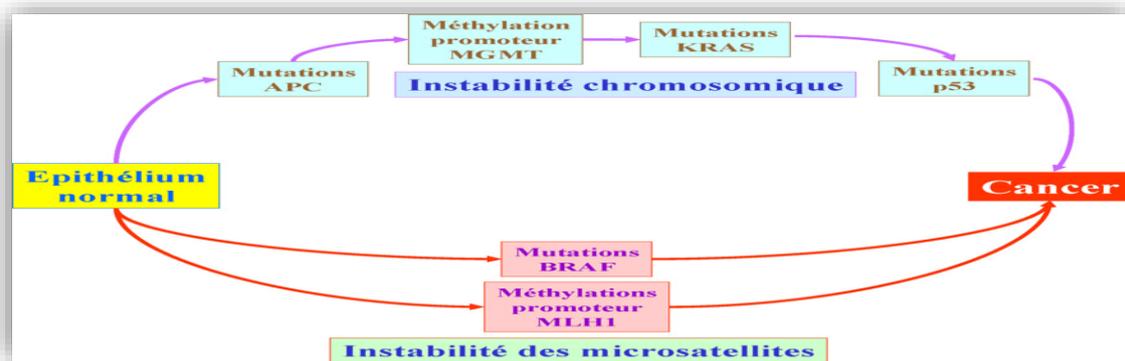
## Chapitre I : Etude bibliographique

qui activent p53. En plus de la voie intrinsèque, p53 régit également plusieurs gènes (ligands Fas, tueur Dr récepteur) qui sont impliqués dans la voie extrinsèque de l'apoptose. À la différence des mécanismes bien étudiés par p53 qui médient l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, peu d'informations sont disponibles sur la façon comment p53 provoque la sénescence cellulaire.

En outre, la décision pour le choix parmi les trois voies, l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose ou la sénescence, choisie pour le destin d'une cellule, n'est pas encore bien compris [68].

### I.5. La classification moléculaire des cancers colorectaux

Pour étudier les corrélations avec les événements moléculaires dans les CCR et les conséquences sur les patients, il est important de classer les CCR selon le statut génomique ou épigénomique. On discute ici les classificateurs moléculaires : CIN, MSI et CIMP. Néanmoins, les événements moléculaires simples sont aussi des classificateurs utiles, en particulier pour prédire la réponse aux thérapies ciblées contre ces molécules [69].



**Figure 10.** Schéma de la modélisation de la cancérogenèse au cours du cancer du côlon sporadique [70].

#### I.5.1. L'instabilité chromosomique (CIN)

L'instabilité chromosomique CIN semble être un phénotype distinct dans le cancer colorectal et les tumeurs CIN montrent des anomalies fréquentes du caryotype et des gains et des pertes chromosomiques [71]. Les pertes alléliques sont assez communes dans les CCR [72] et la CIN est considérée favoriser la carcinogenèse par la perte des gènes suppresseurs de tumeur et les gains d'un nombre de copies d'oncogènes. Bien que les anomalies chromosomiques puissent être plus stochastiques que non aléatoires, un processus de sélection

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

peut faire d'un modèle non aléatoire des aberrations chromosomiques dans les cellules tumorales. Les CIN et les MSI ont tendance à s'exclure mutuellement dans les CCR [69].

CIN peut représenter un phénomène hétérogène. CCR peut avoir plusieurs translocations réciproques avec de petits changements dans le nombre de copies ou un allèle d'ADN contenant [73]. Un tel CCR serait mal classé comme CIN négative par des tests de variation du nombre de copies, y compris LOH ou CGH-array. L'existence de différents mécanismes de CIN (chromosomique toute LOH, la recombinaison mitotique, et la conversion génique mitotique) est également suggérée par une étude approfondie à l'aide CGH-array, tableaux SNP, et la fluorescence multicolore hybridation in situ (FISH) [74].

### **I.5.2. L'instabilité des microsatellites (MSI)**

À la fin des années 1980, il a été démontré que les CCR ont souvent eu deux types d'altérations de l'ADN détectables. Environ la moitié des CCR avaient des mutations K-ras [75], et la plupart avaient de multiples suppressions alléliques aux emplacements putatifs des gènes suppresseurs de tumeur [21]. Un certain nombre de groupes ont développé des nouvelles approches en utilisant la PCR qui permettrait une comparaison de l'ADN tumoral à l'ADN colique normale d'une manière impartiale ou sélective [76].

L'objectif était de dépister le génome du cancer pour les pertes ou les gains chromosomiques, qui pourraient conduire à des loci des gènes suppresseurs de tumeurs ou des nouveaux oncogènes, respectivement. Cependant, en amplifiant de façon aléatoire des séquences courtes d'ADN, quelque chose de tout à fait inattendu a été découverte. Des séquences répétitives courtes - appelés microsatellites – ont souvent expérimentées des délétions ou des insertions dans le génome du cancer qui ne se produit pas dans l'ADN du tissus normal [77].

Trois groupes différents, travaillant chacun indépendamment, reconnue au début de 1993, et ont défini une voie distincte pour l'évolution du CCR [78]. En fait, c'est la découverte de ce second processus, ce qui conduit à une instabilité des microsatellites (MSI), qui a souligné le fait qu'il pourrait y avoir plus d'une seule voie mécanistique au développement du cancer colorectal cancer [77].

## Chapitre I : Etude bibliographique

Alors, MSI se réfère à des longueurs altérées («d'instabilité») de séquences nucléotidiques courtes répétées ("microsatellites") dans l'ADN tumoral par rapport à l'ADN normal. Elle a également été appelée RER (erreur de réplication), phénotype mutateur, et l'instabilité des microsatellites (MIN); Cependant, MSI est devenu le terme le plus couramment utilisé. MSI a été proposée comme un mécanisme cancérogène alternatif pour la voie CIN [79]. Des mutations du codage des répétitions mononucléotidiques dans des gènes suppresseurs de tumeurs, tels que le facteur de croissance transformant (TGF)  $\beta$  type de récepteur 2 (TGFBR2) et BAX se sont révélés être importants dans la carcinogenèse [80][81]. Un degré élevé de MSI (MSI-H) a été révélé comme une raison de défauts dans le système de réparation des mésappariements de l'ADN.

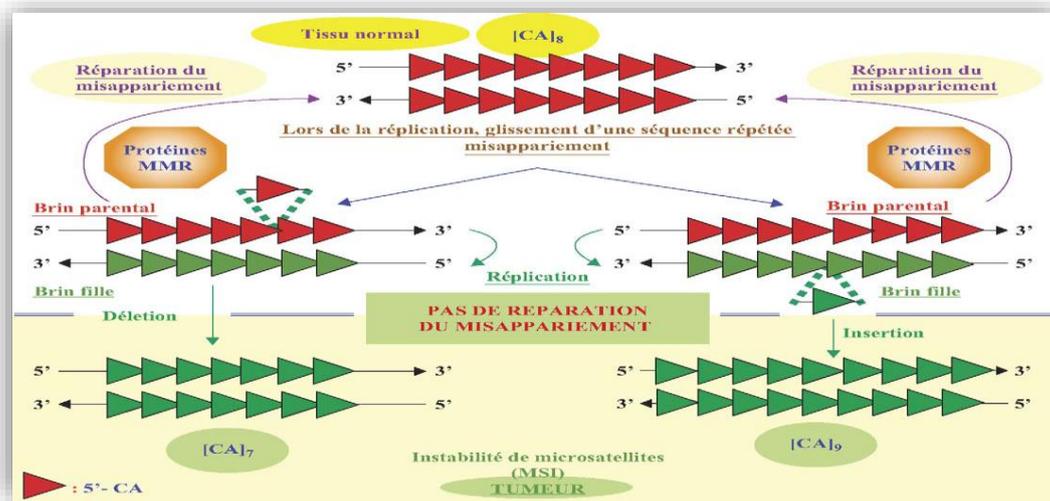


Figure 11. Mécanisme du misappariement–Principe général [70].

**A** : les gènes de réparation des misappariements (MMR, mismatch repair genes) codent pour les protéines de réparation des erreurs de recopiage au cours de la réplication durant la mitose. Souvent, lors du recopiage des microsatellites, l'ADN polymérase fait des erreurs sur le brin d'origine (le brin parental) et/ou sur le brin nouvellement synthétisé (brin fille) et ajoute (insertion) ou enlève (délétion) une ou plusieurs séquences répétées. Normalement, les protéines MMR réparent ces erreurs. Le polymorphisme est conservé dans les cellules transmises aux cellules filles. **B** : dans une tumeur, lorsque, une des protéines du complexe MMR est mutée (syndrome HNPCC) ou au cours d'une modification épigénétique sur le gène MLH1 (cancer du côlon sporadique), la réparation est défectueuse. Le nombre anormal de répétitions est transmis aux cellules filles. Il

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

y a instabilité de microsatellites. Protéines MMR : protéines de réparation des mésappariements (MLH1, MSH2, MSH6, PMS1, PMS2) [70].

La perte fonctionnelle du MLH1 en raison de la méthylation du promoteur et l'inactivation du gène est la cause la plus fréquente de MSI, en particulier dans des cancers sporadiques MSI-H. En revanche, dans le cadre du cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC) / syndrome de Lynch, les mutations dans l'un des gènes de réparation des mésappariements, MSH2, MLH1, MSH6 et PMS2, peuvent causer MSI. MSI-H est présent comme un phénotype distinct dans environ 15% des CCRs [71]. Un certain nombre de caractéristiques pathologiques ont déjà été lié avec MSI-H, tels que la différenciation mucineuse, morphologie chevalière des cellules, comme la réaction lymphoïde de la maladie de Crohn, les lymphocytes infiltrant les tumeurs abondantes, la nécrose de la tumeur, et la faible différenciation [69][82][83] [84][85].

Dans les milieux cliniques, les tests MSI ont été effectués comme un test de dépistage pour l'identification des HNPCC / syndrome de Lynch et parfois comme un marqueur pronostique (généralement MSI-H impliquant un meilleur pronostic) ou un marqueur prédictif de l'efficacité de la chimiothérapie (généralement MSI-H implique une résistance) [69].

### **I.5.3.CIMP**

L'inactivation transcriptionnelle par la méthylation des cytosines aux niveaux des promoteurs des îlots CpG des gènes suppresseurs de tumeur est un mécanisme important dans la carcinogenèse humaine, et un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeurs se sont révélés être réduits en silence par la méthylation du promoteur dans le CCR. En fait, un sous-ensemble des CCRs a été démontré pour présenter une méthylation répandue des promoteurs des îlots CpG, qui est désignée comme CIMP [86]. CIMP a été établie comme un phénotype épigénétique unique dans le cancer colorectal, et CIMP-H des tumeurs colorectales a un profil clinique, pathologique et moléculaire distinct, telles que les associations avec une localisation proximale de la tumeur, le sexe féminin, la faible différenciation, MSI, BRAF-haut et une mutation basse de TP53.

Même au sein des tumeurs MSI-H et dans MSI-L / tumeurs MSS, CIMP-H a été associée à une localisation proximale, une faible différenciation, une mutation BRAF, et la perte de p27 nucléaire [une kinase dépendante de la cycline inhibiteur 1A (CDKN1B)] et elle a été inversement associée avec des aberrations de TP53, une perte de p21 (CDKN1A), la

## *Chapitre I : Etude bibliographique*

---

surexpression de la cyclooxygénase-2 (PTGS2), et une mauvaise localisation cytoplasmique de p27.

Dans les tumeurs MSI-H, CIMP-H a été associée à une mutation mononucléotidique de TGFBR2. La voie de la tumorigenèse a été suggérée dans le développement du cancer colorectal CIMP-H, alors que les adénomes du type plat semblent montrer une méthylation fréquente du promoteur.

Une autre question qui n'a pas encore été résolue est de savoir s'il y a des tumeurs sporadiques MSI-H qui présentent ni la méthylation MLH1 ni le phénomène CIMP. Encore une fois, une étude récente suggère que toutes les tumeurs sporadiques MSI-H étaient explicables par PSEC et la méthylation MLH1, tandis que d'autres études ont suggéré qu'il pourrait y avoir un sous-ensemble des tumeurs sporadiques MSI-H non-CIMP-haute. La fréquence de HNPCC / syndrome de Lynch dans la population générale est estimée de 1 à 3% . Une grande étude de population a suggéré que la fréquence des tumeurs MSI-H non-CIMP-H est ~ 5%; ainsi, il est probable que près de la moitié des tumeurs MSI-H non-CIMP-H ou plus ne se posent pas, soit par HNPCC / syndrome Lynch ou à la voie CIMP -H. Ainsi, l'absence de CIMP-H dans des tumeurs MSI-H ne signifie pas nécessairement HNPCC / le syndrome Lynch, bien qu'elle augmente leur probabilité [69].

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

### **II .1. Matériel**

#### **II .1.1 Matériel biologique :**

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée au niveau du Service d'anatomie pathologique et du laboratoire d'Oncologie Moléculaire Fondamentale et Appliquée (LOMFA) du Centre Pierre et Marie Curie (CPMC).

Cette étude a été réalisée sur 60 échantillons tumoraux provenant des patients opérés d'un cancer colique ou rectal à des stades avancés et différents grades de différenciations.

- L'étude histopathologique et immunohistochimique ont été réalisées sur l'ensemble des cas.
- L'étude immunohistochimique avait pour but l'immunodétection des marqueurs tumoraux EGFR, p53 et les MSI (MLH1 et MLH2).
- L'étude de biologie moléculaire concerne 33 cas de cancer colorectal métastatique (CCRm). Elle consiste à l'évaluation du statut KRAS par PCR en temps réel.

#### **II.1 .2 Matériel non biologique (annexe II)**

### **II.2.Méthodes**

Trois techniques ont été réalisées.

#### **II .2.1 Technique histopathologique**

L'histologie correspond à l'examen de prélèvements tissulaires obtenus soit par biopsie, soit par dissection d'une pièce opératoire d'organes au cours d'une intervention chirurgicale. L'étude anatomopathologique repose sur l'aspect macroscopique des lésions, l'analyse des cellules et des tissus par diverses méthodes principalement basées sur la morphologie. Elle a pour but de confirmer ou de préciser le diagnostic d'une lésion, et de fournir le bilan topographique, surtout s'il s'agit d'un cancer [87]. Des pièces opératoires colique et rectales (ou d'autres types de pièces avec une métastase d'origine colique) du service de chirurgie ont été réceptionnées au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique du CPMC, accompagnées d'une fiche de renseignements comprenant les caractéristiques suivantes l'âge des patients, le sexe, le site tumoral, et un numéro d'enregistrement leur est attribué.

### II .2.1.1 Examens macroscopique

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



**Figure 12.** Pièce de résection colique gauche plus transverse de 60cm fixée au formol (la tumeur est de couleur blanchâtre).

#### ➤ Les étapes de l'étude macroscopique

##### a) Fixation

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

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

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

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

##### b) Circulation (voir Annexe IV)

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

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

### **b.1) Déshydratation**

Le fixateur contenant de l'eau rend l'organe mou après la fixation. Ce dernier doit donc être entièrement déshydraté pour une bonne inclusion dans la paraffine et l'obtention des coupes. L'eau est remplacée par l'alcool des différents bains successifs:

- un bain d'alcool 70° (2heure) ;
- deux bains d'alcool 95° (2heure chacun) ;
- trois bains d'alcool 100° (2heure chacun).

### **b.2) Eclaircissement**

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

### **b.3) Imprégnation à la paraffine**

Pénétration de la paraffine dans les tissus dans 3 bains et chaque bain dure 2 heures de temps pour l'obtention des tissus plus rigides. **L'imprégnation** correspond à la substitution du solvant par la paraffine.

### **c) Enrobage et inclusion (voir Annexe IV)**

Le principe de l'inclusion consiste en un enrobage de la pièce par de la paraffine liquide qui est rigidifiée permettant ainsi de conserver les rapports architecturaux des structures les unes par rapport aux autres et de lui fournir un support externe à la fois pendant et après la coupe.

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

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

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

### c) Confection des coupes (voir Annexe IV)

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 3 à 5 microns d'épaisseur sont mises dans un bain Marie à 37°C puis elles sont étalées sur des lames. Les lames sont mises dans l'étuve à 65°C dont le but d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes.

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

- **Principe**

Le fait de colorer les coupes permet de visualiser les principaux constituants morphologiques des tissus. La coloration usuelle la plus utilisée est la coloration hématoxyline-éosine Mayer. Elle renseigne sur la répartition, l'architecture et la structure des cellules. Le but de cette coloration bi chromique est d'associer un colorant nucléaire (noyaux bleus) et un colorant cytoplasmique (cytoplasmes roses). Il s'agit d'une coloration topographique de routine permettant l'identification des noyaux, du cytoplasme [87]. Cette technique associe une coloration nucléaire en bleu grâce à l'hématoxyline de Harris (colorant basique) et une coloration rose du cytoplasme grâce à l'éosine (colorant acide).

- **Mode opératoire**

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

- **Déparaffinage** se fait dans trois bains de xylène (5 minutes pour chaque bac), pour déparaffiner.
- **Réhydratation** dans 4 bains d'éthanol de concentration décroissante (1 min par bac) pour réhydrater. Les préparations subissent une **déshydratation** qui consiste à retirer l'eau des coupes par des bains successifs d'éthanol.
- **Coloration à l'hématoxyline de Harris** dans un bain pendant 3 min puis un rinçage à l'eau courante, pour colorer les noyaux en bleu.
- **Coloration à l'éosine** 1 bain pendant 1min, on rince à l'eau courante, pour colorer le cytoplasme en rose.
- **Déshydratation** : un bain de l'éthanol de concentration croissante pour déshydrater.

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

- **Eclaircissement** se fait dans un bain de xylène pour éclaircir les tissus.
- **Montage des lames** : dépôt d'une goutte du milieu de montage Eukitt, on recouvre à l'aide d'une lamelle.

### **II .2.2 Technique immunohistochimique**

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

#### **II.2.2.1. Principe**

L'immunochimie est une méthode qui permet de localiser des antigènes (ou protéines) de nature et d'origines variées grâce à l'utilisation d'anticorps spécifiquement dirigés contre eux et révélés par une réaction colorimétrique enzymatique (visible au microscope optique) ou par une substance fluorescente (visible au microscope à fluorescence). Elle peut être réalisée sur des coupes de tissus congelés (cryocoupes) ou fixés et inclus en paraffine (immunohistochimie : IHC), ou sur des préparations cellulaires (immuno-cytochimie : ICC) de diverse nature (cultures cellulaires, liquides biologiques, produits de ponction) [87].

Donc, l'immunohistochimie consiste à mettre en évidence divers antigènes (Ag) cellulaires, ou extracellulaires, grâce à des anticorps (Ac) spécifiquement dirigés contre eux, sur des coupes de tissus fixés, et inclus en paraffine. Les Ag recherchés peuvent être des Ag membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires, ou des protéines de la matrice extracellulaire [88].

#### **Intérêt :**

- localisation précise de certaines protéines ;
- étude de leur lieu de synthèse et leur compartimentation ;
- observation de leur cheminement cellulaire ou tissulaire, transport membranaire ;
- évaluation de leur expression.

Dans notre travail, les substances antigéniques recherchées sont : le récepteur membranaire EGFR, la protéine suppressive de tumeur p53 et les protéines MSI (MLH1 et MLH2).

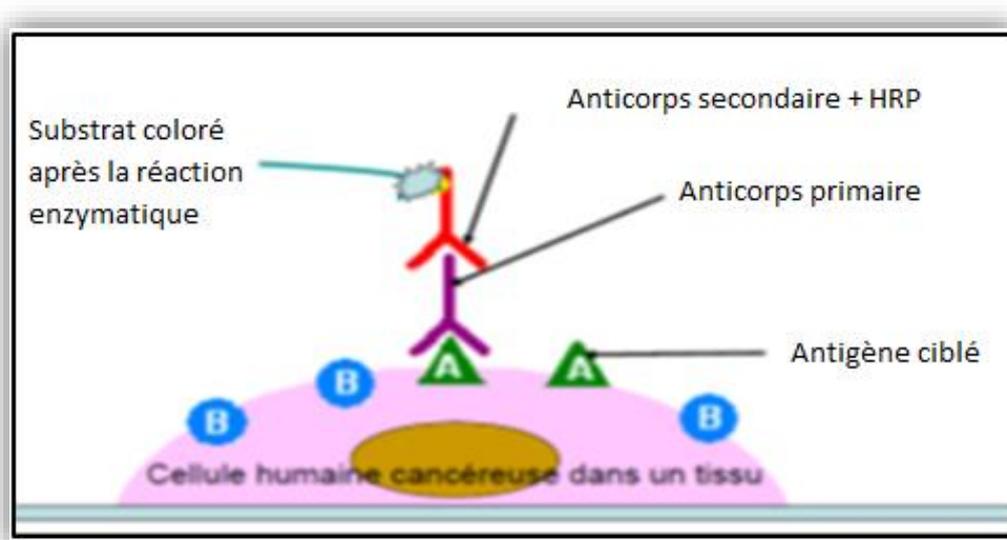
Le système En Vision+HRP est une technique de révélation du marquage, extrêmement sensible et qui s'effectue en deux étapes :

## Chapitre II : Matériels et méthodes

- 1) adjonction d'un polymère (Dextran), marqué à la peroxydase de **Raifort HRP** conjugué à l'anticorps secondaire qui se lie à l'anticorps primaire ;
- 2) adjonction d'un substrat chromogène 3-3 di-AminoBenzidine (DAB).

La peroxydase, qui a pour substrat le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), oxyde la DAB et donne un précipité brun dans le milieu de réaction.

### ❖ Révélation de la technique IHC



**Figure 13** .Immunomarquage (système de révélation EnVision).

### II.2.2. Mode opératoire

#### a) Mode opératoire de la p53, MLH1 et MSH2

- **Coupes tissulaires** : des coupes de 1 à 2  $\mu$ m sont réalisées, à partir des tumeurs rectales ou coliques à l'aide d'un microtome et sont étalées sur lames silanisées pour éviter le décollement des tissus lors de la manipulation.
- **Incubation** : l'incubation est effectuée à 37°C pendant 24h pour une meilleure adhésion des tissus sur lame.
- **Déparaffinage et réhydratation**
  - Les lames sont plongées dans 3 bains (5 min chacun) de xylène pour déparaffiner, puis dans 3 bains d'éthanol de concentration décroissante (5 min chacun) pour réhydrater.
  - Les lames sont rincées par l'eau distillée.

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

- **Démasquage antigénique**

- Les lames sont plongées dans la solution TRS pH = 9 préchauffée dans un bain marie entre 97 et 99°C pendant 40 minutes pour la p53.

-Concernant les protéines MLH1 et MSH2, on procède à la même étape en changeant le pH et en utilisant une solution TRS de pH=7.

- Puis elles sont laissées refroidies sur la paillasse à température ambiante pendant 20 minutes pour le démasquage des antigènes. Après elles sont rincées à l'eau distillée.

- **Blocage de la peroxydase endogène**

- La zone étudiée est délimitée à l'aide du DAKO Pen (hydrophobe et insoluble dans l'acétone et l'alcool).

- Les sites antigéniques non spécifiques sont bloqués par l'action de la peroxydase block (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (5 minutes pour p53) et (10 minutes pour MLH1 et MSH2).

- Les lames sont rincées à l'eau distillée puis au PBS (phosphate buffered saline) 5 minutes chacun.

- **Application de l'anticorps primaire**

- 200 µl d'anticorps primaire Mousse Monoclonal Anti-humain p53 protéine Clone Do-7 est déposé sur les tissus encerclés (30 minutes) dans une chambre humide et obscure.

-100 µl d'anticorps primaire Mousse Monoclonal Antibody MLH1 (G168-728) est déposé sur les tissus encerclés (45 minutes) dans une chambre humide et obscure.

-100 µl d'anticorps primaire Mousse Monoclonal Antibody MSH2 (G219-1129) est déposé sur les tissus encerclés (30 minutes) dans une chambre humide et obscure.

-Les lames sont rincées 2 fois par la solution de PBS (5 minutes pour chacune).

- **Application de l'anticorps secondaire**

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

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

- **Révélation** - Le chromogène-substrat DAB est déposé et on incube pendant 5 à 10 minutes. L'enzyme dégrade le substrat DAB, le produit qui en résulte en présence du chromogène donne une coloration marron. Les lames sont rincées à l'eau distillée.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

- **Contre coloration**

- Les lames sont immergées 2 minutes dans l'hématoxyline de Mayer ;
- elles sont rincées à l'eau courante jusqu'à ce que l'eau devienne limpide ;
- l'immersion est effectuée dans un bain d'eau ammoniacée ;
- les lames sont rincées à l'eau distillée.

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

- **Montage** : une goutte du milieu de montage (Faramount) est déposée puis recouverte par la lamelle.
- **Observation** : elle est réalisée à l'aide d'un microscope photonique aux grossissements Gr20x et Gr40x. Les photos sont prises à l'aide d'un appareil photos Samsung.
- Localisation de la p53 et les protéines MSI (MLH1 et MSH2) est nucléaire.

### b) Mode opératoire de révélation de L'EGFR

La différence entre les 2 protocoles :

- Pour l'EGFR, on ne fait pas l'étape de démasquage antigénique au TRS, mais on applique directement une enzyme sur les lames qui est **la protéinase k**.
- On ajoute **la protéinase k** (5 minute), puis Rinçage à l'eau distillé.
- Blocage des sites antigéniques non spécifique par l'action de la peroxydase block (5 minutes), Rincer délicatement au PBS (2 fois 5 minutes).
- Application de l'anticorps primaire (**Anti –Epidermal Growth Factor Receptor (3C6)**).
- Les autres étapes sont les mêmes que celles de p53.
- Localisation de l'EGFR est membranaire.

### II.2.3 Technique de PCR en temps réel

Cette technique a été faite au niveau du laboratoire de biologie moléculaire fondamentale et appliquée du service d'oncologie du CPMC et d'autres échantillons ont été réalisés au niveau du laboratoire Bio Marker Solutions Ltd à Londres.

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

### **II.2.3.1 Principe**

La PCR en temps réel utilise le même principe que la PCR classique, il s'agit d'amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique. Mais Avec différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel grâce à deux marqueurs fluorescents (suppresseur et émetteur) [89].

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

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

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

- 1) **Phase pré analytique**

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

- **Préparation des coupes**

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

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

- 2) **Phase analytique**

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

## **Chapitre II : Matériels et méthodes**

---

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

### **A) Déparaffinisation des sections FFPET**

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

### **B) Extraction de l'ADN**

#### **➤ Lyse des cellules et élimination des protéines (les histones)**

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

#### **➤ Précipitation de l'ADN**

- Ajouter 200  $\mu\text{L}$  de Tampon de liaison de l'ADN à la paraffine (**DNA PBB**) dans chaque tube
- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  d'isopropanol à chaque tube.
- Transférer chaque lysat dans les tubes de filtration avec bouchons (**FT**) et les tubes de prélèvement (**CT**), puis centrifuger à 8 000 xg pendant 1 minute.

#### **➤ Premier lavage (élimination des débris cellulaires)**

- Ajouter 500  $\mu\text{L}$  Tampon de lavage I (**WB I**) de l'ADN actif à chaque tube de filtration avec bouchons (**FT**) puis Centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute.

#### **➤ Deuxième lavage**

- Ajouter 500  $\mu\text{L}$  de Tampon de lavage II (**WB II**) puis Centrifuger à 8 000 x g pendant 1 minute.

#### **➤ Elution (neutralisation du milieu et récupération d'ADN)**

- Ajouter 100  $\mu\text{L}$  de Tampon d'éluion de l'ADN (**DNA EB**) puis centrifuger le **FT** avec le tube d'éluion à 8 000 x g pendant 1 minute pour recueillir l'éluat dans le tube d'éluion.

## Chapitre II : Matériels et méthodes

---

### C) Quantification de l'ADN

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

### D) Calcul des volumes de dilution (Annexe V)

Les ADN des échantillons extraits peuvent être conservés au réfrigérateur (>4°C) ou utilisés immédiatement pour l'amplification et la détection.

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

### E) Dilution de l'échantillon

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

### F) Préparation des mélanges réactionnels actifs (MMX)

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

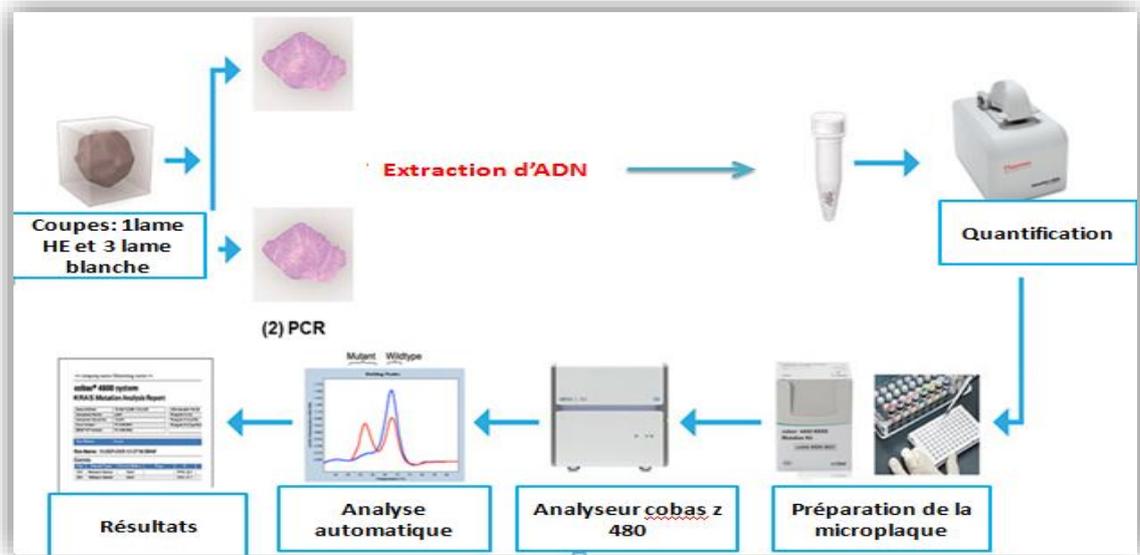
**Remarque :** la détermination du volume de chaque réactif nécessaire pour la préparation du MMX actif en fonction du nombre d'échantillons inclus dans le run, se fait selon le tableau 37 (**Annexe V**).

### G) Préparation du milieu réactionnel dans la microplaque (Annexe V)

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

### H) Amplification par PCR en temps réel

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

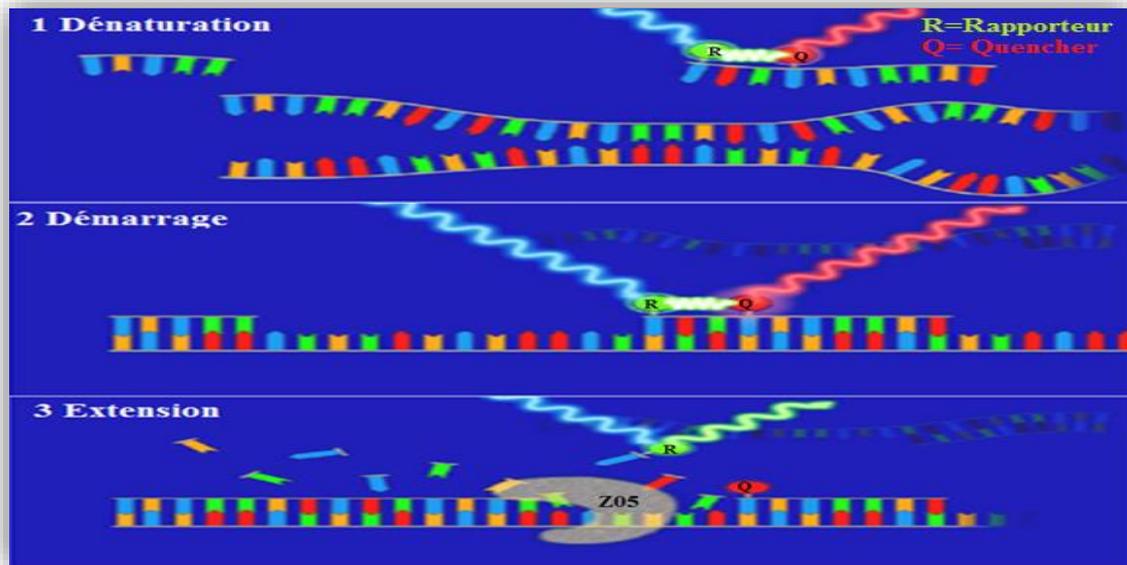


**Figure 14.** Schéma récapitulatif de l'expérimentation PCR en temps réel Cobas z 480.

### ➤ Détection automatisée des mutations par PCR en temps réel

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

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



**Figure 15.** Principe de la sonde Taqman.

### II.2.4 Etude Statistique

Les différents paramètres cliniques et histopathologique sont examinés avec les résultats d'immunohistochimie (EGFR, p53, MSI). Le test  $\chi^2$  de Pearson a été utilisé pour l'étude statistique. Le p-value permet de déduire, s'il existe une relation entre chaque paramètre et l'expression de trois différents biomarqueurs (p-value < 0.05 résultat significatif), la valeur p est obtenue par le logiciel « STATISTICA ».

### III.1 Caractéristiques des patients

Il s'agit de 60 patients atteints de cancer colorectal (CCR) de moyenne d'âge 56,87 ans (extrêmes : 29-83).

Tous ces patients ont subi une résection colique ou rectale ou une autre résection d'un autre organe (le foie, l'ovaire...) avec une métastase d'origine colique, Selon les cas, les malades ont été traités par radiothérapie pré-opératoire suivie d'une chimiothérapie pour les tumeurs de bas et moyen rectum, Soit par chimiothérapie uniquement ou bien une chimiothérapie associée à des thérapies ciblées (Cetuximab).

#### III .1.1 Répartition des adénocarcinomes selon le sexe

Dans notre étude la répartition en fonction du sexe montre un sex-ratio = 1,07. Femmes n=29 ; Hommes n= 31.

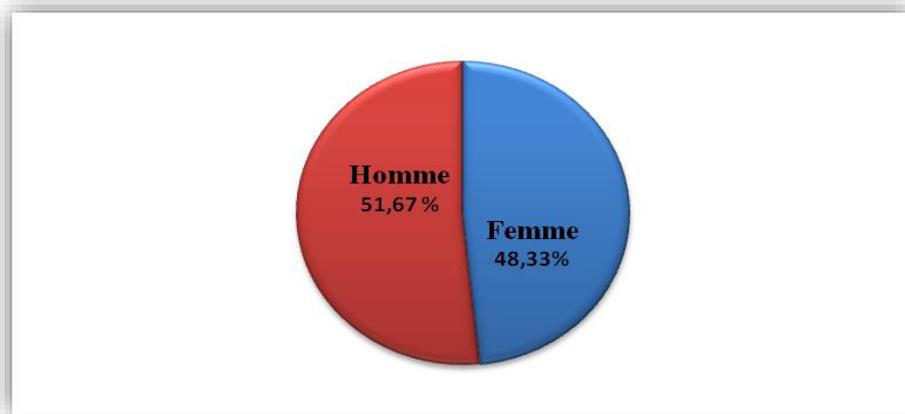


Figure 16. Répartition des adénocarcinomes en fonction du sexe.

#### III .1.2 Répartition en fonction de l'âge

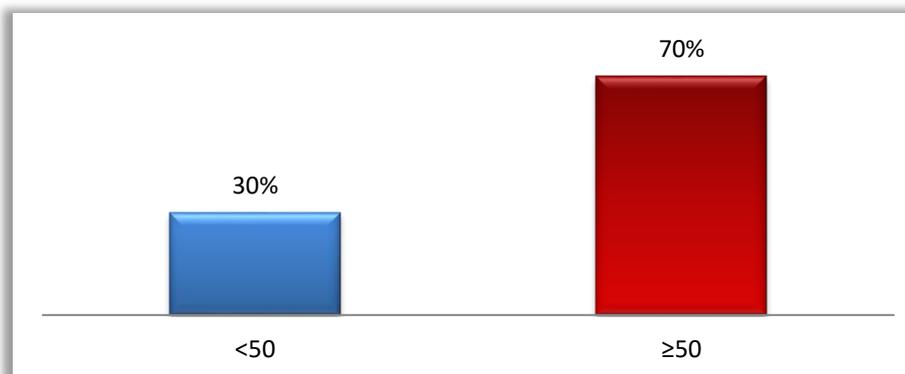
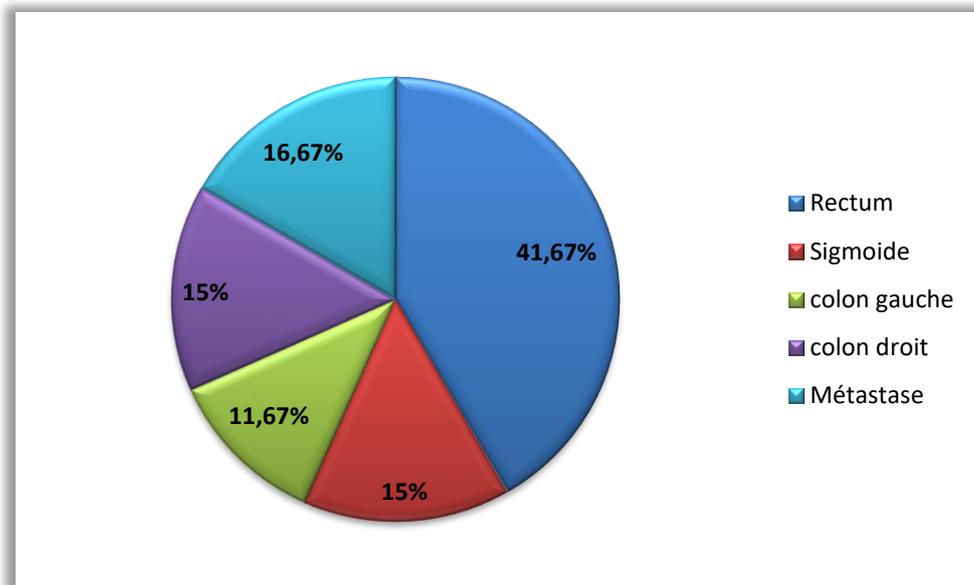


Figure 17. Répartition des adénocarcinomes en fonction de l'âge.

Une répartition par tranche d'âge, montre un pic important pour l'intervalle d'âge  $\geq 50$  ans, n=42 cas (70 %).

- < 50 ans, n= 18 cas (30 %).

### III .1.3 Répartition des adénocarcinomes selon la localisation de la tumeur



**Figure 18.** Répartition des adénocarcinomes selon la localisation de la tumeur.

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

La localisation colique, n= 25 cas (41,67%) répartis comme suit :

- 9 cas au niveau du sigmoïde (15%).
- 7 cas au niveau du colon gauche (11,67%).
- 9 cas au niveau du colon droit (15%).

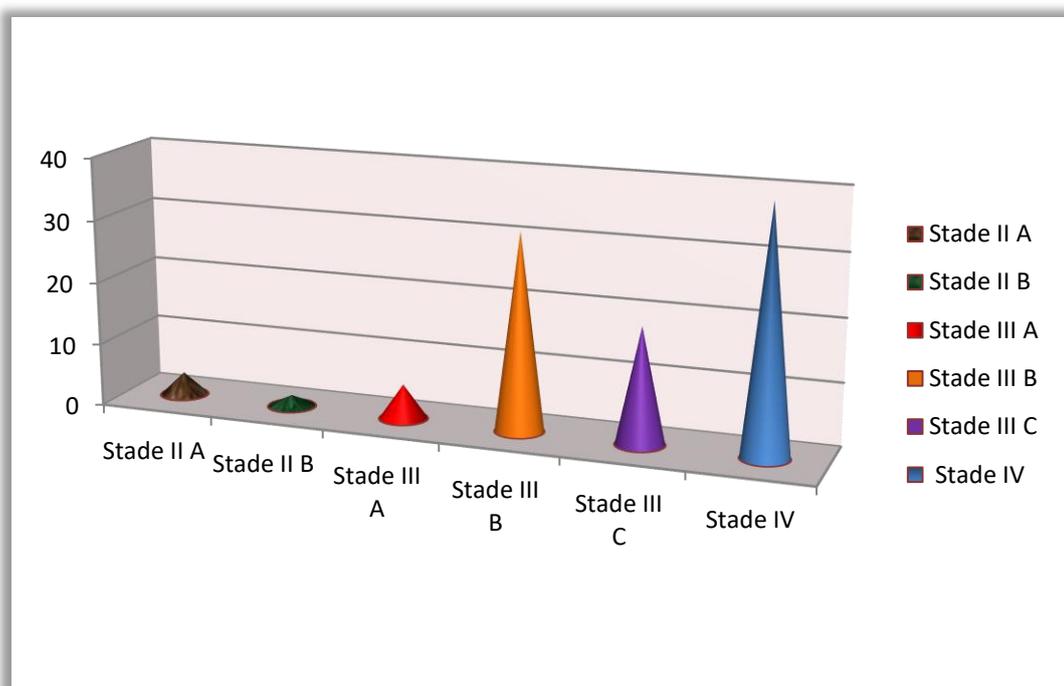
La localisation rectale : n=25 cas (41,67%), parmi les quels 11 cas sont localisés au niveau de la charnière recto-sigmoïdienne.

La localisation métastatique : n=10 cas (16,67%), répartis dans différents organes à savoir le foie, l'ovaire, l'utérus, le péritoine, l'abdomen, le grêle ...

### III.1.4 Répartition des adénocarcinomes on fonction de stade pTNM (AJCC, 7<sup>ème</sup> édition 2009)

- Stade I = pT1-T2 N0 M0
- Stade II A = pT3 N0 M0
- Stade II B = pT4 N0 M0
- Stade III A = pT1, T2, N1 M0
- Stade III B = pT3, T4, N1 M0

- Stade III C = tous T, N2 M0
- Stade IV = tous T, tous N, M1



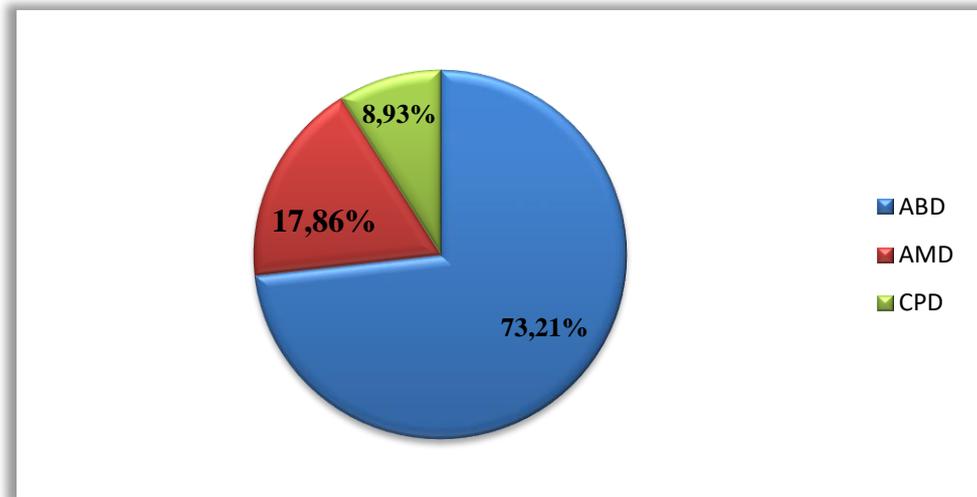
**Figure 19.** Répartition des adénocarcinomes en fonction de stade.

Dans notre série on a **30 cas de stade III (55,55%)** nous notons :

- Stade II A : 2cas (3,70%).
- Stade II B : 1 cas (1,85%).
- Stade IIIA 3 cas (5,56%).
- Stade IIIB 17 cas (31,48%).
- Stade IIIC 10 cas (18,52%).
- stade IV 21 cas (38,89%).

### III .1.5 Répartition des adénocarcinomes selon le grade de différenciation

Les adénocarcinomes représentent la majorité des types histologiques des cancers colorectaux.



**Figure 2.** Répartition des adénocarcinomes selon le grade de différenciation.

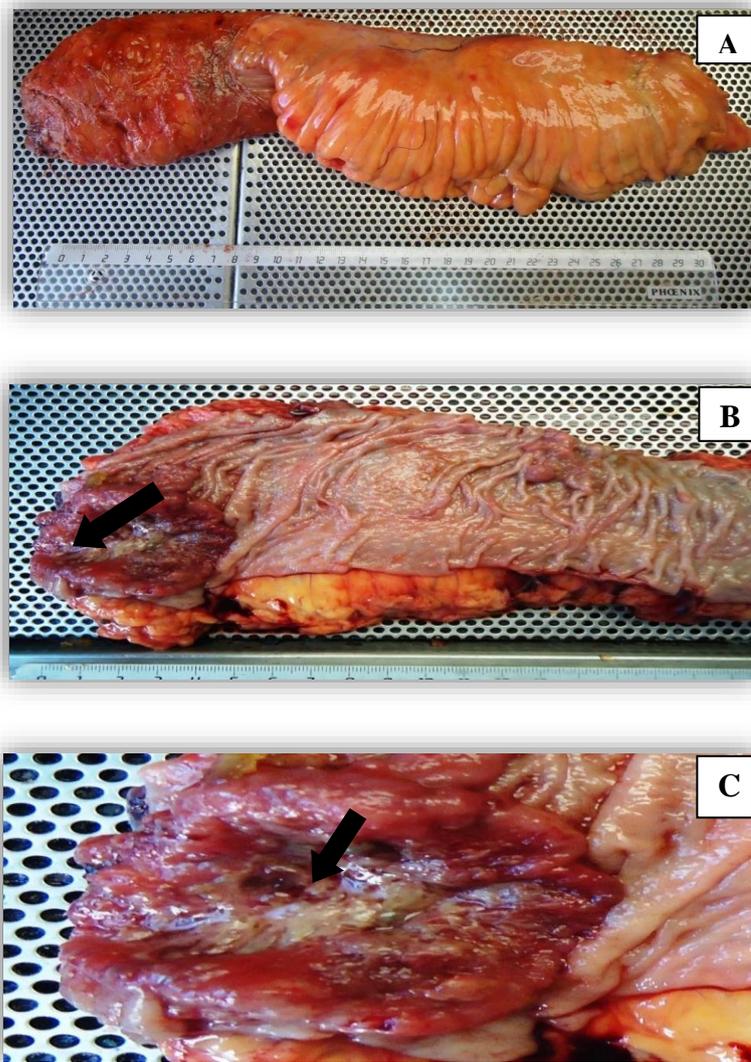
Concernant la répartition selon le grade de différenciation de la tumeur nous notons :

- Adénocarcinomes bien différenciés n= 42 cas (73,21%) sont les prédominants.
- Adénocarcinomes moyennement différenciés n= 10cas (17,86%).
- Carcinomes peu différenciés : n= 5cas (8,93%) et ils se répartissent en :
  - Carcinomes colloïdes muqueux : n=3 cas
  - Carcinomes peu différenciés : n=2 cas

### III.2 Etude histopathologique

#### III.2.1. Aspect macroscopique

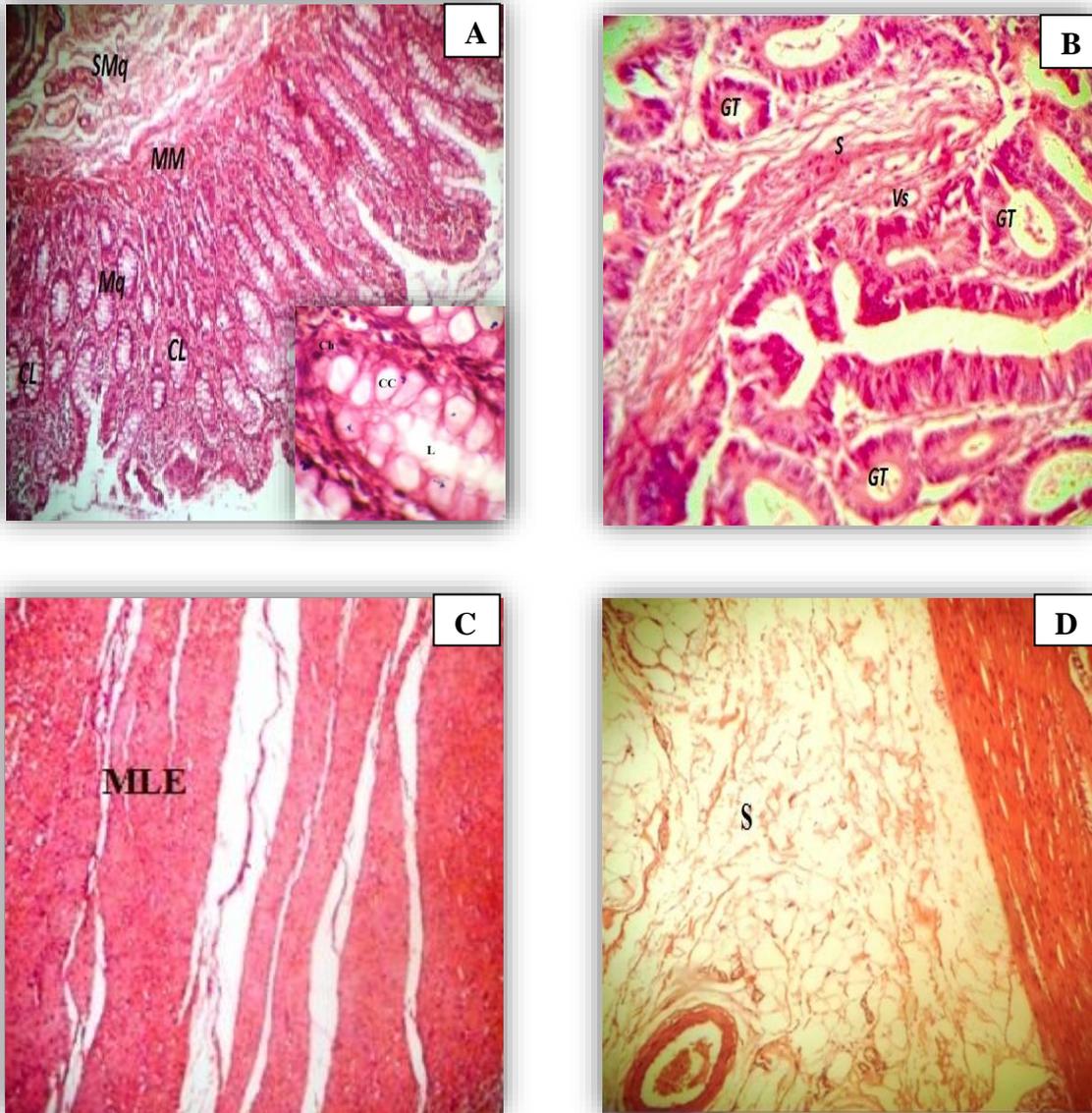
L'aspect macroscopique des résections des pièces coliques ou rectales montre une masse tumorale bourgeonnante, arrondie et consistante, avec un centre ulcéré par rapport à la muqueuse saine qui est plane. Les masses tumorales sont dotées d'une coloration légèrement plus foncée que le tissu sain avoisinant.



**Figure 21.** Aspect macroscopique d'une tumeur du colon. (A) : pièce fermée (B et C) : à l'ouverture présence d'un foyer tumoral (flèche).

### III.2.2. Aspect microscopique

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



**Figure 22. Aspect microscopique de la muqueuse colique saine après coloration HE (G 20X).**

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

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

**Figure 22 :**

- **La muqueuse (Mq)** : elle présente des glandes tubuleuses droites serrées (cryptes de lieberkühn (**CL**) qui comprennent de nombreuses cellules caliciformes sécrétrices de mucus dont la base repose sur une couche fine de cellules musculaires lisses ou

### Chapitre III : Résultats et discussion

**musculaire muqueuse (MM).** Des entérocytes sont également présents. Elles sont soutenues par un chorion (**Ch**) parsemé de leucocytes (**Figure 22A**).

- **La sous muqueuse (SM)** c'est un tissu conjonctif lâche qui renferme des vaisseaux sanguins (VS) et lymphatiques, des follicules lymphatique et des neurofibres. (**Figure22B**).
- **La musculuse (M)** : elle est composée d'une couche de muscle lisses circulaire interne (**MCI**) et d'une couche longitudinale externe (**MLE**) discontinue (**Figure 22 C**).
- **La séreuse (s)** :c'est la couche la plus externe, elle a un rôle protecteur et est formée par le péritoine viscéral. Elle se compose de tissu conjonctif lâche aréolaire recouvert de mésothélium (**Figure 22D**).

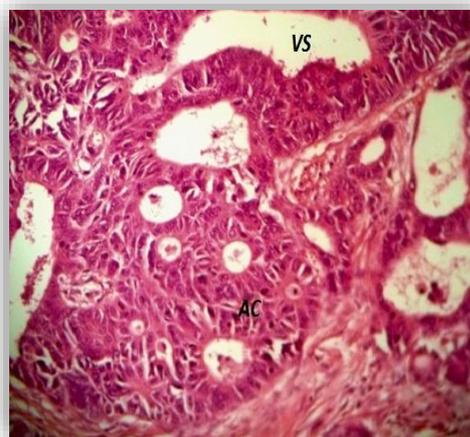
#### Aspects histologiques du CCR

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



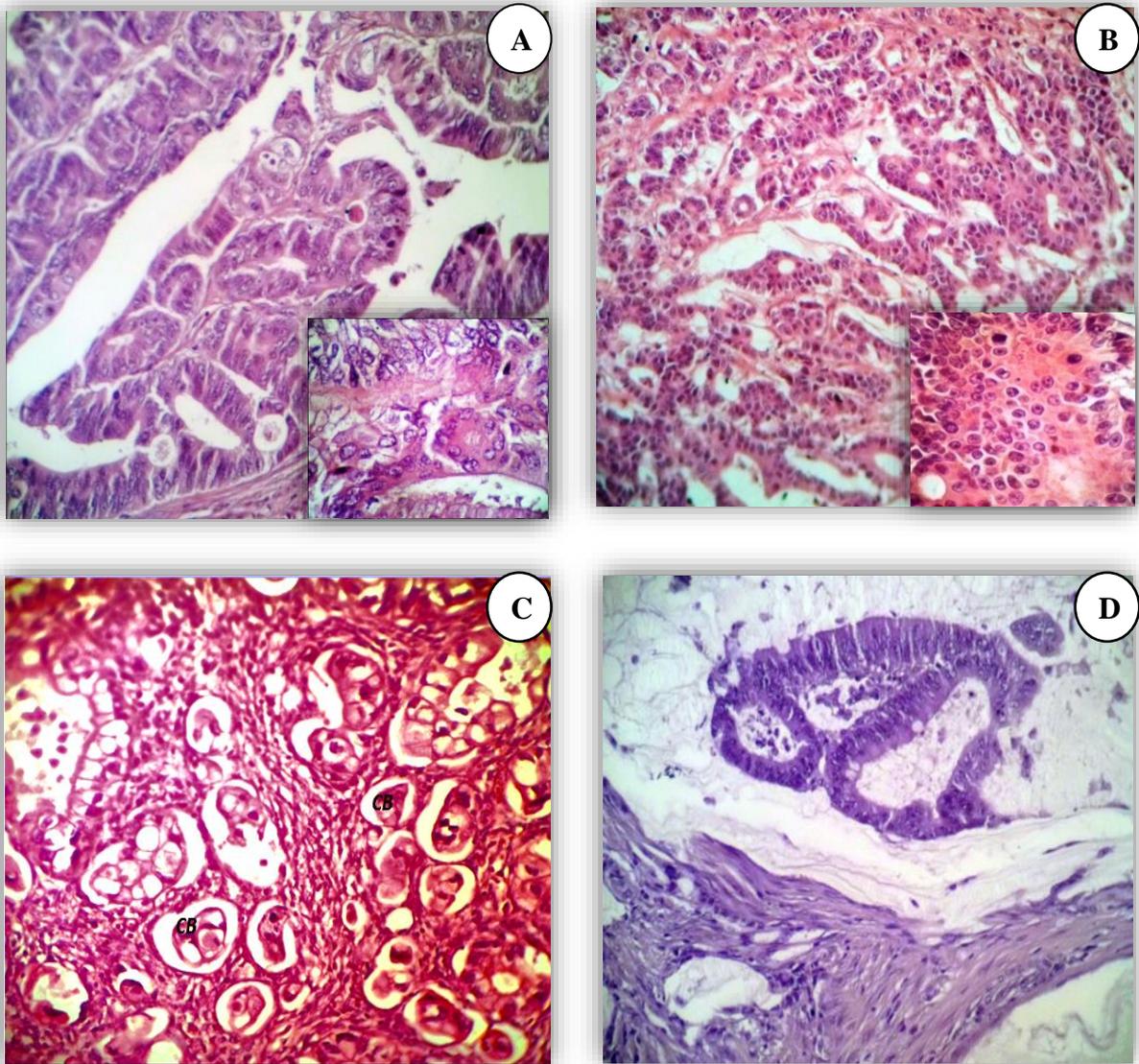
**Figure 23 :** Aspect d'un adénocarcinome bien différencié, coloration HE, G. X 20

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



**Figure 24:** Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié, coloration HE, G. X 20

**AC :** Amas creusés de multiples cavités, **Vs :** vaisseau



**Figure 25 .** Aspect microscopique des différents types histologiques du cancer colorectal après coloration HE (G 10x et 40x). **(A)** : Adénocarcinome bien à moyennement différencié, **(B)** : Adénocarcinome moyennement à peu différencié, **(C)** : Carcinome peu différencié **(D)** : Carcinome Colloïde mucineux.

**CB** : cellule en bague à chaton..

- **Adénocarcinomes bien différenciés.**

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

- **Adénocarcinomes moyennement différenciés.**

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

- **Carcinomes peu différenciés.**

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

### **III.3. Etude immunohistochimique de la P53, EGFR, MLH1 et MSH2**

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

- **III.3.1. Immunodétection de p53**

Dans la détection de la p53 par IHC les cellules tumorales présentent une expression nucléaire plus ou moins hétérogène (**Figure 27**).

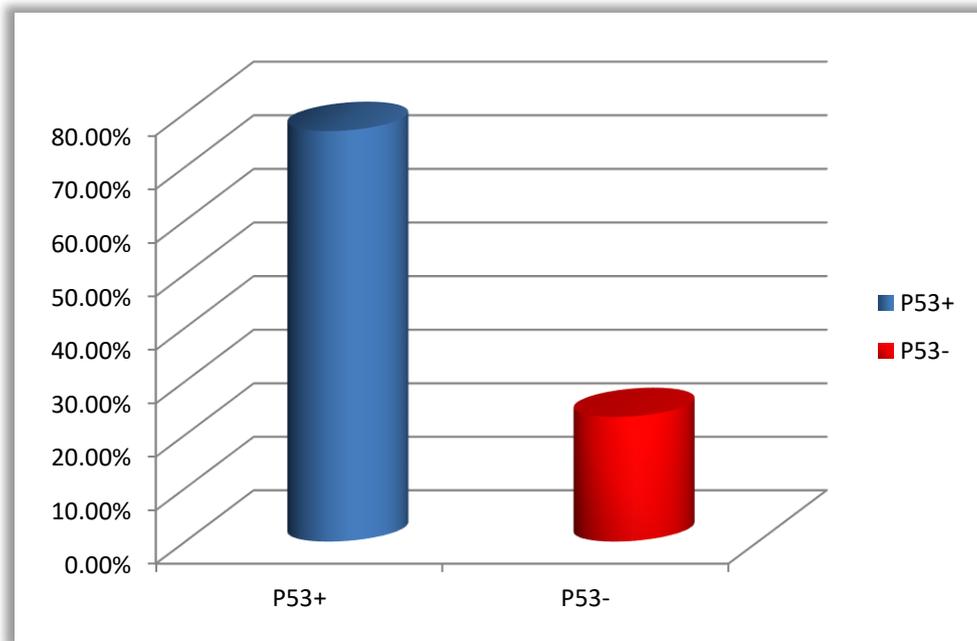
Six scores ont été attribués pour l'expression de la protéine nucléaire p53.

Les scores 2,3,4 et 5 sont considérés positifs par référence à **Gurzu (2007) et Bukhari (2008) [90][91]**.

### Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 1.** Expression de p53 en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage nucléaire par IHC.

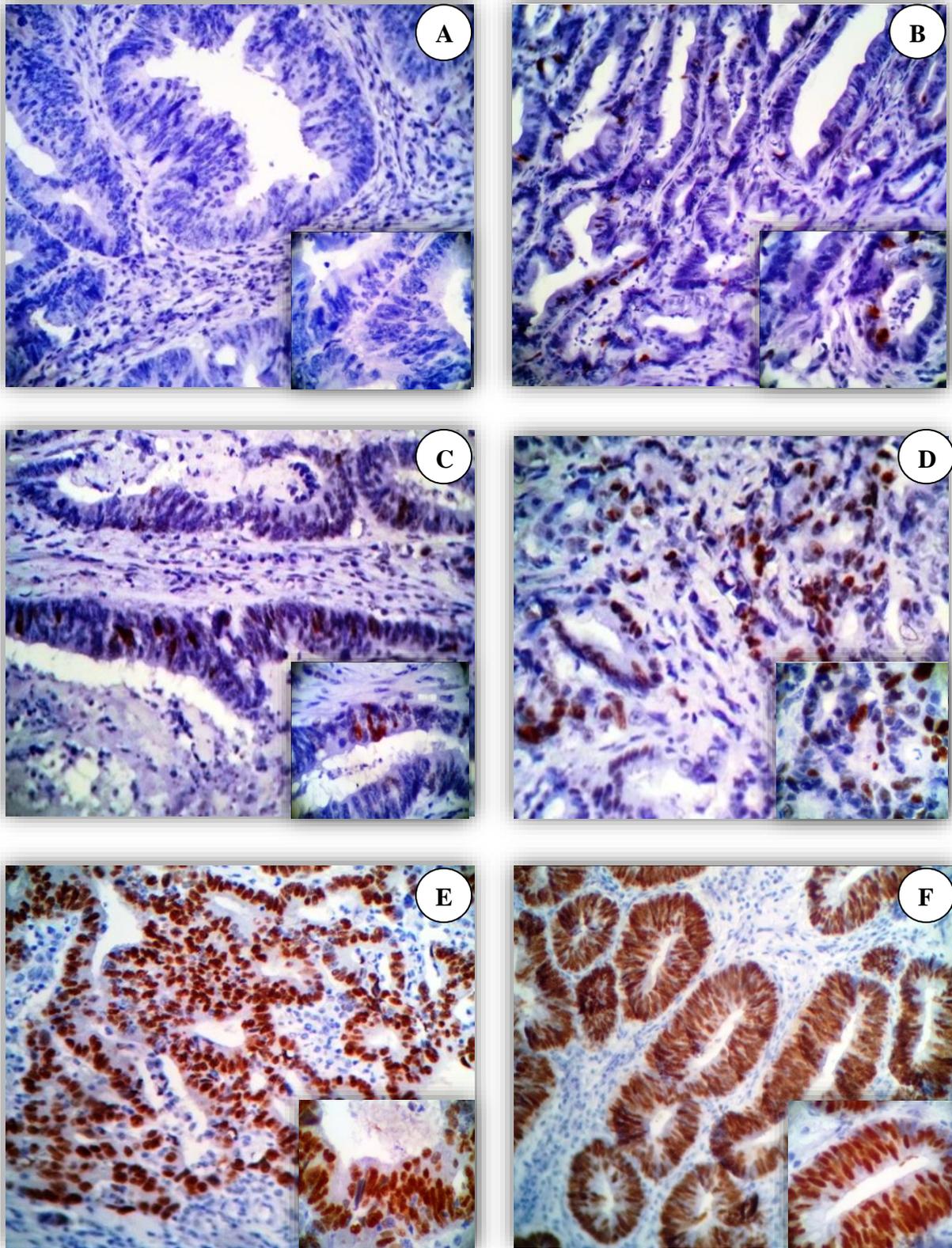
	Expression de p53					
Score	0	1	2	3	4	5
Nombre des cas	11	3	8	6	12	20
proportions	18,33%	5%	13%	10%	20,00%	33,33%



**Figure 26.** Evaluation de l'expression de p53.

L'immunomarquage de la p53 des 60 cas d'adénocarcinomes étudiés nous permet de noter:

- 14 cas négatifs (23,33%) parmi lesquels : 11cas de score 0 (18,33%) et 3 cas de score 1(5%).
- Des cas positifs (76,67%) parmi les quels : 8 cas de score 2 (13%) ,6 cas de score 3 (10%) et 12 cas de score 4 (20%) et 20 de score 5 (33,33%).



**Figure 27.** Profil IHC de l'expression nucléaire de p53. G 20x et G 40x.

(A) : Score 0 (B) : Score 1, (C) : Score 2, (D) : Score 3, (E) Score 4, (F) Score 5.

### Figure 27 :

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

B) **Score 1** : un marquage nucléaire de la p53 compris entre 6 et 10 %, avec une coloration fine.

C) **Score 2** : un marquage nucléaire de la p53 compris entre 11 et 30 %, avec une coloration foncée.

D) **Score 3** : un marquage nucléaire de la p53 compris entre 30 et 50 %, avec une coloration hétérogène.

E) **Score 4** : de 31 à 50 %, des cellules montrent une immunoactivité pour la p53, coloration homogène.

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

#### • III.3.2.Immunodétection d'EGFR

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

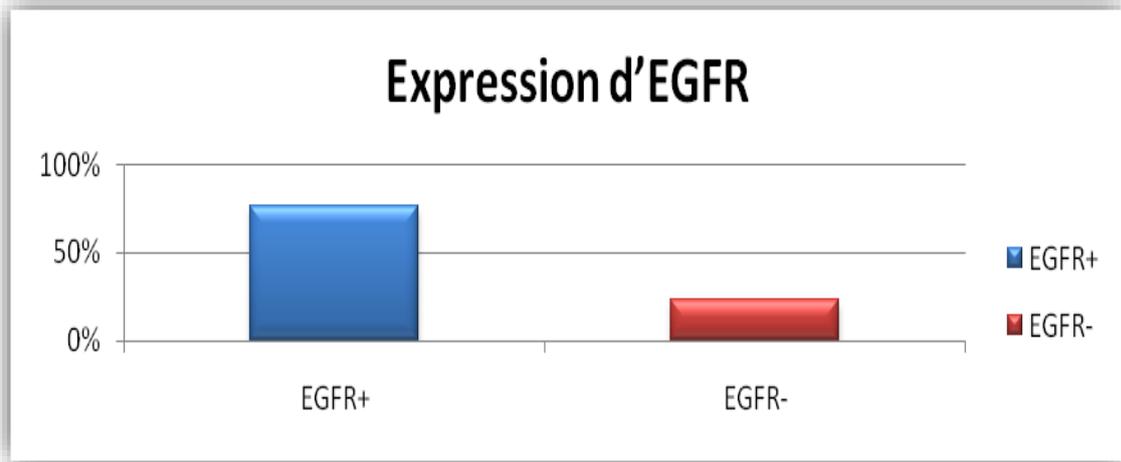
**Actuellement**, un immunomarquage est considéré comme positif lorsque l'on observe un marquage membranaire complet ou incomplet. L'intensité est cotée de 0 à 3+ [92].

#### Les scores d'EGFR d'un adénocarcinome colorectal :

- intensité 1+, marquage membranaire incomplet, intensité faible ;
- intensité 2+, marquage membranaire incomplet, intensité moyenne ;
- intensité 3+, marquage membranaire complet, intensité forte.

**Tableau 2.** Expression d'EGFR en fonction des scores au niveau des adénocarcinomes colorectaux selon l'intensité du marquage membranaire par IHC.

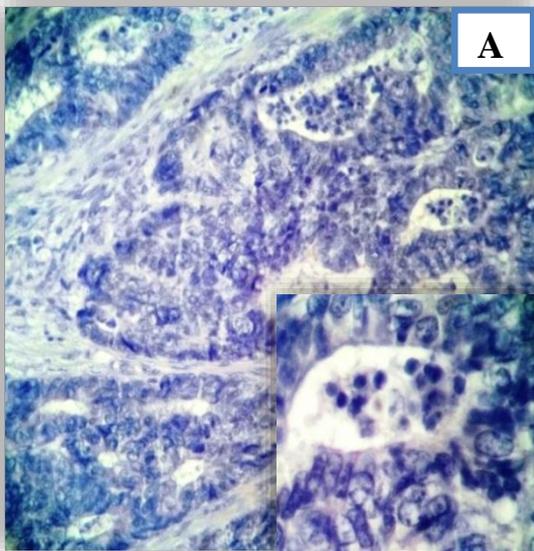
Score	Expression d'EGFR			
	0	1	2	3
Nombre des cas	7	16	3	4
Proportions	23,33%	53,33%	10%	13,33%



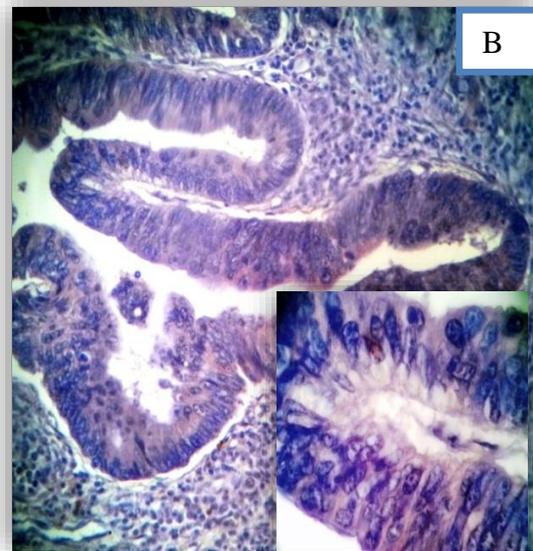
**Figure 28.** Evaluation de l'expression d'EGFR.

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

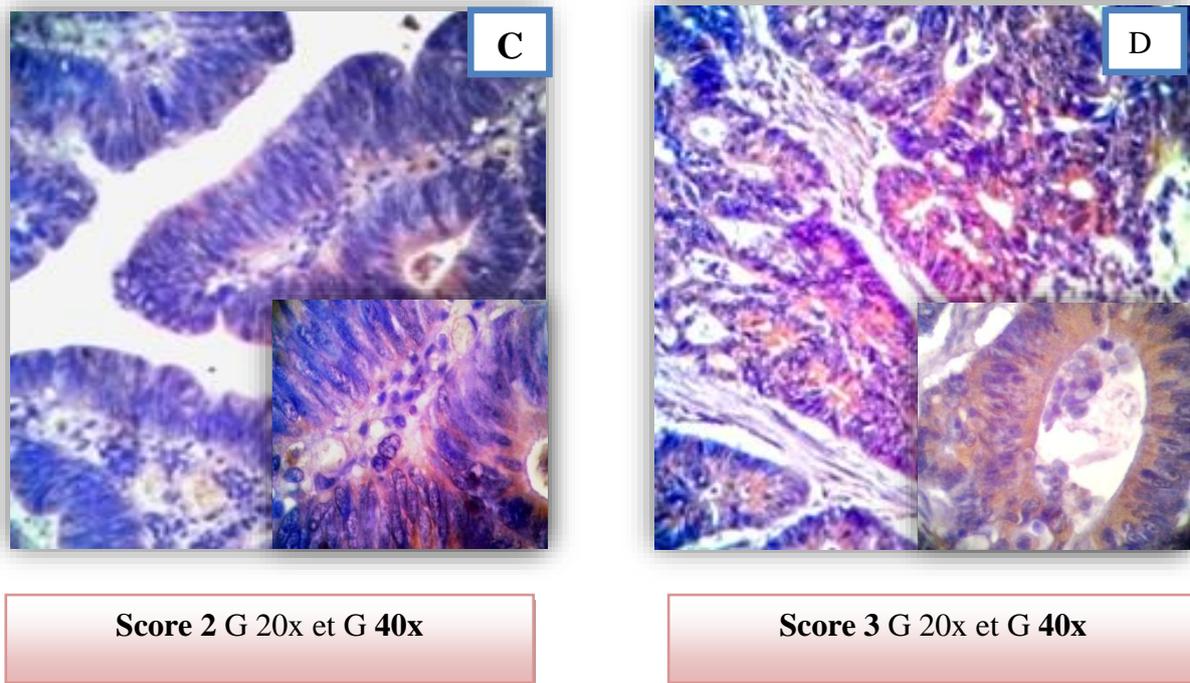
- score 0 : n=7 (23,33 %) ;
- score 1: n=16 (53,33 %) ;
- score 2: n=3 (10 %) ;
- score 3: n=4 (13,33 %).



**Score 0** G 20x et G 40x



**Score 1** G 20x et G 40x



**Figure 29.** Profil IHC de l'expression membranaire d'EGFR. G 20x et G 40x.

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

**Figure 29 :**

**A) Score 0 :** absence de marquage membranaire, l'expression d'EGFR est nulle.

**B) Score 1 :** intensité faible du marquage membranaire, un nombre très restreint de cellules présente une coloration de couleur brune au niveau membranaire.

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

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

• **III.3.3.Immunodétection de MLH1**

L'immunohistochimie permet d'étudier sur coupes en paraffine l'expression tissulaire des protéines du système MMR. Dans notre série nous avons pu étudier l'expression nucléaire ou l'extinction nucléaire de la protéine MLH1 au niveau des cellules tumorales.

L'immunomarquage de MLH1 des 51 cas d'adénocarcinomes étudiés a révélé :

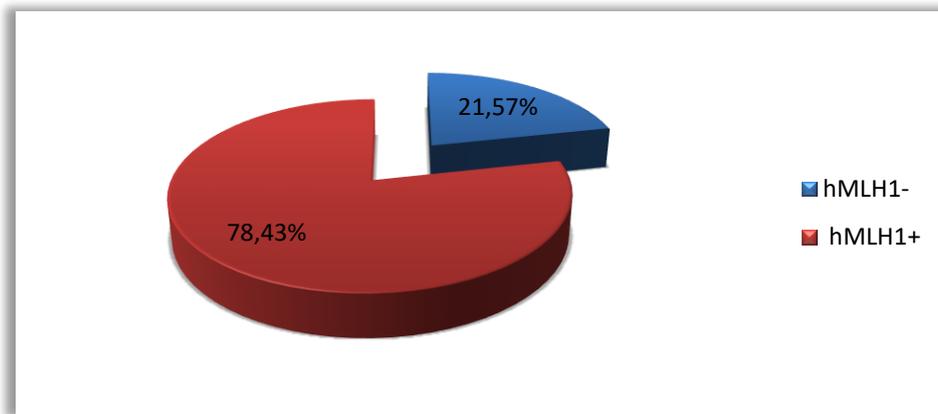
-Des cas positifs : n=40 cas.

-Des cas négatifs avec l'extinction de MLH1 : n=11 cas.

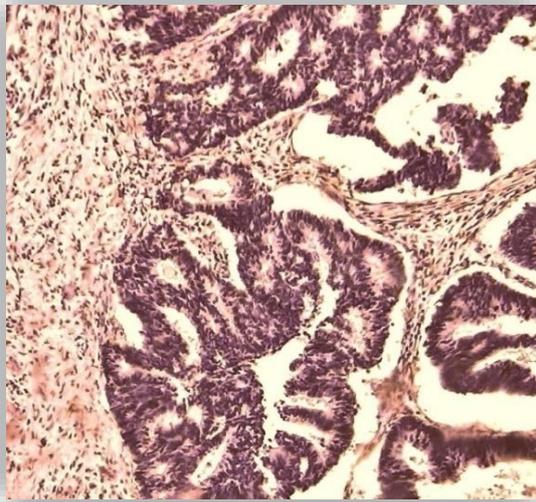
### Chapitre III : Résultats et discussion

**Tableau 3.** Expression de MLH1 au niveau des adénocarcinomes colorectaux.

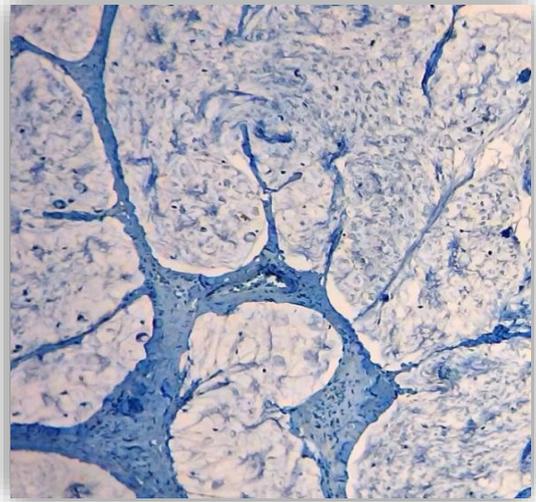
Score	Expression de MLH1	
	Positive	Négative
nombre des cas	40	11
Proportions	78,43%	21,57%



**Figure 30.** Evaluation de l'expression de la protéine MLH1.



**Figure 31.** MLH1 positive G 20x.



**Figure 32.** MLH1 positive G 20x.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### • III.3.4.Immunodétection de MSH2

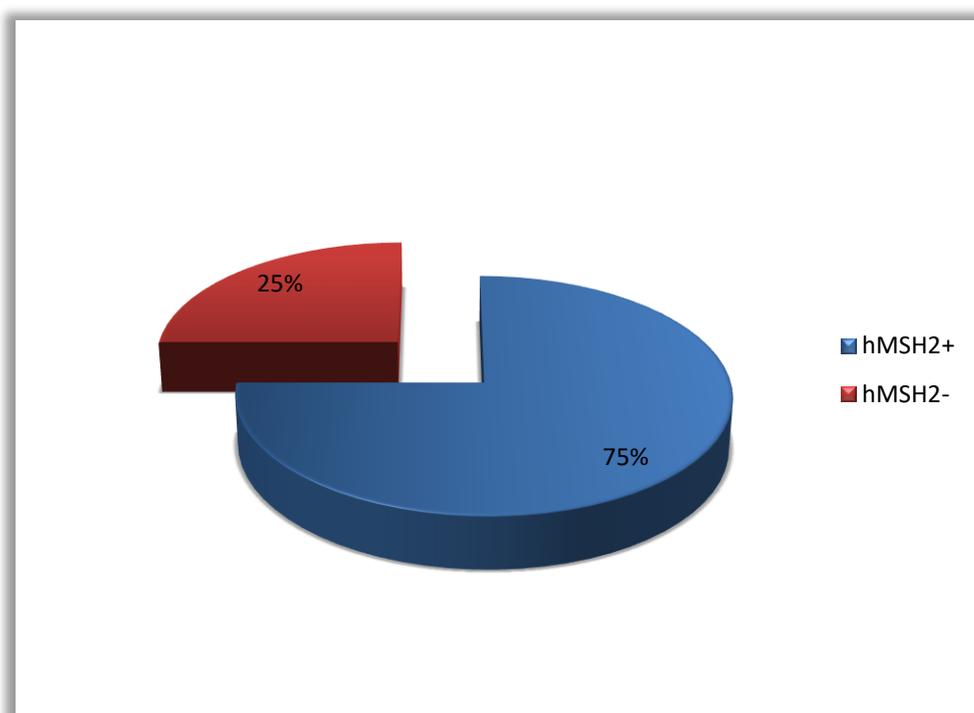
L'immunomarquage de MSH2 des 52 cas d'adénocarcinomes étudiés a indiqué :

-des cas positifs : n= 39 cas.

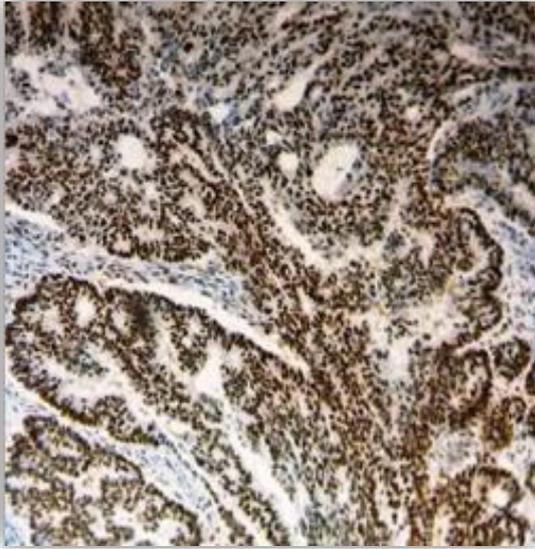
-des cas négatifs avec l'extinction de MLH1 : n=13 cas.

**Tableau 4.** Expression de la protéine MSH2 au niveau des adénocarcinomes colorectaux.

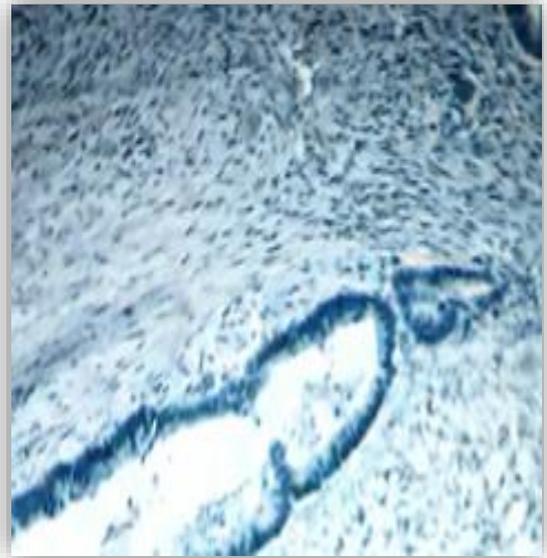
Score	Expression de MSH2	
	Positive	Négative
nombre des cas	39	13
Proportions	75%	25%



**Figure 33.** Evaluation de l'expression de la protéine MSH2.



**Figure 34. MSH2 positive G 20x.**

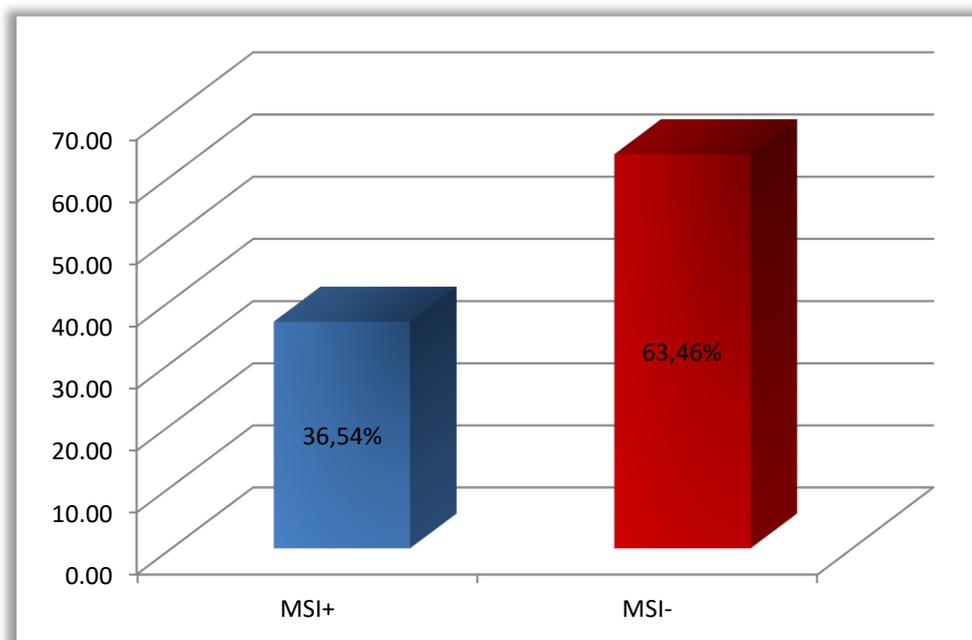


**Figure35. MSH2 négative G 20x.**

- **Le statut MSI probable**

-La perte d'extinction d'une protéine MMR est présentée dans 19 cas (36,96%) répartie dans ce **tableau 5**.

<b>MSI+</b>	<b>N°=19</b>
<b>MLH1+MSH2-</b>	8
<b>MLH1-MSH2+</b>	6
<b>MLH1-MSH2-</b>	5



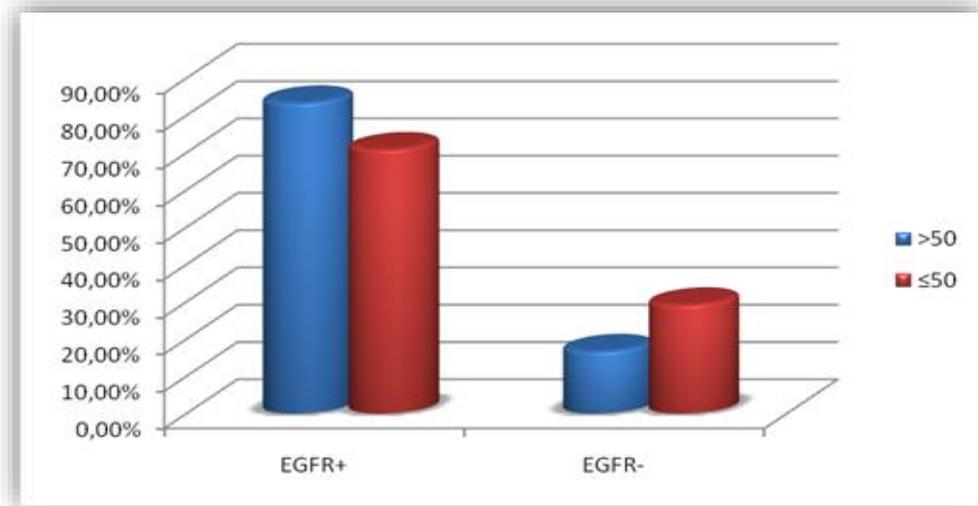
**Figure 36** .Evaluation du statut MSI.

### III.4. Etude des corrélations entre l'expression EGFR avec les différents paramètres clinicopathologiques

#### III.4.1. Corrélation entre l'âge et l'expression d'EGFR

**Tableau 6.** Répartition de l'expression d'EGFR en fonction de l'âge.

Tranche d'âge		EGFR	
		Positive	Négative
> 50 ans	Effectifs	5	1
n =6	%	83 ,33	16,67
≤50 ans	Effectifs	17	7
n= 24	%	70,83	29,17
X <sup>2</sup>		0,383	
d.d.l		1	
P-value		0,535	
Significativité		Non significative	



**Figure 37.** Expression d'EGFR en fonction de l'âge.

Quel que soit la tranche d'âge considérée ( $\leq 50$  ou  $> 50$ ) l'expression de p53 et EGFR peut être positive ou négative.

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

- la surexpression d'EGFR est observée dans 5 cas (83,33 %),
- l'absence de la surexpression d'EGFR est retrouvée dans 16,67 % (n=1).

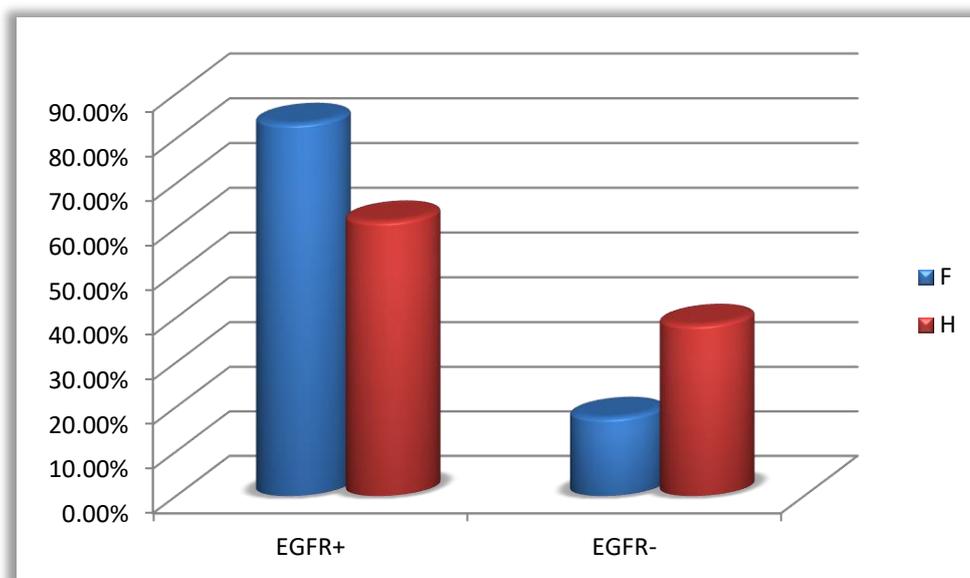
➤ **Chez les patients d'âge ≤50 (24 cas) :**

- l'expression d'EGFR est observée dans 17 cas (70,83%), et 7 cas négatifs (29,17%),
- il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de l'EGFR avec l'âge,  $p > \alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ).

**III.4.2. Corrélacion entre le sexe et l'expression d'EGFR**

**Tableau 7.** Répartition de l'expression d'EGFR en fonction du sexe.

Sexe		EGFR	
		Positive	Négative
<b>F</b> n= 17	<b>Effectifs</b>	14	3
	<b>%</b>	82,36	17,64
<b>H</b> n= 13	<b>Effectifs</b>	8	5
	<b>%</b>	61,54	38,46
<b>X<sup>2</sup></b>		1,632	
<b>d.d.l</b>		1	
<b>P-value</b>		0,201	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 38.** Expression d'EGFR en fonction du sexe.

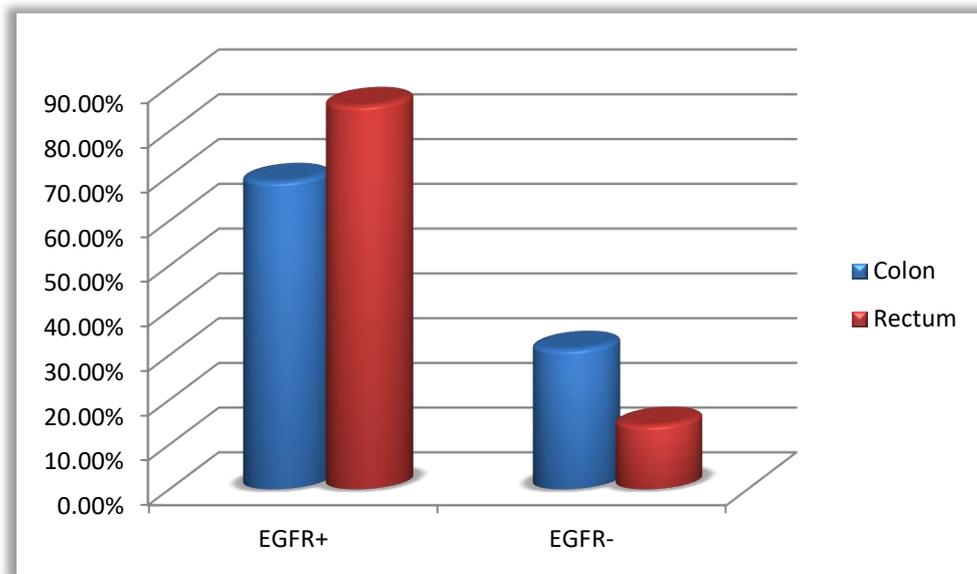
Sur nos 30 patients nous notons que :

- l'expression d'EGFR est retrouvée dans 14 cas chez les femmes (82,36%) et 8 cas chez les hommes (61,54%), Tandis que 3cas sont négatifs chez les femmes (17,64%) et 5 cas chez les hommes (38,46%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de l'EGFR et le sexe.

### III.4.3 Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression d'EGFR

**Tableau 8** .Répartition de l'expression d'EGFR en fonction de la localisation tumorale.

Localisation tumorale		EGFR	
		Positive	Négative
colon	Effectifs	11	5
n= 16	%	68,75	31,25
Rectum	Effectifs	12	2
n= 14	%	85,71	14,29
X <sup>2</sup>		1,201	
d.d.l		1	
P-value		0,273	
Significativité		Non significative	



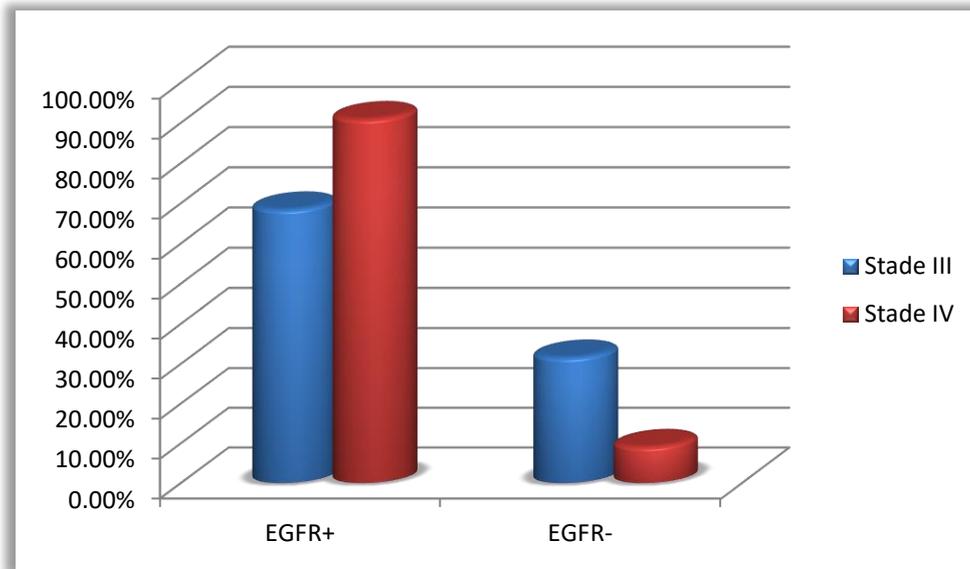
**Figure 39.** Expression d'EGFR en fonction de la localisation tumorale.

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

#### III.4.4. Corrélation entre le stade pTNM/ AJCC et l'expression d'EGFR

**Tableau 9.** Répartition de l'expression d'EGFR en fonction de stade pTNM/ AJCC.

Stade pTNM/ UICC		EGFR	
		Positive	Négative
<b>Stade III</b>	<b>Effectifs</b>	13	6
<b>n =19</b>	<b>%</b>	68,42	31,58
<b>Stade IV</b>	<b>Effectifs</b>	10	1
<b>n =11</b>	<b>%</b>	90,91	9,09
<b>X<sup>2</sup></b>		1,201	
<b>d.d.l</b>		1	
<b>P-value</b>		0,273	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 40.** Expression d’EGFR en fonction du stade pTNM.

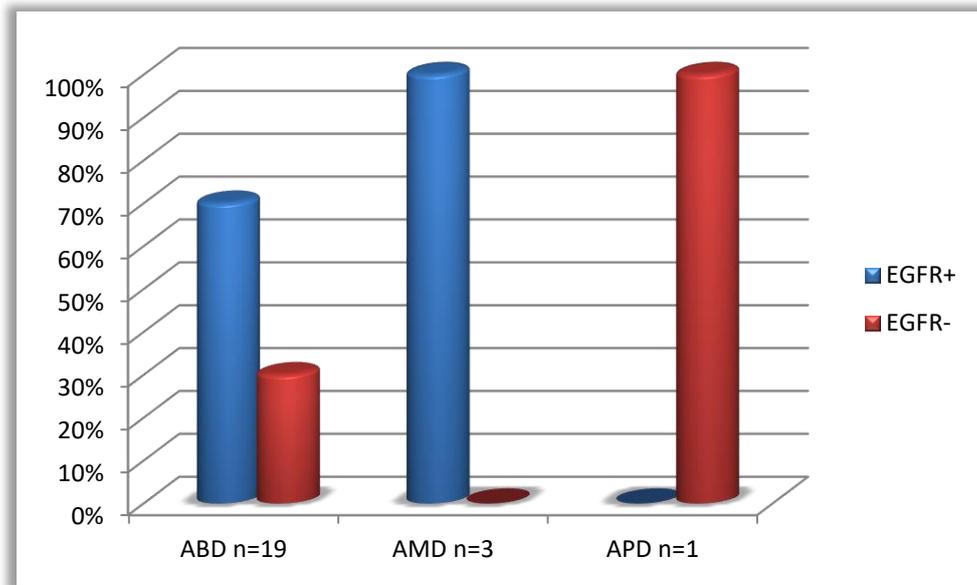
Notre série comprend les 2 stades III et IV, stades évolués de la maladie, nous notons que :

- la surexpression d’EGFR est observée chez 68,42% (13cas) dans le stade III, et 90,91% (10cas) dans le stade IV ;
- il n’existe pas de corrélation statistique significative entre l’expression d’EGFR avec le stade pTNM.

#### III.4.5 Corrélation entre le grade de différenciation et l’expression d’EGFR

**Tableau 10.** Répartition de l’expression d’EGFR en fonction du grade de différenciation.

Grade de différenciation		EGFR	
		Positive	Négative
<b>ABD</b>	<b>Effectifs</b>	19	6
<b>N= 26</b>	<b>%</b>	70	30
<b>AMD</b>	<b>Effectifs</b>	3	0
<b>N=3</b>	<b>%</b>	100	0
<b>APD</b>	<b>Effectifs</b>	0	1
<b>N=1</b>	<b>%</b>	0	100
<b>X<sup>2</sup></b>		0,923	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,63	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 41.** Expression d'EGFR en fonction du grade de différenciation.

Sur nos 30 patients nous notons que :

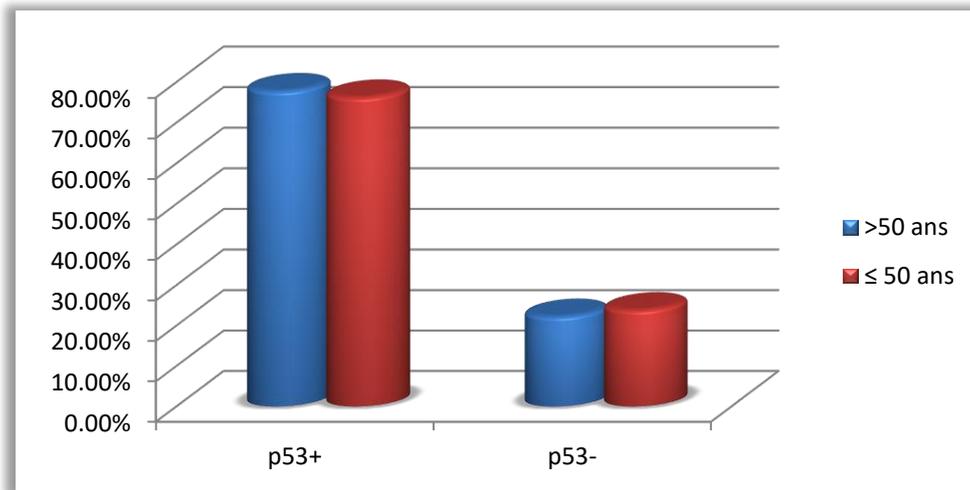
- la surexpression d'EGFR est représentée chez 70% (19 cas) dans les adénocarcinomes bien différenciés, 100% (3cas) dans les adénocarcinomes moyennement différenciés, et absente dans les adénocarcinomes peu différenciés ;
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression d'EGFR avec le grade de différenciation.

### III.5. Etude des corrélations entre l'expression de p53 avec les différents paramètres clinicopathologiques

#### III.5.1. Corrélation entre l'âge et l'expression de p53

**Tableau 11.**Répartition de l'expression de p53 en fonction de l'âge.

Tranche d'âge		p53	
		Positive	Négative
>50 ans	Effectifs	14	4
N=18	%	77,78	22,22
≤ 50 ans	Effectifs	32	10
N=42	%	76,19	23,81
X <sup>2</sup>		0,0177	
d.d.l		1	
P-value		0,894	
Significativité		Non significative	



**Figure 42.** Expression de p53 en fonction de l'âge.

Quelque soit la tranche d'âge considérée ( $\leq 50$  ou  $> 50$ ) l'expression de p53 peut être positive ou négative chez les 60 cas.

➤ **Chez les patients d'âge >50ans (18 cas)**

- La surexpression de p53 est observée dans 14 cas (77,78%),
- L'absence de la surexpression de p53 est retrouvée dans 22,22% (n=4).

➤ **Chez les patients d'âge ≤50 (42 cas)**

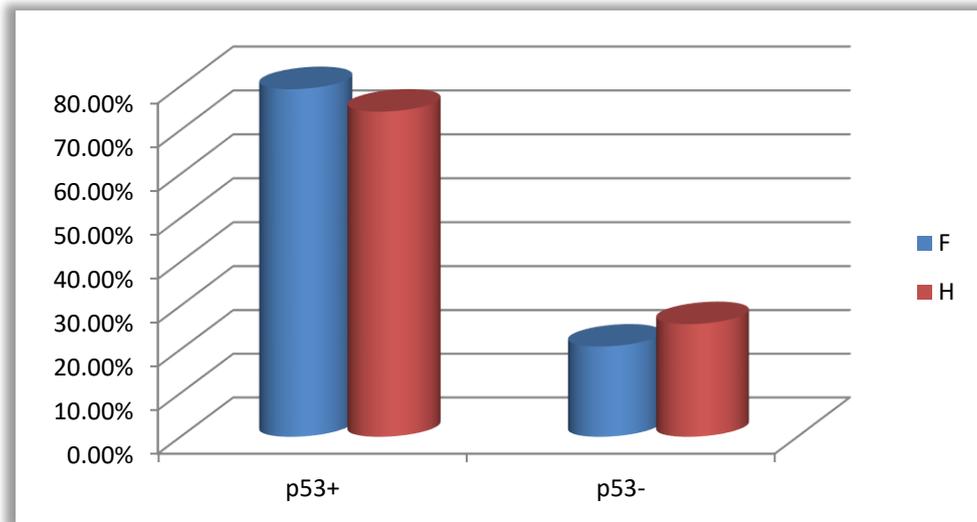
- L'expression de p53 est observée dans 32 cas (76,19%), et 10 cas négatifs (23,81%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 avec l'âge,  $p > \alpha$  ( $\alpha = 0,05$ ).

### III.5.2 Corrélation entre le sexe et l'expression de p53

**Tableau 12.** Répartition de l'expression de p53 en fonction du sexe.

Sexe		p53	
		Positive	Négative
<b>F</b>	<b>Effectifs</b>	23	6
<b>N=29</b>	<b>%</b>	79,31	20,69
<b>H</b>	<b>Effectifs</b>	23	8
<b>N=31</b>	<b>%</b>	74,19	25,81
<b>X<sup>2</sup></b>		0,2193	
<b>d.d.l</b>		1	
<b>P-value</b>		0,6396	
<b>Significativité</b>		Non significative	

### Chapitre III : Résultats et discussion



**Figure 43.** Expression de p53 en fonction du sexe.

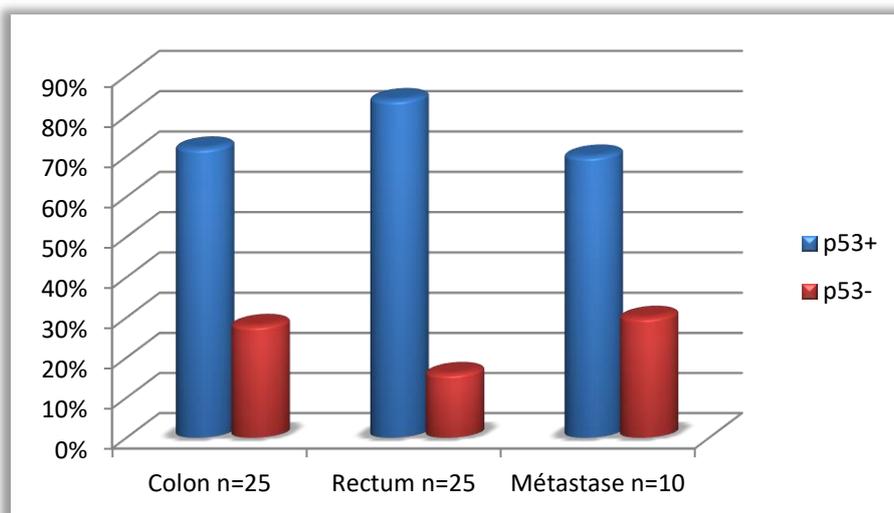
Sur nos 60 patients nous notons que :

- l'expression de p53 est retrouvée dans 23 cas chez les femmes (79,31%) et 23 cas chez les hommes (61,54%), Tandis que 6 cas sont négatifs chez les femmes (20,69%) et 8 cas chez les hommes (25,81%) ;
- il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 et le sexe.

#### III.5.3. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de p53

**Tableau 13.** Répartition de l'expression de p53 en fonction de la localisation tumorale.

La localisation tumorale		p53	
		Positive	Négative
<b>colon</b>	<b>Effectifs</b>	18	7
<b>n= 25</b>	<b>%</b>	72	28
<b>Rectum</b>	<b>Effectifs</b>	21	4
<b>n= 25</b>	<b>%</b>	84	16
<b>Métastase</b>	<b>Effectifs</b>	7	3
<b>n=10</b>	<b>%</b>	70	30
<b>X<sup>2</sup></b>		1,3043	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,5209	
<b>Significativité</b>		Non significative	



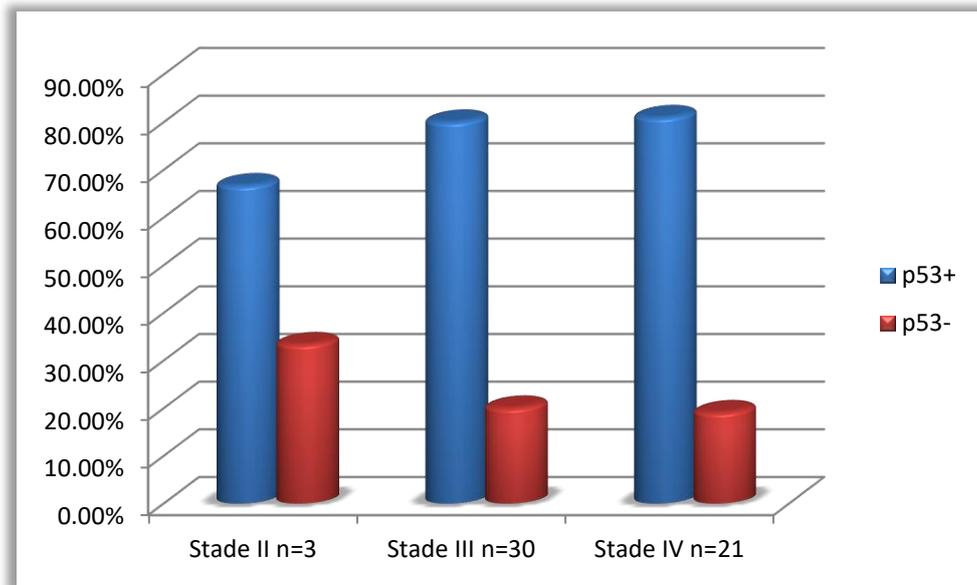
**Figure 44.** Expression de p53 en fonction de la localisation tumorale.

- Chez les 25 patients atteints du cancer du colon : la surexpression de p53 est observée dans 18 cas (72%), alors 7 cas (28%) sont négatifs.
- Chez les 25 patients atteints du cancer du rectum : la surexpression p53 est observée dans 21 cas (84%) et 4 cas (16%) sont négatifs.
- Dans les 10 de métastase : p53 est surexprimée dans 7 cas (70%), tandis que 3 cas sont négatifs (30%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de p53 avec la localisation tumorale.

### III.5.4. Corrélation entre le stade et l'expression de p53

**Tableau 14.** Répartition de l'expression de p53 en fonction du stade pTNM/ UICC.

Stade pTNM/ UICC		p53	
		Positive	Négative
<b>Stade II</b>	<b>Effectifs</b>	2	1
<b>n=3</b>	<b>%</b>	66,67	33,33
<b>Stade III</b>	<b>Effectifs</b>	24	6
<b>n=30</b>	<b>%</b>	80	20
<b>Stade IV</b>	<b>Effectifs</b>	17	4
<b>n=21</b>	<b>%</b>	80,95	19,05
<b>X<sup>2</sup></b>		0,336	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,8454	
<b>Significativité</b>		Non significative	



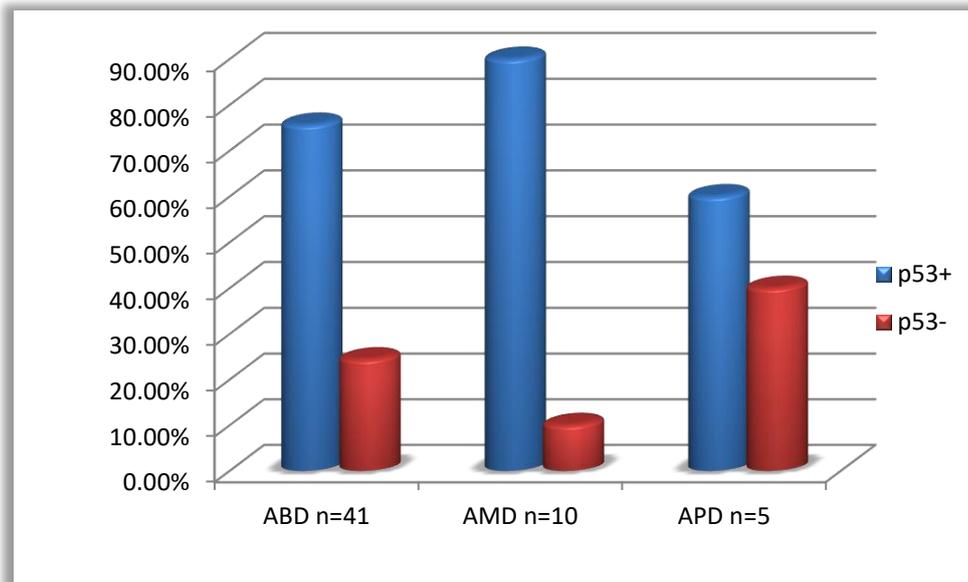
**Figure 45.** Expression de p53 en fonction du stade.

- L'analyse univariée de p53 et le stade pTNM montre qu'il n'y a pas une corrélation significative ( $p=0,8454$ ).
- La surexpression de p53 est répartie dans 66,67% (2cas), 80% (24cas), 80,95% (17cas) du stade II, du stade III et du stade IV respectivement.

### III.5.5. Corrélation entre le grade de différenciation et l'expression de p53

**Tableau 15.** Répartition de l'expression de p53 en fonction du grade de différenciation.

Grade de différenciation		p53	
		Positive	Négative
<b>ABD</b>	<b>Effectifs</b>	31	10
<b>N= 41</b>	<b>%</b>	75,61	24,39
<b>AMD</b>	<b>Effectifs</b>	9	1
<b>N=10</b>	<b>%</b>	90	10
<b>APD</b>	<b>Effectifs</b>	3	2
<b>N=5</b>	<b>%</b>	60	40
<b>X<sup>2</sup></b>		1,8018	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,4062	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 46.** Expression de p53 en fonction du grade.

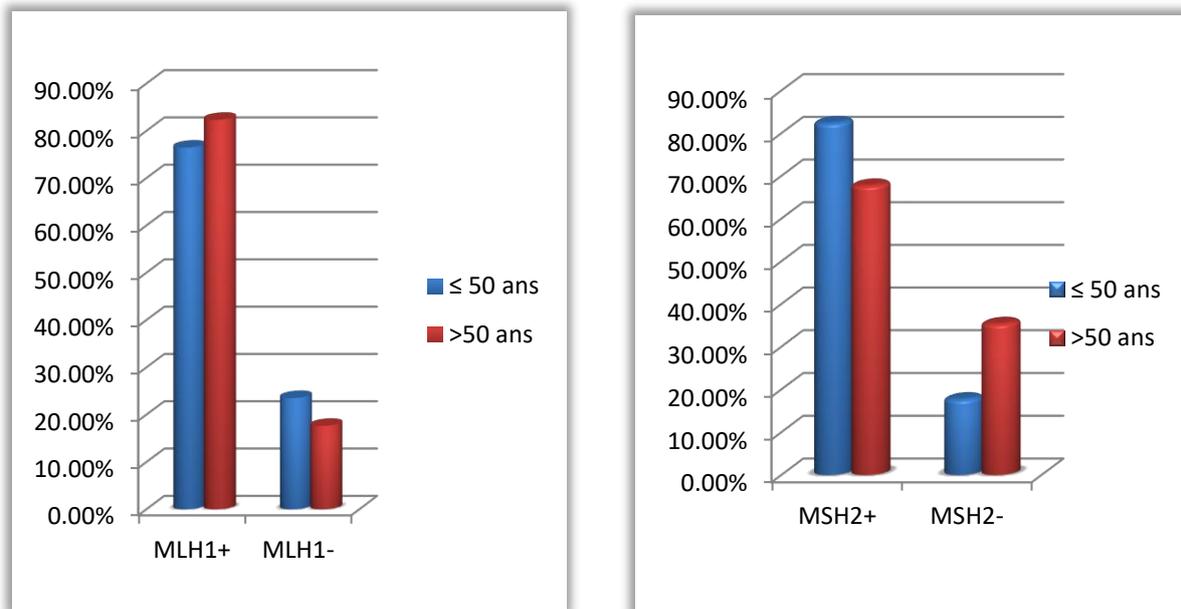
- Les tumeurs moyennement différenciées ont plus de surexpression de p53 que les tumeurs bien différenciées : 90 versus 75,61%, alors que la surexpression de p53 est moins fréquente chez les tumeurs peu différenciées 60%.
- L'analyse univariée montre qu'il n'y a pas une corrélation significative entre p53 et le grade.

## II.6. Etude des corrélations entre l'expression de MLH1 et de MSH2 avec les différents paramètres clinicopathologiques

### III.6.1. Corrélation entre l'âge et l'expression de MLH1 et de MSH2

**Tableau 16.** Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction de l'âge.

Tranche d'âge		MLH1		Tranche d'âge		MSH2	
		Positive	Négative			Positive	Négative
≤ 50 ans	Effectifs	26	8	≤ 50 ans	Effectifs	28	6
N=34	%	76,47	23,53	N=35	%	82,35	17,65
>50 ans	Effectifs	14	3	>50 ans	Effectifs	11	6
N=17	%	82,35	17,65	N=17	%	64,71	35,29
X <sup>2</sup>		0,231		X <sup>2</sup>		1,9615	
d.d.l		1		d.d.l		1	
P-value		0,630		P-value		0,1613	
Significativité		Non significative		Significativité		Non significative	



**Figure 47.** Expression de MLH1 et MSH2 en fonction de l'âge.

Quelque soit la tranche d'âge considérée ( $\leq 50$  ou  $> 50$ ) l'expression de MLH1 et MSH2 peuvent être positives ou négatives chez les patients.

➤ **Chez les patients d'âge  $\leq 50$  ans**

- L'expression de MLH1 et de MSH2 est observée dans 76,47% (26cas), 82,35% (28cas) respectivement.
- L'extinction de MLH1 et de MSH2 est observée dans 23,53% (8 cas), 17,65% (6cas) respectivement.

➤ **Chez les patients d'âge  $> 50$**

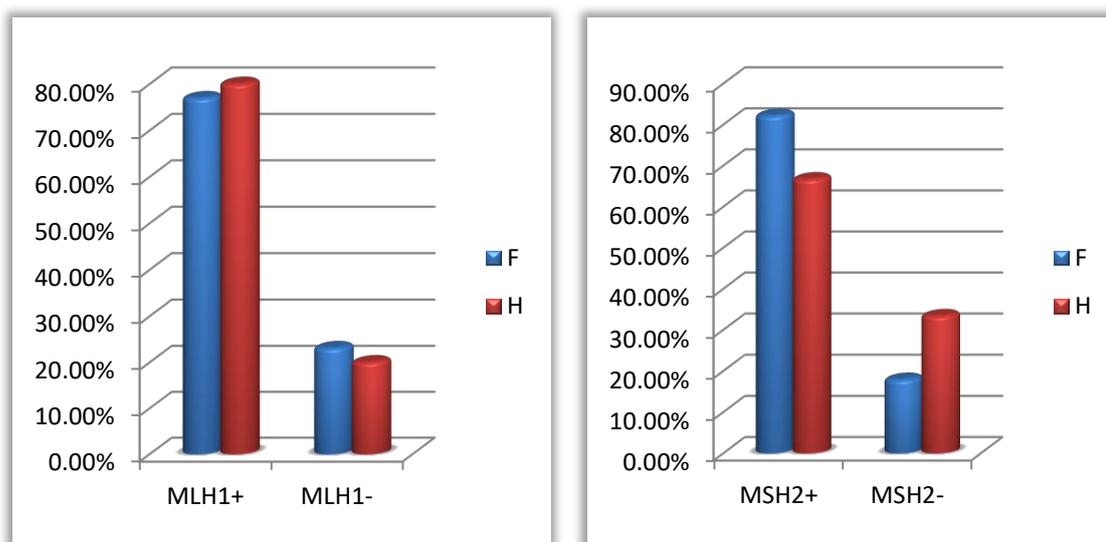
- L'expression de MLH1 et MSH2 est observée dans 82,35% (14cas), 64,71% (11cas) respectivement.
- L'extinction de MLH1 et MSH2 est observée dans 17,65% (3cas), 35,29% (6cas) respectivement.
- L'analyse univariée montre qu'il n'y a pas une corrélation statistique significative entre MLH1 et MSH2 et l'âge.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III.6.2. Corrélation entre le sexe et l'expression de MLH1 et MSH2

**Tableau 17.** Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du sexe.

Sexe		MLH1		Sexe		MSH2	
		Positive	Négative			Positive	Négative
<b>F</b>	<b>Effectifs</b>	20	6	<b>F</b>	<b>Effectifs</b>	23	5
<b>N=26</b>	<b>%</b>	76,92	23,08	<b>N=28</b>	<b>%</b>	82,14	17,86
<b>H</b>	<b>Effectifs</b>	20	5	<b>H</b>	<b>Effectifs</b>	16	8
<b>N=25</b>	<b>%</b>	80	20	<b>N=24</b>	<b>%</b>	66,67	33,33
<b>X<sup>2</sup></b>		0,071		<b>X<sup>2</sup></b>		1,6508	
<b>d.d.l</b>		1		<b>d.d.l</b>		1	
<b>P-value</b>		0,789		<b>P-value</b>		0,1989	
<b>Significativité</b>		Non significative		<b>Significativité</b>		Non significativite	



**Figure 48** .Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du sexe.

Chez les patients de notre série nous observons que :

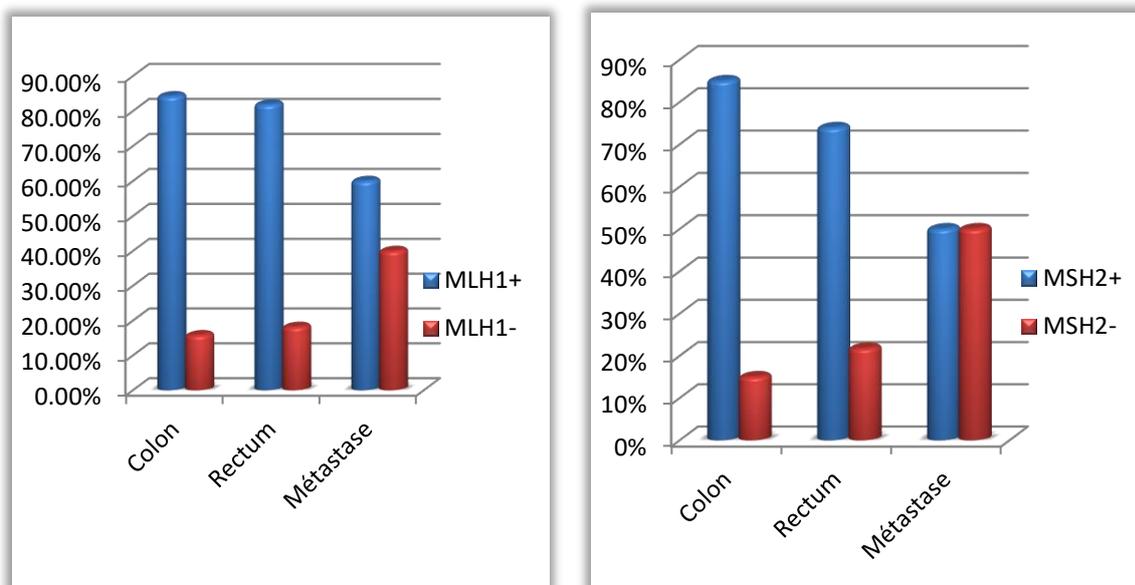
- L'expression de MLH1 et de MSH2 est retrouvée dans 20 (76,92%) et 23 (76,92%) cas respectivement chez les femmes et 20 (80%) et 16 (66,67%) cas respectivement chez les hommes (61,54%), Tandis que l'extinction de MLH1 et de MSH2 est retrouvée dans 6 et 5 cas respectivement chez les femmes, et 5 et 8 cas respectivement chez les hommes.
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de MLH1 et de MSH2 et le sexe.

### Chapitre III : Résultats et discussion

#### III.6.3. Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de MLH1 et de MSH2

**Tableau 18.** Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction de la localisation tumorale.

La localisation tumorale		MLH1		La localisation tumorale		MSH2	
		Positive	Négative			Positive	Négative
colon	Effectifs	16	3	colon	Effectifs	17	3
n= 19	%	84,21	15,79	n= 20	%	85	15
Rectum	Effectifs	18	4	Rectum	Effectifs	17	5
n= 22	%	81,82	18,18	n= 22	%	73,91	21,74
Métastase	Effectifs	6	4	Métastase	Effectifs	5	5
n=10	%	60	40	n=10	%	50	50
X <sup>2</sup>		2,532		X <sup>2</sup>		4,4606	
d.d.l		2		d.d.l		2	
P-value		0,281		P-value		0,1075	
Significativité		Non significative		Significativité		Non significative	



**Figure 49.** Expression de MLH1 et MSH2 en fonction de la localisation tumorale.

- Chez les 20 patients atteints du cancer du colon : l'expression de MLH1 et de MSH2 est observée dans 16 et 17 cas respectivement, alors que l'extinction de MLH1 et de hMSH2 est retrouvée chez 3 cas pour les deux marqueurs.
- Chez les 22 patients atteints du cancer du rectum : l'expression de hMLH1 et hMSH2 est observée dans 18 et 17 cas respectivement, tandis que 4 et 5 cas respectivement sont négatifs.

### Chapitre III : Résultats et discussion

- Dans les 10 de métastase : hMLH1 et hMSH2 sont surexprimées dans 6 et 5 cas respectivement, tandis que l'extinction de hMLH1 et de hMSH2 est observée dans 4 et 5 cas respectivement.
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre l'expression de hMLH1 et de hMSH2 avec la localisation tumorale ( $p=0,281/0,1075$ ) mais nous remarquons que l'extinction des deux marqueurs est bien élevée chez les tumeurs métastatiques.

#### III.6.4 Corrélation entre la localisation tumorale et l'expression de MLH1 et de MSH2

Tableau 19. Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du stade.

Stade pTNM/ UICC		MLH1		Stade pTNM/ UICC		MSH2	
		Positive	Négative			Positive	Négative
Stade II	Effectifs	3	0	Stade II	Effectifs	1	2
n=3	%	100	0	n=3	%	33,33	66,67
Stade III	Effectifs	18	4	Stade III	Effectifs	20	4
n=22	%	81,82	18,18	n=24	%	83,33	16,67
Stade IV	Effectifs	15	7	Stade IV	Effectifs	15	5
n=22	%	68,18	31,82	n=20	%	75	25
X <sup>2</sup>		0,6494		X <sup>2</sup>		3,7683	
d.d.l		1		d.d.l		2	
P-value		0,4203		P-value		0,152	
Significativité		Non significative		Significativité		Non significative	

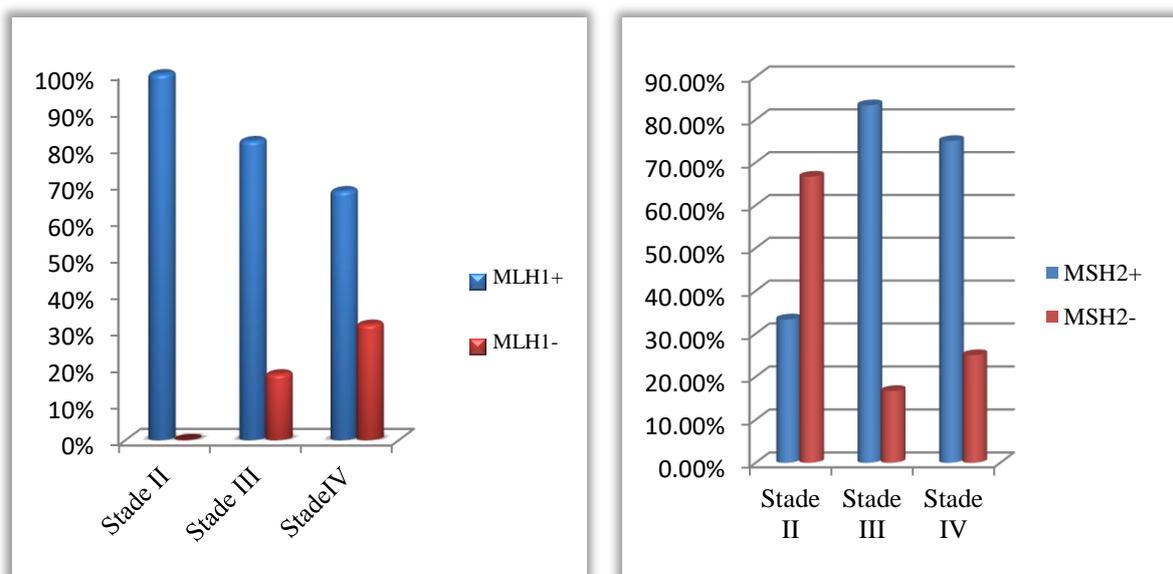


Figure 50. Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du stade.

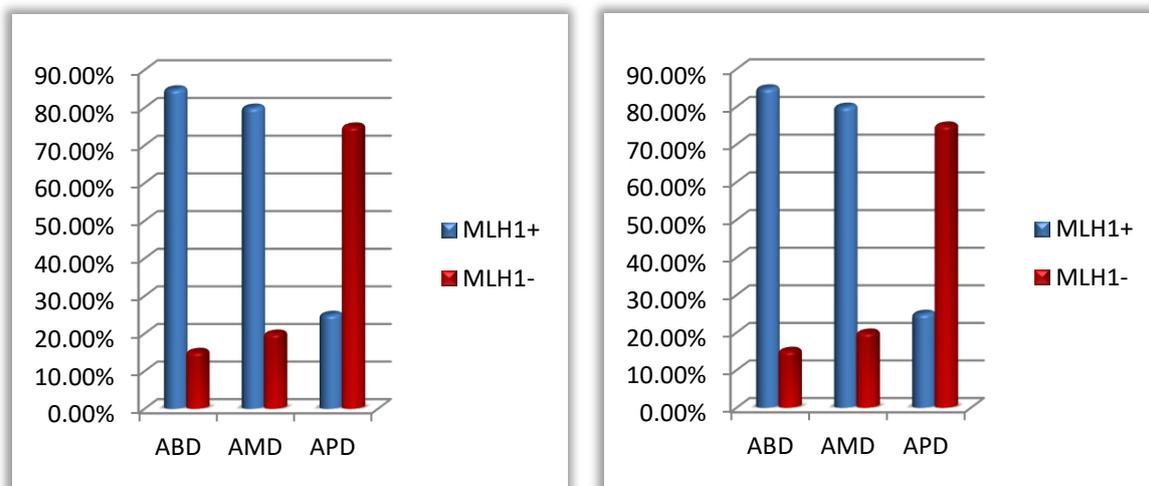
### Chapitre III : Résultats et discussion

- L'analyse univariée de MLH1 et MSH2 et le stade pTNM montre qu'il n'y a pas une corrélation significative ( $p=0,4203$ ) vs ( $p=0,152$ ).
- L'expression de MLH1 est répartie dans 100% (3cas), 81,82% (18 cas), 68,18% (15cas) du stade II, du stade III et du stade IV respectivement.
- L'extinction de MLH1 est répartie dans 18,18% (4cas), 31,82% (7 cas) du stade III et du stade IV respectivement.
- L'expression de MSH2 est répartie dans 33,33% (1cas), 83,33% (20 cas), 75% (15cas) du stade II, du stade III et du stade IV respectivement.
- L'extinction de MSH2 est répartie dans 66,67% (2cas), 16,67% (4 cas) et 25%(5) du stade II, du stade III et du stade IV respectivement.

#### III.6.5. Corrélation entre le grade et l'expression de MLH1 et de MSH2

**Tableau 20.** Répartition de l'expression de MLH1 et MSH2 en fonction du grade.

Grade de différenciation		MLH1		Grade de différenciation		MSH2	
		Positive	Négative			Positive	Négative
ABD	Effectifs	28	5	ABD	Effectifs	28	5
N= 33	%	84,85	15,15	N= 33	%	84,85	15,15
AMD	Effectifs	8	2	AMD	Effectifs	7	3
N=10	%	80	20	N=10	%	70	30
APD	Effectifs	1	3	APD	Effectifs	2	3
N=4	%	25	75	N=5	%	40	60
X <sup>2</sup>		7,6414		X <sup>2</sup>		5,3028	
d.d.l		2		d.d.l		2	
P-value		0,0219		P-value		0,0706	
Significativité		Significative		Significativité		Non significative	



**Figure 51.** Expression de MLH1 et MSH2 en fonction du grade.

## Chapitre III : Résultats et discussion

- Les tumeurs bien différenciées ont plus d'expression de MLH1 et de MSH2 que les tumeurs moyennement différenciées : 84,85% versus 15,15%, alors que l'extinction de MLH1 et de MSH2 est plus fréquente chez les tumeurs peu différenciées 75% et 60% respectivement.
- L'analyse univariée montre qu'il existe une corrélation significative entre MLH1 et le grade ( $p=0,0219$ ) mais concernant MSH2 on ne trouve pas cette corrélation.

### III.7 Détection des mutations du gène KRAS par PCR en temps réel

#### III.7.1 Résultats de la phase analytique donnée par l'automate cobas Z 480

**Tableau 21.** Résultats du KRAS.

Sample ID	Test Result	Start of Run	Test Type	Operator	Position	Flags	Comment
7442/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6074/13	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	G01:G02	R299	
1080/14	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	E01:E02	R291	
<b>Run Name: 19-AUG-2014 10:12 KRAS</b>							
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A01:A02		
6074/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B03:B04		
74/14	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	E03:E04		
1080/14	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	F01:F02		
7495/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A03:A04		
280/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6993/13	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	E01:E02		
2292/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C03:C04		
2848/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	D03:D04		
1321/14	Mutation Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	F03:F04		
<b>Run Name: 17-AUG-2014 12:35 KRAS</b>							
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	A01:A02		
5001/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	F01:F02		
7442/13	Mutation Detected	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	D01:D02		
6074/13	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	G01:G02	R299	
1080/14	Invalid	17-Aug-2014 12:35:06	KRAS	Labmanager	E01:E02	R291	
<b>Run Name: 19-AUG-2014 10:12 KRAS</b>							
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	C01:C02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B01:B02		
7A1T03173AE001Z	Valid	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	A01:A02		
6074/13	Mutation Not Detected	19-Aug-2014 10:12:41	KRAS	Labmanager	B03:B04		

## Chapitre III : Résultats et discussion

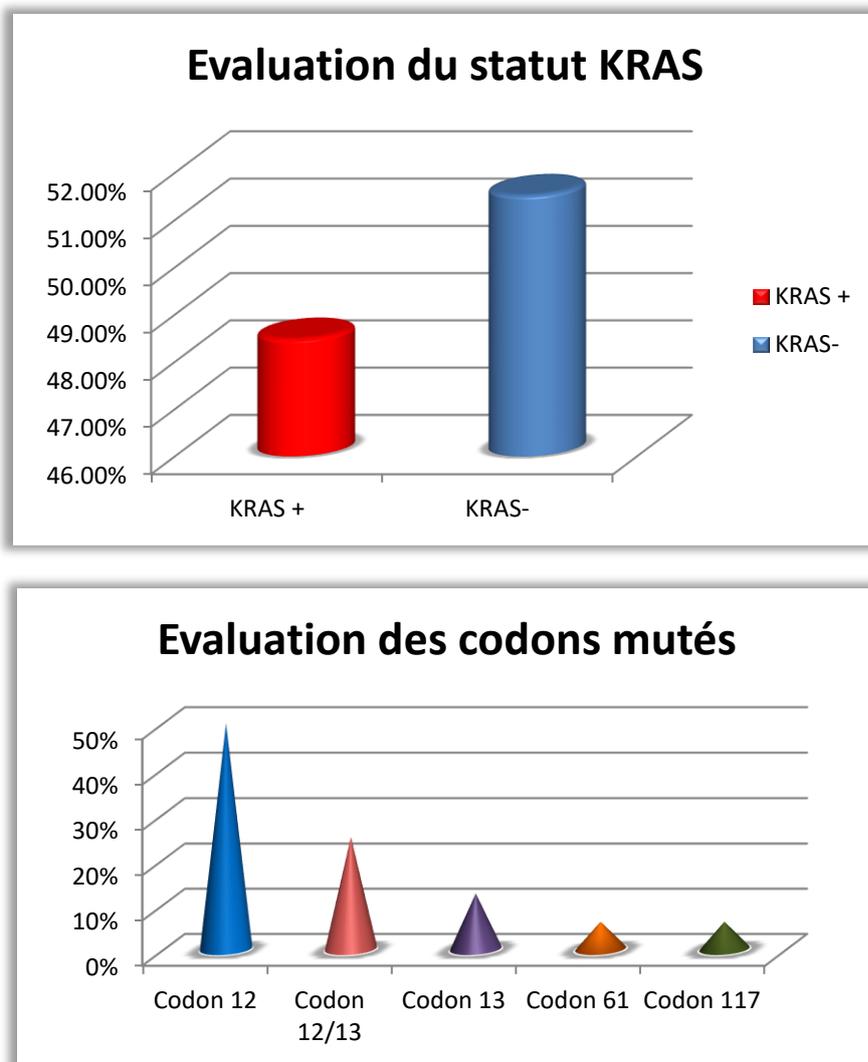
### III .7.2.Evaluation du statut KRAS

**Tableau 22.** Génotypage du gène KRAS et des codons mutés.

Statut KRAS	Nombre de patient (n=33)
KRAS+	16(48,48%)
KRAS-	17 (51,52%)

Dans notre série d'étude, on retrouve :

- (48,48%) (16 cas) présentant une mutation du gène KRAS, et 51,52% (17cas) du statut KRAS non muté.



**Figure 52.** Evaluation du statut KRAS et des codons mutés.

- Les mutations retrouvées au niveau des codons 12/13 (4 cas), du codon 12 (8cas), du codon 13(2cas), du codon 61(1cas) et du codon 117(1cas).

## Chapitre III : Résultats et discussion

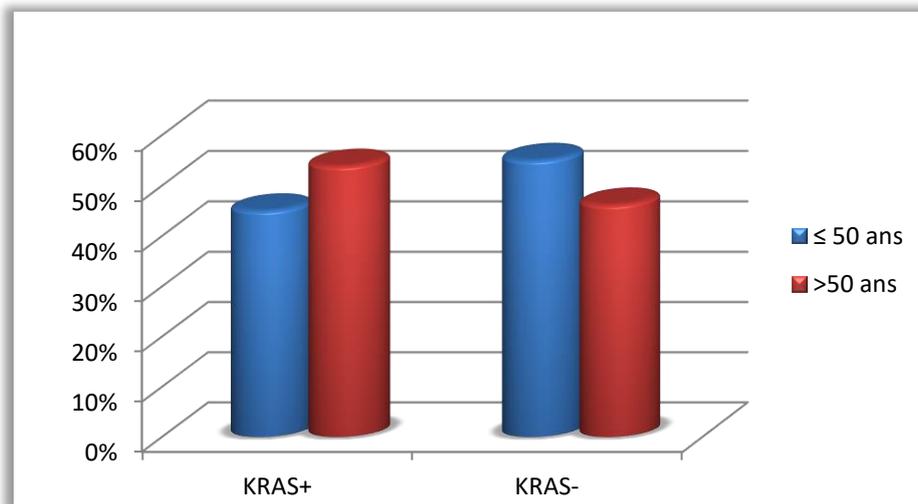
### III.7.3. Etudes des corrélations entre le statut KRAS et les différents paramètres clinicopathologiques

Dans cette partie de notre étude, nous avons effectué une étude statistique des corrélations entre le statut KRAS en rapport les différents paramètres : l'âge, le sexe, la localisation de la tumeur, le stade et le grade.

#### III.7.3.1. Corrélation entre l'âge et le statut KRAS

**Tableau 23.** Corrélation entre l'âge et le statut KRAS.

Tranche d'âge		KRAS	
		Positif	Négatif
≤ 50 ans	Effectifs	9	11
N=20	%	45	55
>50 ans	Effectifs	7	6
N=13	%	53,85	46,15
X <sup>2</sup>		0,2468	
d.d.l		1	
P-value		0,6193	
Significativité		Non significative	



**Figure 53.** Mutation de KRAS en fonction de l'âge.

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

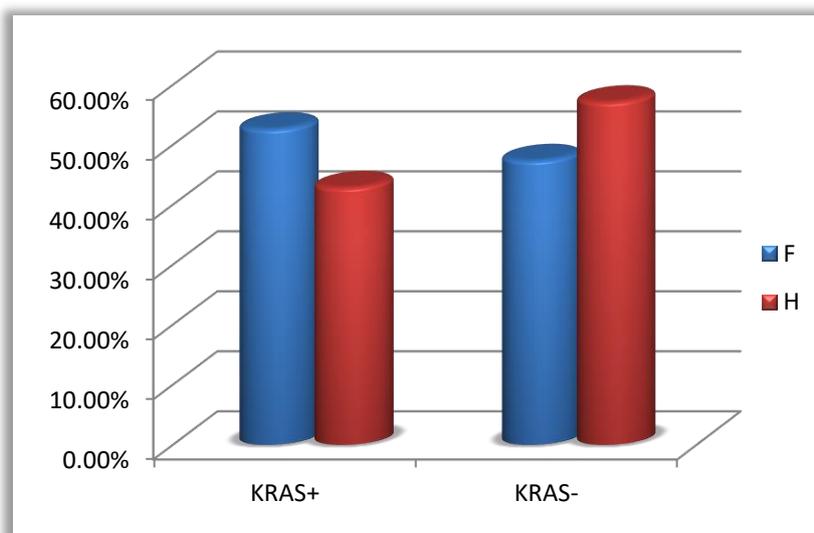
## Chapitre III : Résultats et discussion

- **Chez les patients d'âge  $\leq 50$**  : on observe 11 cas de KRAS non mutés (55%) Versus 9 cas de KRAS mutés (45%).
- **Chez les patients d'âge  $> 50$**  : on observe 6 cas de KRAS non mutés pour le (46,15%) Versus 7 cas mutés (53,85%).
- L'analyse univariée montre qu'il n'existe pas une corrélation significative entre le statut de KRAS et l'âge quoiqu'on remarque que la mutation de KRAS est plus fréquente chez les sujets d'âge  $> 50$ .

### III.7.3.2. Corrélation entre le sexe et le statut KRAS

**Tableau 24.** Corrélation entre le sexe et le statut KRAS.

Sexe		KRAS	
		Positif	Négatif
<b>F</b>	<b>Effectifs</b>	10	9
<b>N=19</b>	<b>%</b>	52,63	47,37
<b>H</b>	<b>Effectifs</b>	6	8
<b>N=14</b>	<b>%</b>	42,86	57,14
<b>X<sup>2</sup></b>		0,3083	
<b>d.d.l</b>		1	
<b>P-value</b>		0,5787	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 54.** Mutation de KRAS en fonction du sexe.

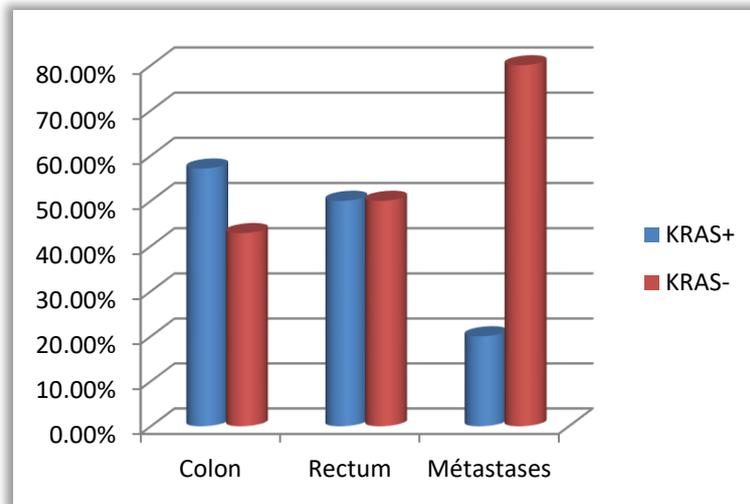
### Chapitre III : Résultats et discussion

Sur nos 33 patients (19 femmes et 14 hommes) ,10 cas (52,63%) sont mutés pour le gène KRAS versus 9 cas (47,37%) non mutés pour le gène KRAS chez les femmes. Six mutations du gène KRAS sont retrouvées chez les patients du sexe masculin.

#### III.7.3.3. Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS

**Tableau 25** .Corrélation entre la localisation tumorale et le statut KRAS.

La localisation tumorale		KRAS	
		Positif	Négatif
<b>Colon</b>	<b>Effectifs</b>	8	6
<b>n= 14</b>	<b>%</b>	57,14	42,86
<b>Rectum</b>	<b>Effectifs</b>	7	7
<b>n= 14</b>	<b>%</b>	50	50
<b>Métastase</b>	<b>Effectifs</b>	1	4
<b>n=5</b>	<b>%</b>	20	80
<b>X<sup>2</sup></b>		2,057	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,357	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 55.** Mutation de KRAS en fonction de la localisation tumorale.

- Colon : mutation KRAS, n= 8 (57,14%).  
Absence de mutation, n=6 (42,86%).
- Rectum : mutation KRAS, n=7 (50%).  
Absence de mutation, 7 cas (50%).

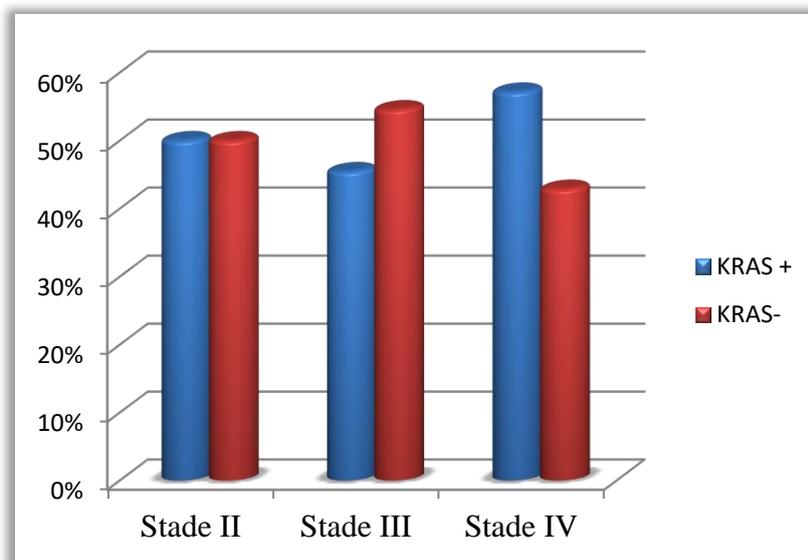
## Chapitre III : Résultats et discussion

- Métastase : Mutation KRAS, n=1cas 20%.  
Absence de mutation, 4 cas (80%).
- Il n'existe pas de corrélation statistique significative entre la mutation de KRAS avec la localisation tumorale.

### III.7.3.4. Corrélation entre le stade et le statut KRAS

**Tableau 26.** Corrélation entre le stade et le statut KRAS.

Stade pTNM/ UICC		KRAS	
		Positive	Négative
<b>Stade II</b>	<b>Effectifs</b>	1	1
<b>n=2</b>	<b>%</b>	50	50
<b>Stade III</b>	<b>Effectifs</b>	5	6
<b>n=11</b>	<b>%</b>	45,45	54,55
<b>Stade IV</b>	<b>Effectifs</b>	8	6
<b>n=14</b>	<b>%</b>	57,14	42,86
<b>X<sup>2</sup></b>		0,3401	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,8436	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 56.** Mutation de KRAS en fonction du stade.

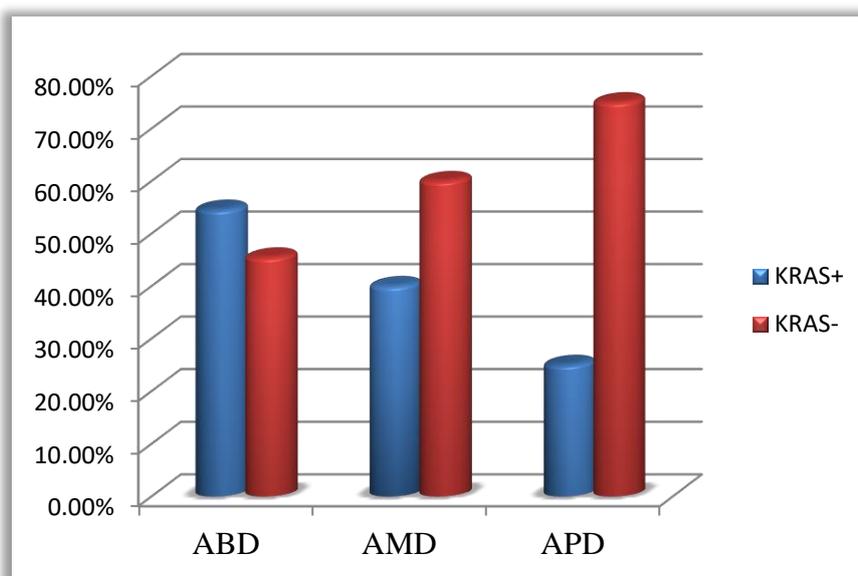
- L'analyse univariée montre qu'il n'y a pas une corrélation significative entre le statut de KRAS et le stade ( $p=0,8436$ ) quoiqu'on remarque qu'il y a plus de mutations de KRAS dans le stade IV (8cas).

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III.7.3.5. Corrélation entre le grade et le statut KRAS

**Tableau 27.** Corrélation entre le grade et le statut KRAS.

Grade de différenciation		KRAS	
		Positive	Négative
<b>ABD</b>	<b>Effectifs</b>	12	10
<b>N= 22</b>	<b>%</b>	54,55	45,45
<b>AMD</b>	<b>Effectifs</b>	2	3
<b>N=5</b>	<b>%</b>	40	60
<b>APD</b>	<b>Effectifs</b>	1	3
<b>N=4</b>	<b>%</b>	25	75
<b>X<sup>2</sup></b>		1,351	
<b>d.d.l</b>		2	
<b>P-value</b>		0,5089	
<b>Significativité</b>		Non significative	



**Figure 57.** Mutation de KRAS en fonction du grade.

Chez les patients de notre série nous remarquons que :

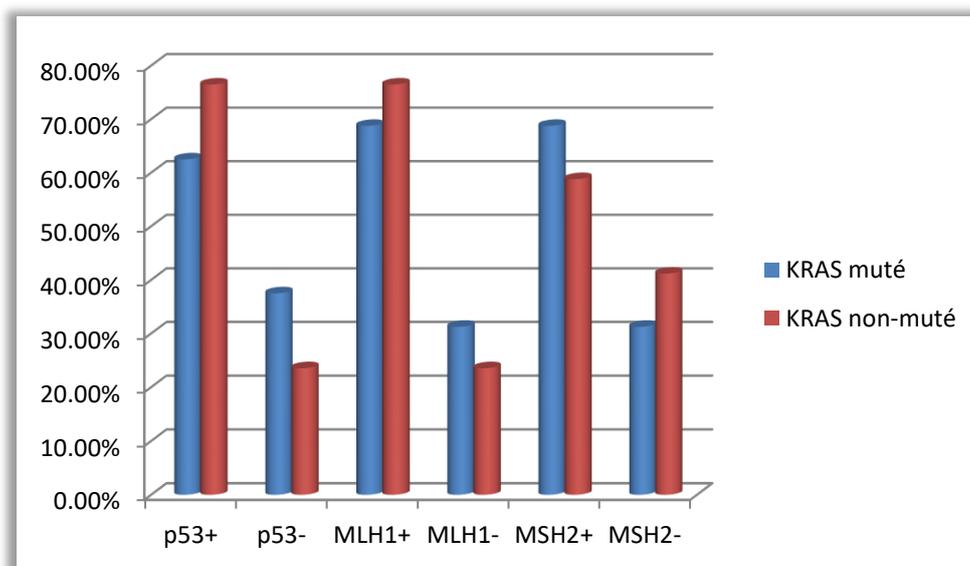
- la mutation de KRAS est présente dans 12 cas (54,55%), 2 cas (40%) et 1cas (25%) des adénocarcinomes bien, moyennement et peu différenciés respectivement ;
- alors que l'absence de mutation du gène KRAS est observée chez 10 cas (45,45%) , 3cas 60% et 3 (75%) des adénocarcinomes bien, moyennement et peu différenciés respectivement.

## Chapitre III : Résultats et discussion

### III.7.4. Répartition de l'expression de p53, MLH1 et MSH2 avec le statut KRAS

**Tableau 28** .Répartition de l'expression de p53, MLH1 et MSH2 avec le statut KRAS.

Statut KRAS			P53		MLH1		MSH2	
			Positive	Négative	Positive	Négative	Positive	Négative
<b>KRAS muté</b>	<b>16</b>	<b>Effectifs</b>	10	6	11	5	11	5
	<b>48,48%</b>	<b>%</b>	62,50	37,50	68,75	31,25	68,75	31,25
<b>KRAS non-muté</b>	<b>17</b>	<b>Effectifs</b>	13	4	13	4	10	7
	<b>51,22%</b>	<b>%</b>	76,47	23,53	76,47	23,53	58,82	41,18
<b>X<sup>2</sup></b>			0,7617		0,2477		0,351	
<b>d.d.l</b>			1		1		1	
<b>P-value</b>			0,3828		0,6187		0,5536	
<b>Significativité</b>			Non significative		Non significative		Non significative	



**Figure 58** .Expression de p53, de MLH1 et de MSH2 fonction du statut KRAS.

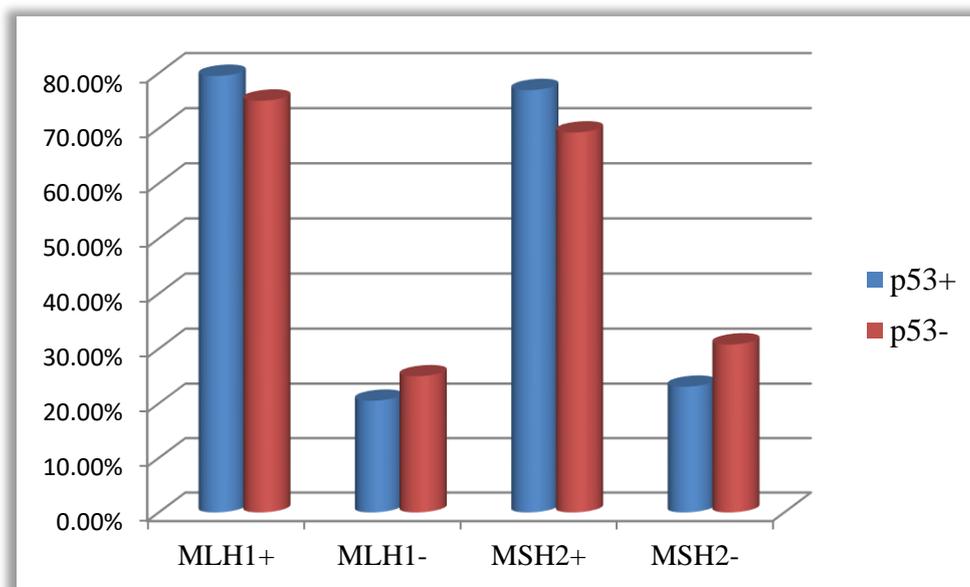
- Aucune corrélation significative existe entre l'expression de la protéine p53 et le statut KRAS en tant que facteur indépendant ( $p=0,3828$ ).
- Il n'existe pas de corrélation significative entre l'expression de hMLH1 et de hMSH2 de p53 et le statut KRAS en tant que facteur indépendant ( $p=0,6187$ ) versus ( $p=0,5536$ ).

### Chapitre III : Résultats et discussion

#### III.8. Répartition de l'expression de MLH1 et de MSH2 avec le statut de p53

**Tableau 29** .Répartition de l'expression de MLH1 et de MSH2 avec le statut de p53.

Statut p53			MLH1		MSH2	
			Positive	Négative	Positive	Négative
Positif	39	Effectifs	31	8	30	9
	75%	%	79,49	20,51	76,92	23,08
Négatif	13	Effectifs	9	3	9	4
	25%	%	75	25	69,23	30,77
X <sup>2</sup>			0,1092		0,3077	
d.d.l			1		1	
P-value			0,741		0,579	
Significativité			Non significative		Non significative	



**Figure 59.** Expression MLH1 et MSH2 en fonction du statut p53.

- L'analyse univariée montre qu'il n'existe pas une corrélation significative entre le statut de p53 et l'expression de MLH1 et MSH2 avec (p= 0,741) et (p=0,579) des deux marqueurs respectivement.

### **III.9. Discussion**

Le cancer colorectal est l'un des cancers les plus fréquents dans les pays occidentaux et représente une cause principale de mortalité par cancer. Ce cancer est classiquement rare en Afrique. Pourtant, le nombre de nouveaux cas de cancers colorectaux (CCR) ne cesse d'augmenter depuis 1975[93].

La prédominance masculine est habituellement rapportée dans la littérature occidentale avec un sex-ratio de 1,9 [94].

Nos résultats enregistrés dans une série de 60 patients atteints du cancer colorectal répartis en 31 hommes (51,61%) et 29 femmes (48,33%) avec un sex-ratio (homme /femme) de 1,07. Une prédominance masculine a été notée dans d'autres études et ce sex ratio est en concordance avec les données de la littérature nationale et internationale [95][96].

Dans la littérature occidentale, le CCR est rare avant 50 ans mais son incidence augmente avec l'âge. En France, l'âge moyen au diagnostic était de 68 ans [97] et aux États-Unis, l'âge moyen était de 74,2 ans pour les femmes et de 70,7 ans pour les hommes [98].

Dans notre série, l'âge moyen est de 56, 87 ans (29-83). Cet âge est beaucoup plus jeune que celui retrouvé dans les études européennes et américaines, mais il est comparable aux études arabes et africaines. En effet, l'âge moyen dans les études arabes et africaines est de 56 ans au Maroc [99], de 51ans en Egypte [100] , de 42,9 ans au Nigéria [101], de 46,7 ans au Togo [102]de 51,62 ans en Côte-d'Ivoire, de 47 et 50 ans dans deux études réalisés au Sénégal et de 54 ans au Madagascar [103].

Selon notre étude, le diagnostic du cancer colorectal se fait tardivement chez la majorité des patients : 5,55% du stade II, 55,52% du stade III et 38,89% du stade IV. Dans la série de Oukkal et Bouzid, l'incidence du cancer colorectal atteint un taux de 50,1 % et de 49,9 % aux stades I et II, respectivement [104]. En comparaison avec une série égyptienne, 78,6% des tumeurs étaient aux stades II et III [100] .

**Mallem (2012)** a trouvé dans sa série 66,7% du stade III et 28,4% du stade IV [105]. Selon la série de **Arfa (2006)** en Tunisie, 6 patients (4%) sont stade I, 61 stade II (40,7%) ,

51 cas de stade III (34%) et 32cas stade IV (21,33%) [106].

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

Au plan histologique : les adénocarcinomes bien différenciés, comme dans la littérature, sont prédominants dans notre série, ils représentent 73,21% (70% à 75% dans littérature [107]). Il en est de même pour les adénocarcinomes moyennement et peu différenciés et mucineux, dont les proportions sont voisines de celles de la littérature. Elles sont respectivement : 17,86% et 8,93% contre 27,5 % et 7,8 % dans la littérature [108]. Cela signifie que la majorité de nos patients ont des critères histologiques de bon pronostic.

Les mutations du gène TP53 marquent la transition de l'adénome au cancer et sont détectées dans plus de 50 % des CCR sporadique [109][110].

En cas de mutation du gène TP53, la protéine p53 a une demi vie plus longue et devient détectable par immunohistochimie, la protéine est ainsi surexprimée [111].

Concernant l'expression de la p53, selon nos résultats, 76,67 % des adénocarcinomes ont surexprimé cette protéine. Ceci concorde avec les données de **Worthley** qui suggère que la fréquence des anomalies du gène p53 augmente avec la progression de la lésion [112]. Ainsi, des modifications se trouvent dans 4% -26% des adénomes, 50% des adénomes avec foyers invasifs, et 50% -75% du CCR [113]. D'après nos données, il n'existe pas de corrélation entre l'expression de p53 et les différents paramètres notamment le sexe ( $p=0,64$ ), l'âge ( $p=0,89$ ), le site de la Tumeur ( $p=0,52$ ), le type histologique ( $p=0,84$ ).

Nos résultats s'accordent avec ceux de **Nussrat (2001)**[114] et de **Nasiri (2007)**[115] qui montrent qu'il n'avait pas de corrélation significative entre l'expression de p53 et le sexe, l'âge, le site de la tumeur et le type histologique.

De même, **Maeda** et ses collaborateurs (1997) ne retrouvaient pas de corrélation significative entre le p53 et les différents paramètres anatomopathologiques [116].

En revanche, **Paluszkień (2004)** et **Theodoropoulou (2009)** trouvent une corrélation entre l'expression de p53 et le stade tumoral [117][118]. Cette discordance des résultats pourrait être due à la différence entre l'effectif d'échantillons.

Le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) apparaît comme un élément clé de la cancérogénèse colorectale par son fort niveau d'expression et les phénomènes qu'il régule via ces voies de signalisation : division cellulaire, angiogénèse, métastase et inhibition de l'apoptose [92].

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

Dans le cancer colorectal, l'expression d'EGFR apparait comme un facteur de mauvais pronostic [119].

Sur les 30 tumeurs analysées dans notre série, 77% sont positives pour immunomarquage d'EGFR parmi lesquelles 16 cas (53,33%) de score 1, 3 cas (10%) de score 2 et 4 cas (13,33%) de score 3.

Plusieurs études ont rapporté le rôle important de l'EGFR dans la pathogénie du CCR, son expression peut être associée à des stades avancés du cancer colorectal qui varie entre 25% et 82% des cas [120], ces résultats sont en accord avec les nôtres.

Dans notre série, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la surexpression d'EGFR et l'âge ( $p= 0,53$ ), le sexe ( $p= 0,20$ ), la localisation tumorale ( $p=0,27$ ), grade de différenciation ( $p= 0,33$ ) et le stade tumoral ( $p= 0,16$ ). Cela correspond à des résultats rapportés dans la littérature [121].

Selon l'étude de **Tsai (2012)** sur 150 échantillons, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la surexpression d'EGFR et le grade de différenciation ( $p=0,15$ ) et le stade TNM ( $p=0,16$ ) [122].

En revanche, D'autres études ont signalé une différence statistique significative entre l'expression d'EGFR et le stade de la maladie [118].

En outre, **Tsai (2012)** montrait que le pourcentage d'échantillons à haute intensité (score3) était plus élevé dans les adénocarcinomes peu différenciés (32,6%) que dans moyennement différenciés (22,4%) et bien différenciés (6,1%)[122].

Par contre dans notre travail, le pourcentage d'échantillons à haute intensité score3 était dans les adénocarcinomes bien différenciés, cette discordance de résultats pourrait être due à la différence entre l'effectif d'échantillons (150 patients contre 30 patients pour notre étude).

Dans les dernières années, les résultats oncologiques sont améliorés avec les progrès des techniques chirurgicales et le traitement adjuvant. En effet, les marqueurs spécifiques des tumeurs, tels que les MSI et le KRAS sont à la fois utiles pour diriger le pronostic et la chimiothérapie des CCRs [123][124]. Les tumeurs MSI du côlon ont des profils

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

clinicopathologiques et moléculaires distinctifs et sont souvent associées à un pronostic favorable [125].

Il existe également des preuves qui suggèrent que les patients atteints du cancer colorectal avec un statut MSI positif montrent un bon bénéfice de survie avec une chimiothérapie à base de 5-fluoro-uracile(5-FU), et ainsi, une MSI peut constituer un utile marqueur moléculaire prédictif de réponse à ce type de thérapie adjuvante [126][127].

En outre, l'analyse de routine du statut MSI constitue également une application clinique pour faciliter le diagnostic de suspicion des cas d'HNPCC. En bref, la détection du phénotype MSI a trois principales applications cliniques: le pronostic du CCR; la prédiction de réponse aux agents chimiothérapeutiques, tels que le 5-fluoro-uracile et de l'irinotécan; et l'évaluation génétique du syndrome de Lynch.

En outre, il a été bien établi que MSI est un sous-type moléculaire du CCR ayant une voie de carcinogenèse complètement distincte des autres sous-types moléculaires.

Des techniques moléculaires développées au cours des deux dernières décennies permettent une détection fiable de MSI. Bien que ces techniques soient accessibles aux laboratoires de pathologie moléculaire, la communauté de l'oncologie n'a pas encore embrassé pleinement la détection de MSI dans la pratique de routine en ce qui concerne la clinique pour son rôle pronostique et prédictif.

Cependant, une bonne façon de détecter le dysfonctionnement des protéines MMR qui est la coloration immunohistochimique (IHC). Ici, en utilisant l'IHC, le profil d'expression de MLH1 et MSH2 a été examiné dans les tumeurs colorectales à des stades primaires et avancés. Donc, nous avons constaté une perte nette de l'expression des protéines MMR dans des 11/52(21,15%) et 13/52 (25 %) cas pour MLH1 et MSH2, respectivement.

Renforcé par d'autres données publiées, il a en effet été bien établi que MMR joue un rôle essentiel dans le contrôle des processus liés à l'oncogenèse et la progression tumorale de la majorité des cas de HNPCC et environ 15% des CCRs sporadiques [128][129].

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

Dans presque tous les articles publiés en utilisant l'analyse IHC, le phénotype MSI est affecté suite à la perte d'expression de MLH1 ou MSH2 ou les deux dans la tumeur [130].

Des études antérieures basées sur l'analyse immunohistochimique de MLH1 et de MSH2 ont démontré que la perte de ces protéines MMR se produit fréquemment dans le cancer colorectal sporadique. Les gammes d'expressions négatives sont 2-36% de MLH1 et 0 à 30% de MSH2, respectivement [131][132].

Ainsi, selon nos résultats, 36,54 % des cas étaient phénotypiquement instable (MSI) et les cas restants (63,46%) sont stables (MSS). Ces résultats sont proches de ceux de **Velayos** et ses collaborateurs (2005), qui ont trouvé de MSI-H dans (36 %) et (38%) des cas de métastases métachrones et synchrones, respectivement [133]. Une autre étude présente une fréquence élevée de MSI-H dans 37,7% des cas [134], et ils sont moins de ceux qui sont observés en Turquie avec une fréquence de MSI 43,2% des cas [135] et en Tunisie avec un pourcentage de MSI 70% des cas [96].

Notre étude montre une fréquence relativement élevée de cas d'instabilité des microsatellites par rapport à celle rapportée en Egypte (31%) de MSI chez les sujets jeunes [136] et par rapport à d'autres données dans la littérature mondiale. Cette variation de fréquence peut être due à plusieurs facteurs tels que les facteurs sociodémographiques (faible niveau d'éducation, âge avancé des personnes, etc.), les facteurs psychosociaux (manque d'intérêt sur la maladie, etc.), et l'accès aux soins.

Sinon, lorsque nous avons étudié la relation entre le profil d'expression de MMR et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients, nous avons trouvé une association significative entre l'expression de MLH1 et le grade de différenciation tumorale ( $p = 0,022$ ). Aussi, l'extinction de MLH1 est liée au grade peu différencié ou mucineux. Nous n'avons pas trouvé d'autres corrélations significatives entre l'expression de MLH1 et de MSH2 avec les autres paramètres.

En outre, selon les données de la littérature, les tumeurs MSI se développent par une voie mutationnelle différente de celle exploitée dans les tumeurs MSS et présentent des caractéristiques pathologiques distinctives, telles que l'emplacement proximale, le grade peu différencié, et l'intensité lymphocytaire péritumorale et l'infiltration intratumorale [108][137][138].

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

Il convient de noter, que l'instabilité des microsatellites n'est pas également corrélée avec la surexpression de p53 .Cependant, une relation inverse entre l'instabilité des microsatellites et la surexpression de p53 a été révélée dans des études antérieures [108][139] .

La présence de mutation du gène KRAS est prédictive de l'absence de réponse aux thérapies ciblées anti EGFR utilisant des anticorps monoclonaux (cetuximab, panitumumab) pour le traitement des patients atteints d'adénocarcinomes colorectaux .En effet, il est devenu obligatoire de s'assurer l'absence de mutation avant d'instaurer un traitement par les anticorps monoclonaux [140].

Les mutations activatrices de KRAS rendent la tumeur insensible à un blocage en amont par un anticorps, dont l'action principale est d'interrompre la voie de transduction du signal en empêchant la fixation du ligand sur son récepteur [70].

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

Une étude de **Lievre (2008)** a recherché la mutation KRAS chez 89 patients atteints de cancers colorectaux métastatiques, ces patients étaient traités par anticorps monoclonal (cétuximab) ,26 des 89 patients ont répondu au kétuximab et n'étaient pas porteurs de la mutation .Cette mutation KRAS a été retrouvée au niveau de la tumeur de 24 patients et ce traitement n'avait pas fonctionné [141]. Donc, la mutation KRAS entraîne la résistance au kétuximab.

Dans les cancers colorectaux ,33-48% % des tumeurs possèdent une mutation sur le gène KRAS. La protéine KRAS est un effecteur en aval de l'activité du récepteur de tyrosine kinase EGFR, qui active les cascades de signalisation intracellulaire médiées par les voies RAF / MEK, MAPK, AKT et PI3K [142].

D'autres études en Arabie Saoudite et en Jordanie et en Chine ont rapporté que le taux de mutation KRAS était 56% [143] ,44% [144] et 45% [145] respectivement. Dans les 33 patients atteints du cancer colorectal métastatique, 16cas (48,48%) présentant une mutation sur le gène KRAS avec 14 cas (87 ,71%) situés sur le codon 12 et 13 et 2 cas portent les

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

mutations sur le codon 61 et 117, respectivement.

Selon **Svrceka (2010)**, les mutations KRAS affectant surtout le codon 12 de l'exon 2 (70%) des cas, moins fréquemment le codon 13 de l'exon 2 (30%), dans quelques cas, on les retrouve au niveau du codon 61 de l'exon 3 et plus rarement le codon 59 [146]. Cela était également le cas dans notre étude ; 1/16 cas porte la mutation sur le codon 61.

De plus, les mutations du gène KRAS correspondant à la substitution d'une base par une autre, conduisant à la substitution d'un acide aminé de la protéine codée par un autre. En effet, les mutations les plus fréquentes entraînent la substitution de glycine (GGT) par l'aspartate (GAT) en faisant la transition de G>A au niveau du codon 12 (P.G12D), de la glycine par la valine (GTT) en faisant la transversion de G>T au niveau du codon 12 (p.G12V) ou de la glycine par l'aspartate au niveau du codon 13 (P.G13D) [147].

Dans notre étude, aucune corrélation significative n'a été signalée entre la mutation KRAS et les différents paramètres clinicopathologiques. Nos résultats sont comparables à ceux de **Zlobec (2010)** et ses collaborateurs chez 404 patients suisses [148]. Des résultats voisins sont rapportés chez 53 patients turcs [149]. **Li et son équipe (2012)** trouvent uniquement une corrélation significative avec les tumeurs peu différenciées et la métastase hépatique [150].

L'étude de **Moerkerk (1994)** a rapporté que le taux de mutation est plus fréquent à des stades avancés du CCR expliquant que le potentiel d'invasion tumorale est étroitement lié au taux de mutation de ce gène ainsi qu'au type de mutation ponctuelle [151]. En revanche, l'étude de **Li (2012)** ne retrouvait aucune corrélation significative entre le stade tumoral et le statut KRAS [150].

Dans notre étude, aucune corrélation n'a été retrouvée entre la surexpression de la p53 et le statut KRAS ( $p=0,21$ ) ce qui concorde avec les résultats de **Aissi (2013)** [108], de **Scott (1991)** [152] et de **Tortola (1999)** [153] qui rapportent que les altérations génétiques sont deux événements indépendants qui coopèrent dans l'initiation et la progression du processus de l'invasion tumorale et que la p53 à elle seule n'était pas suffisante pour provoquer la transformation maligne.

Nous avons également évalué le statut de KRAS par rapport à MSI et nous avons remarqué que les mutations de KRAS ont été moins fréquemment observées dans les CCRs avec

### *Chapitre III : Résultats et discussion*

---

MSI. Ce résultat est cohérent avec des données rapportées dans la littérature [154]. Sachant que nous n'avons signalé aucune corrélation significative entre les deux biomarqueurs. En effet, l'étude d'Aissi (2013) ne l'a pas trouvé [108].

Bien que certaines études antérieures aient montré une relation inverse entre l'instabilité des microsatellites et les mutations de KRAS et de p53 [155], d'autres ne l'ont pas montré [156]. Cette différence est probablement due en raison de l'utilisation de différents types de méthodes pour l'analyse de l'instabilité des microsatellites dans les différentes études et à la différence d'effectifs d'échantillons.

## *Conclusion*

---

L'intégration rapide des nouvelles techniques endoscopiques et moléculaires dans la pratique clinique, a établi la médecine colorectale à l'avant-garde de la recherche translationnelle. La collaboration approfondie entre des chirurgiens, des gastro-entérologues, des oncologues, des pathologistes, des généticiens et des biologistes moléculaires a fait progresser notre compréhension vis-à-vis de la progression des stades histopathologique et moléculaires du cancer colorectal (CCR).

Le CCR se développe à partir d'une muqueuse apparemment normale dans un stade précurseur, le polype adénomateux précancéreux, et peut évoluer vers une maladie invasive [112]. Les mécanismes moléculaires entraînant ce processus et les plus importants changements pathologiques qui caractérisent le CCR, sont continuellement raffinés.

En effet, afin de mieux comprendre ce processus, le but de cette étude était de caractériser les profils d'expression clinico-pathologiques et histomorphologiques des protéines p53, EGFR, MLH1 et MSH2 chez nos patients atteints du cancer colorectal et l'étude de leurs éventuelles corrélations avec différents paramètres clinicopathologiques pour évaluer leurs valeurs pronostiques et prédictives.

En vue d'une prescription thérapeutique, l'analyse moléculaire pour la mutation de K-RAS a été réalisée sur 33 échantillons fixés au formol et inclus en paraffine de patients atteints du cancer colorectal métastatique.

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

- de l'examen histopathologique dans le diagnostic de la maladie ;
- de l'analyse immunohistochimique dans la détection de l'expression membranaire d'EGFR et l'expression nucléaire des protéines p53, MLH1 et MSH2 ;
- de l'étude de biologie moléculaire par la PCR en temps réel dans la recherche des mutations du gène KRAS.

D'autre part, nos résultats, comme ceux de la littérature, ne montraient pas une corrélation significative entre la mutation de KRAS et ces différents biomarqueurs (p53, MLH1 et MSH2). Les patients qui ne portent pas une mutation constitutive de KRAS vont bénéficier d'une thérapie ciblée. Et la présence de MSI orientera vers la chimiothérapie ou traitement médical.

## *Conclusion*

---

D'autres facteurs de résistance aux traitements comme (NRAS, BRAF) seront probablement identifiés dans un proche avenir. Des mutations ont déjà été détectées dans les voies de signalisation de l'EGFR (par exemple MEK1) et de multiples altérations génétiques impliquées dans la carcinogénèse colorectale font l'objet de recherches intenses.

Il est possible de détecter les mutations (KRAS, NRAS, BRAF) à partir l'ADN tumoral circulant dans le sang des patients atteints de cancer colorectal primitif ou métastatique. Ceci permettra de mieux moduler les choix thérapeutiques, permettant aux patients de bénéficier de nouvelles thérapies toujours mieux ciblées.

## Références bibliographiques

---

1. Manuel de Prise en Charge Du cancer Du Colon (Algérie, Février 2016).
2. Marieb E.N. Anatomie et physiologie humaine. 1999 ; *De Boeck*. 1194p.
3. Gallot M. Anatomie chirurgicale du côlon. *EMC - Techniques chirurgicales - Appareil digestif* 2006 ; 1-8 :40-535.
4. Moore K.L. et Dalley A.F. Anatomie médicale: aspects fondamentaux et applications cliniques. *Amazon* 2001; 1177p.
5. Lequerrier Alain. ABDOMEN. Nouvelle nomenclature. Nouveaux dossiers d'anatomie P.C.E.M. *Heures de France* 1991 ; 207p.
6. Kasdagly M., Radhakrishnan S., Reddivari L., Veeramachaneni D.N., Vanamala J. Colon carcinogenesis: influence of Western diet-induced obesity and targeting stem cells using dietary bioactive compounds. *Nutrition* 2014; 30(11-12):1242-56.
7. Abdul K.F.J., Gallicano G., Mishra L. Colon cancer stem cells. *Gastrointest Cancer Res* 2010 ; 16–23.
8. Booth C, Potten C.S. Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. *J Clin Invest* 2000; 105: 1493–500.
9. Anderson E.C., Hessman C., Levin T.G., Monroe M.M., Wong M.H. The role of colorectal cancer stem cells in metastatic disease and therapeutic response. *Cancers* 2010; 3: 31–39.
10. Todaro M., Francipane M.G., Medema J.P., Stassi G. Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* 2010; 138:2151–62.
11. Brittan M., Wright N.A. Gastrointestinal stem cells. *J Pathol* 2002; 197:492–509.
12. D'Errico I., Moschetta A. Nuclear receptors, intestinal architecture and colon cancer: an intriguing link. *Cell Mol Life Sci* 2008; 65:1523–43.
13. Humphries A., Wright N.A. Colonic crypt organization and tumorigenesis. *Nat Rev Cancer* 2008; 8:415–24.
14. Ferlay J., Soerjomataram I., Ervik M., Dikshit R., Eser S., Mathers C. et al. GLOBOCAN 2012 v1.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: *IARC Cancer Base N°11*. Lyon, France: *International Agency for Research on Cancer* 2013.
15. Registre du cancer, INSP, 2012.
16. Viguier J., Bourlier J., Karsenti D., De Calan L., Danque Chin Dorval E. Cancer du colon. *EMC Gastro-entérologie* 2003 ; 18p.
17. Morson B. The poly-cancer sequence in the large bowel. *Proc R Soc Med* 1974; 67(6 Pt 1):451–457.
18. Lynch H.T., De la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003; 348(10):919–932.
19. Winawer S.J., Zauber A.G., Ho M.N., O'Brien M.J., Gottlieb L.S., Sternberg S.S. et al. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic polypectomy. *N Engl J Med* 1993;

## Références bibliographiques

---

329(27):1977–1981.

**20.** Vogelstein B., Fearon E.R., Hamilton S.R., Kern S.E., Preisinger A.C., Leppert M. et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319(9):525–532.

**21.** Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990 61(5):759–767.

**22.** Fearon E.R. Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; 6:479–507.

**23.** Pino M.S., Chung D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* 2010; 138(6):2059–2072.

**24.** Haigis K.M., Kendall K.R., Wang Y., Cheung A., Haigis M.C., Glickman J.N., et al. Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nat Genet* 2008; 40(5):600–608.

**25.** Takayama T., Katsuki S., Takahashi Y., Ohi M., Nojiri S., Sakamaki S. et al. Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *N Engl J Med* 1998; 339(18):1277–1284.

**26.** Markowitz S.D., Bertagnolli M.M. Molecular Origins of Cancer. Molecular Basis of Colorectal Cancer. *N Engl J Med* 2009; 361(25): 2449–2460.

**27.** Risio M. The natural history of adenomas. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* 2010 ; 24 (3):271–280.

**28.** Risio M., Lipkin M., Candelaresi G.L., Bertone A., Coverlizza S., Rossini F.P. Correlations between rectal mucosa cell proliferation and the clinical and pathological features of nonfamilial neoplasia of the large intestine. *Cancer Res* 1991; 51:1917–21.

**29.** Wong W.M, Mandir N., Goodlad R.A., Wong B.C., Garcia S.B., Lam S.K., et al. Histogenesis of colorectal adenomas and hyperplastic polyps: the role of cell proliferation and crypt fission. *Gut* 2002; 50:212–7.

**30.** Figueiredo P., Donato M., Urbano M., Goulao H., Sofia C., Leitao M., et al. Aberrant crypt foci: endoscopic assessment and cell kinetics characterization. *Dis Colon Rectum* 2009; 24:441–50.

**31.** Zoratto F., Rossi L., Verrico M., Papa A., Basso E., Zullo A. et al. Focus on genetic and epigenetic events of colorectal cancer pathogenesis: implications for molecular diagnosis. *Tumour Biol* 2014; 35(7):6195-206.

**32.** Huang D., Du X. Crosstalk between tumor cells and microenvironment via Wnt pathway in colorectal cancer dissemination. *World J Gastroenterol* 2008; 14(12):1823–7.

**33.** Booth R.A. Minimally invasive biomarkers for detection and staging of colorectal cancer. *Cancer Lett* 2007; 249(1):87–96.

**34.** De Roock W., Biesmans B., De Schutter J., Tejpar S. Clinical biomarkers in oncology: focus on colorectal cancer. *Mol Diag Ther* 2009 ; 13(2):103–14.

## Références bibliographiques

---

35. William M., Grady M.D. Transforming Growth Factor B Signaling in Colorectal Cancer. *Current Colorectal Cancer Reports* 2007; 3:65–70.
36. Tenesa A., Dunlop M. New insights into the aetiology of colorectal cancer from genome-wide association studies. *Nat. Rev. Genet* 2009; 10, 353–358.
37. Waldner M.J., Neurath M.F. The molecular therapy of colorectal cancer. *Mol Aspects Med* 2010; 31(2):171-8.
38. Becker C., Fantini M.C., Schramm C., Lehr H-A., Wirtz S., Nikolaev A. et al. TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. *Immunity* 2004; 21, 491–501.
39. Chow J.Y.C., Cabral J.A., Chang J., Carethers J.M. TGF-beta modulates PTEN expression independently of SMAD signaling for growth proliferation in colon cancer cells. *Cancer Biol* 2008; 7, 1694–1699.
40. Becker C., Fantini M.C., Neurath M.F. TGF-beta as a T cell regulator in colitis and colon cancer. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006; 17; 97–106.
41. Bollrath J., Phesse T.J., Von Burstin V.A., Putoczki T., Bennecke M., Bateman T. et al. Gp130-mediated stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis. *Cancer Cell* 2009; 15, 91–102.
42. Grivennikov S., Karin E., Terzic J., Mucida D., Yu G.-Y., Vallabhapurapu S. et al. IL-6 and stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell* 2009; 15:103–113.
43. King T.C. Elsevier's integrated pathology, Pathology. Philadelphia, PA : Mosby .Elsevier 2007;123,( 382 p).
44. Ibrahim A.E.K., Arends M.J. Molecular typing of colorectal cancer: applications in diagnosis and treatment. *Diagnostic histopathology* 2011; 18:2, 70-80.
45. Naguib A., Wilson C.H, Adams D.J., Arends M.J. Activation of K-RAS by co-mutation of codons 19 and 20 is transforming. *J Mol Signal* 2011; 6: 2.
46. Katz M.E., McCormick F. Signal transduction from multiple Ras effectors. *Curr Opin Genet Dev* 1997 ; 7: 75-9.
47. Barbacid M. Ras genes. *Annu Rev Biochem* 1987; 56: 779-827.
48. Shivapurkar N., Huang L., Ruggeri B., Swalsky P.A., Bakker A., Finkelstein S. et al. K-ras and p53 mutations in aberrant crypt foci and colonic tumors from colon cancer patients. *Cancer Lett* 1997; 115: 39-46.
49. Otori K., Oda Y., Sugiyama K., Hasebe T., Mukai K., Fujii T et al. High frequency of K-ras mutations in human colorectal hyperplastic polyyps. *Gut* 1997; 40: 660-3.
50. Andreyev H.J., Norman A.R., Cunningham D. Oates J., Dix B.R., Iacopetta B.J. et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer* 2001;85: 692-6.
51. Luo F., Brooks D.G., Ye H., Hamoudi R., Pouligiannis G., Patek C.E. et al. Conditional

## Références bibliographiques

---

expression of mutated K-ras accelerates intestinal tumourigenesis in Msh2-deficient mice. *Oncogene* 2007; 26: 4415-27.

52. Luo F., Pouligiannis G., Ye H., Hamoudi R., Zhang W., Dong G. et al. Mutant K-ras promotes carcinogeninduced murine colorectal tumourigenesis, but does not alter tumour chromosome stability. *J Pathol* 2011; 223: 390-9.

53. Luo F., Ye H., Hamoudi R., Dong G., Zhang W., Patek C.E. et al. K-ras exon 4A has a tumour suppressor effect on carcinogen-induced murine colonic adenoma formation. *J Pathol* 2010; 220: 542-50.

54. Plowman S.J., Arends M.J., Brownstein D.G., Luo F., Devenney P.S., Rose L. et al. The K-Ras 4A isoforms promotes apoptosis but does not affect either lifespan or spontaneous tumour incidence in ageing mice. *Experimental Cell Research* 2006; 312: 16-26.

55. Sullivan K.M., Kozuch P.S. Impact of KRAS mutations on management of colorectal carcinoma. *Patholog Res Int* 2011; 219-309.

56. Bai L., Zhu W.G. p53: Structure, Function and Therapeutic Applications. *J.Cancer Mol* 2006; 2(4):141-153.

57. Gryfe R., Swallow C., Bapat B., Redston M., Gallinger S., Couture J. Molecular biology of colorectal cancer. *Curr Probl Cancer* 1997 ; 21:233–300.

58. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991; 253:49–53.

59. Baker S.J., Fearon E.R., Nigro J.M., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Jessup J.M., et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244:217–221.

60. Vogelstein B., Lane D., Levine A.J. Surfing the p53 network. *Nature* 2000; 408:307–310.

61. Momand J., Zambetti G.P., Olson D.C., George D., Levine A.J. The mdm-2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 1992; 69:1237–1245.

62. Honda R., Yasuda H. Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *Embo J* 1999; 18:22–27.

63. Wsierska-Gadek J., Horky M. How the nucleolar sequestration of p53 protein or its interplayers contributes to its (re)-activation. *Ann NY Acad Sci* 2003; 1010:266–272.

64. Agarwal M.L., Taylor W.R., Chernov M.V., Chernova O.B., Stark G.R. The p53 network. *J Biol Chem*, 1998; 273:1–4.

65. Harris S.L., Levine A.J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene* 2005; 24:2899–2908.

66. El-Deiry W.S., Tokino T., Velculescu V.E., Levy D.B., Parsons R., Trent J.M. et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell* 1993; 75:817–825.

67. Taylor W.R., Stark G.R. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001 ; 20(15):1803-15.

68. Hisamuddin I.M., Yang V.M. Molecular Genetics of Colorectal Cancer: An Overview.

## Références bibliographiques

---

*Curr Colorectal; Cancer Rep* 2006; 2(2): 53–59.

69. Ogino S., Goel A. Molecular Classification and Correlates in Colorectal Cancer. *J Mol Diagn* 2008; 10(1): 13–27.

70. Lamoril J., Ameziane., Deybach J.C., Bouizegarène P. et Bogard M. KRAS et cancer colorectal : un pas de géant vers la médecine personnalisée. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 2009; 24(4) :196-209.

71. Grady W.M. Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23:11–27.

72. Vogelstein B., Fearon E.R., Kern S.E., Hamilton S.R., Preisinger A.C., Nakamura Y. et al. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244(4901):207–11.

73. Abdel-Rahman W.M., Katsura K., Rens W., Gorman P.A., Sheer D., Bicknell D. et al. Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98:2538–2543.

74. Rowan A., Halford S., Gaasenbeek M., Kemp Z., Sieber O., Volikos E. et al. Refining molecular analysis in the pathways of colorectal carcinogenesis. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3:1115–1123.

75. Bos J.L., Fearon E.R., Hamilton S.R., Verlaan-de Vries M., Van Boom J.H., Van der Eb A.J., et al. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327, 293–297.

76. Peinado M.A., Malkhosyan S., Velazquez A., Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(21):10065–9.

77. Boland C .R., Goel A. Somatic evolution of cancer cells. *Semin Cancer Biol* 2005; 15(6):436-50.

78. Ionov Y., Peinado M.A., Malkhosyan S., Shibata D., Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993; 363(6429):558–61.

79. Thibodeau S.N., Bren G., Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260(5109):816–9.

80. Markowitz S., Wang J., Myeroff L., Parsons R., Sun L., Lutterbaugh J., Fan R.S. et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268:1336–1338.

81. Rampino N., Yamamoto H., Ionov Y., Li Y., Sawai H., Reed J.C., Perucho M. Somatic frameshift mutations in the BAX gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* 1997; 275:967–969.

82. Shia J., Ellis N.A., Paty P.B., Nash G.M., Qin J., Offit K. et al. Value of histopathology in predicting microsatellite instability in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer. *Am J Surg Pathol* 2003; 27:1407–1417.

## Références bibliographiques

---

83. Alexander J., Watanabe T., Wu T.T., Rashid A., Li S., Hamilton S.R. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001; 158:527–535.
84. Ogino S., Odze R.D., Kawasaki T., Brahmandam M., Kirkner G.J., Laird P.W. et al. Correlation of pathologic features with CpG island methylator phenotype (CIMP) by quantitative DNA methylation analysis in colorectal carcinoma. *Am J Surg Pathol* 2006; 30:1175–1183.
85. Jass J.R. Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Dis Markers* 2004; 20(4–5):215–24.
86. Issa J.P. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 2004; 4:988–993.
87. Marck V. Manuel de techniques d’anatomo cytopathologie. *Masson*. Paris.2010; 183p.
88. Genton C.Y. L’immunohistochimie : son principe, ses applications et ses limites. *Clinics in Mother and child Health* 2010; 3(1),477-481.
89. Dubosson M. Mise au point d’une PCR en temps réels pour le diagnostic de kératites à *Acanthamoeba SPP*. *Mémoire de doctorat*. Grenoble.2011.
90. Gurzu S., Jung J., Mezei T., Pávai Z. The correlation between the immunostains for p53 and Ki67 with bcl-2 expression and classical prognostic factors in colorectal carcinomas. *Romanian Journal of Morphology and Embryology* 2007; 48(2):95–99.
91. Bukhari M.H., Niazi S., Naseer A. Relationship of immunohistochemistry scores of altered p53 protein expression in relation to patient’s habits and histological grades and stages of squamous cell carcinoma. *Journal of Cutaneous Pathology, J Cutan Pathol* 2009; 36, 342–349.
92. Penault-Llorca F., Bibeau F., Arnould L., Bralet M.P., Rochaix P., Sabourin JC. EGFR expression in colorectal cancer and role in tumorigenesis. *Bull Cancer* 2005; 92 (Spec no):S5-11.
93. Boyle P., Langman J.S. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 2000; 321(7264):805- 808.
94. Silvéra L., Galula G., Tiret E., Louvet C., Leroux J-L., Trutt B.(2006) Cancer du côlon en le-de-France : description et évaluation du respect des recommandations médicales en *Gastroenterol Clin Biol* 2002 ; 30:852–858.
95. Meddah D. , Meddah B., Tir Touil A., Ghalek M., Sahraoui T. Étude épidémiologique du cancer du côlon chez des patients de l’Ouest algérien.. *J. Afr. Cancer* 2009; 1:31-35.
96. Arfaoui Toumi A., Trabelsi M., Blel A., Aloui R., Ben Hmida M., Hamza A. , et al. Immunohistochemical expression pattern of MMR protein can specifically identify patients with colorectal cancer microsatellite instability. *Tumor Biol* 2014; 35:6283–6291.
97. Souques M. , Lassalle M., Guldner L., Asselain B., Barres D., Pavis C. et al . Colorectal polyps and cancers diagnosed by pathologists in Ile de France Region. Crisapif-Petri Study. *Gastroenterol Clin Biol* 2006; 30(4):587-93.
98. Jackson-Thompson J., Ahmed F., German R.R., Lai S.M., Friedman C. Descriptive

## Références bibliographiques

---

epidemiology of colorectal cancer in the United States, 1998– 2001. *Cancer* 2006; 107(5 Suppl):1103-11.

**99.** Sentissi S., Amrani L., Serraj I., Galab M., Ibrahim A., Amrani N. Caractéristiques épidémiologiques du cancer colorectal : étude multicentrique. *Acta Endosc* 2010 ; 40:419-423.

**100.** El-Bolkainy T.N ., Sakr M.A., Nouh A.A., El-Din N.H. A comparative study of rectal and colonic carcinoma: demographic, pathologic and TNM staging analysis. *J Egypt Natl Canc Inst* 2006; 18(3):258-63.

**101.** Edino ST ., Mohammed A.Z ., Ochicha O. Characteristics of colorectal carcinoma in Kano, Nigeria: an analysis of 50 cases. *Niger J Med* 2005; 14(2):161-6.

**102.** Darré T., Amégbor K ., Bagny A., Sewa E., Tchangai B., Sakiye A., et al Allasani F. Profil histo-épidémiologique des cancers colorectaux au Togo .Histo epidemiological profile of the colorectal cancers in Togo .*J. Afr. Hépatol. Gastroentérol* 2014; 8:226-229.

**103.** Peghini M., Pajaonarison P., Pecarrere J.L., Razafindramboa H., Richard J., Morin D. Épidémiologie des cancers du tube digestif à Madagascar., *Médecine d'Afrique Noire* 1997 ; 44 (10) :518-521.

**104.** Oukkal M., Bouzid K. Études épidémiologiques des cancers colorectaux au service d'oncologie médicale du CPMC d'Alger 2006 in Meddah D. , Meddah B., Tir Touil A., Ghalek M., Sahraoui T. Étude épidémiologique du cancer du côlon chez des patients de l'Ouest algérien..*J. Afr. Cancer* 2009 ; 1:31-35.

**105.** Mallem D. Les cancers colorectaux dans les wilayas de Batna étude épidémiologique clinique et thérapeutique. *Batna*. 2012.

**106.** Arfa N., Hamdani ., Ben Abid S., Ghariani B., Mannai S., Mestiri H., Khalfallah MT. et Mazabi S.R. Survie et facteurs pronostiques des adénocarcinomes colorectaux étude analytique uni et multifactorielle de 150 cas, *Annales de chirurgie* 2006 ; 131(2) ,104-111.

**107.** Barth X., Leclercq T. « Cancer du côlon ». *La Revue du Praticien* 1997 ; 47 : 1575 – 1581.

**108.** Aissi S., Buisine M.P., Zerimech F., Kourda N., Moussa A., Manai M., et al. Somatic molecular changes and histo-pathological features of colorectal cancer in Tunisia. *World J Gastroenterol* 2013; 19(32):5286–94.

**109.** Munro A. J., Lain S., Lane D P. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer* 2005; 92(3): 434–444.

**110.** Zhang P., Zuo Z., Wu A., Shang W., Bi R., Jin Q. et al . *miR-600 inhibits cell proliferation, migration and invasion by targeting p53 in mutant p53-expressing human colorectal cancer cell lines.* *Oncol Lett* 2017; 13(3): 1789–1796.

**111.** Chraïbi M ., Elfatemi H., Chbani L., Znati K., Harmouch T., Bennis S., Amarti A., Elabkari M. et Ibrahim A. Profil immunohistochimique du ki67 et de la p53 dans les adenomes et les adénocarcinomes colorectaux, *Revue Marocaine du Cancer* 2011; 3, 4, 31-35.

## Références bibliographiques

---

- 112.** Worthley D.L., Whitehall V.L., Spring K.J. et Leggett B.A. Colorectal carcinogenesis: road maps to cancer. *World J Gastroenterol* 2007;13(28):3784-91.
- 113.** Morán A., Ortega P., Juan C., Fernández-Marcelo T., Frías C., Sánchez-Pernaute A., José-Torres A. et al. Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance. *World J Gastrointest Oncol* 2010 ; 2(3): 151–158.
- 114.** Nussrat F.L., Ali H.H., Hussein H.G., Al-Ukashi R.J. Immunohistochemical Expression of ki-67 and p53 in Colorectal Adenomas: A Clinicopathological Study. *Oman Medical Journal* 2011; 26,4: 229-234.
- 115.** Nasiri G., Reza M., Rezaei E., Kamran G., Seilanian-Toosi M., Malekifard M. Expression of p53 in Colorectal Carcinoma: Correlation with Clinicopathologic Features. *Arch Iranian Med* 2010; 10 (1), 38 – 42.
- 116.** Maeda K., Chung Y., Kang S., Ogawa M., Onoda N., Nakata B. et al Y. Overexpression Of Cyclin D1 And p53 Associated with Disease Recurrence in Colorectal Adenocarcinoma. *Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)* 1997; 74, 310–315.
- 117.** Paluszkiwicz P., Berbe H., Pawłowska-Wakowicz B., Cybulski M., Paszkowska A. p53 protein accumulation in colorectal cancer tissue has prognostic value only in left-sided colon tumours. *Cancer Detection and Prevention* 2004; 28 252–259.
- 118.** Theodoropoulos G.E., Karafoka E., Papailiou J.G., Stamopoulos P., Zambirinis CP., Bramis K., et al. P53 and EGFR expression in colorectal cancer: a reappraisal of 'old' tissue markers in patients with long follow-up. *Anticancer Res* 2009; 29(2):785-91.
- 119.** Nicholson R.I., Gee J.M., Harper M.E. EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 2001; 37 S4:S9-15.
- 120.** Zlobec I., Vuong T., Hayashi S., Haegert D., Tornillo L., Terracciano L. et al. A simple and reproducible scoring system for EGFR in colorectal cancer: application to prognosis and prediction of response to preoperative brachytherapy. *Br J Cancer* 2007; 96(5): 793–800.
- 121.** Mohammadi G., Jamialahmadi K., Lary S., Ghaffarzadegan K. Expression of membranous Epidermal Growth factor receptor In colorectal Adenocarcinoma and It's Correlation with Clinicopathological Features. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 2011; 14, 357-362.
- 122.** Tsai W.C., Lin C.K., Lee H.S., Chen A., Nieh S., Yu C.P. et al. Discordance between EGFR expression and clinicopathologic parameters of colorectal adenocarcinoma in Taiwan. *Chin J Physiol* 2012; 55(5):352-60.
- 123.** Mostert B., Jiang Y., Sieuwerts A.M., Wang H., Bolt-de Vries J., Biermann K., et al. KRAS and BRAF mutation status in circulating colorectal tumor cells and their correlation with primary and metastatic tumor tissue. *Int J Cancer* 2013; 133(1):130–41.
- 124.** Stintzing S. Management of colorectal cancer. *F1000Prime Rep* 2014; 6: 108.
- 125.** De la Chapelle A., Hampel H. Clinical relevance of microsatellite instability in

## Références bibliographiques

---

colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28(20):3380–7.

**126.** Niv Y. Biologic behavior of microsatellite-unstable colorectal cancer and treatment with 5-fluorouracil. *Isr Med Assoc J* 2005; 7(8):520–4.

**127.** Elsaleh H, Iacopetta B. Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer*, 1(2):104–9.

**128.** Marra G., Jiricny J. (2005). DNA mismatch repair and colon cancer. *Adv Exp Med Biol*, 570:85–123.

**129.** Savio AJ., Mrkonjic M., Lemire M., Gallinger S., Knight J.A., Bapat B. The dynamic DNA methylation landscape of the mutL homolog 1 shore is altered by MLH1-93G>A polymorphism in normal tissues and colorectal cancer. *Clin Epigenetics* 2017; 9: 26.

**130.** Mensenkamp A.R., Vogelaar I.P., Van Zelst-Stams W.A., Goossens M., Ouchene H., Hendriks-Cornelissen S.J., et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology* 2013; 146, 3, 643–646.

**131.** Kim H., Piao Z., Kim J.W., Choi J. S., Kim N.K., Lee J.M. et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 in colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Pathol. Res. Pract* 1998; 194, 3–9.

**132.** Plevova P., Sedlakova E., Zapletalova J., Krepelova A., Skypalova P., Kolar Z. Expression of the hMLH1 and hMSH2 proteins in normal tissues: relationship to cancer predisposition in hereditary non-polyposis colon cancer. *Virchows Arch* 2005; 446, 112–119.

**133.** Velayos F.S., Lee S-H., Qiu H., Dykes S., Yiu R., Terdiman J.P., et al. The Mechanism of Microsatellite Instability Is Different in Synchronous and Metachronous Colorectal Cancer. *J Gastrointest Surg*, 2005 ; 9(3):329-335.

**134.** Effendi-Y S. R., Zain L.H., Siregar G.A., Lubis H.R., Damanik H.A., Laksmi L.I. et al. C. Adenomatous Polyposis Coli, mismatch repair, and microsatellite instability in colorectal cancer based on different locations. *Acta Med Indones* 2013 ; 45(4):275-83.

**135.** Erdamar S., Ucaryilmaz E., Demir G., Karahasanoglu T., Dogusoy G., Dirican A., Goksel S. Importance of MutL homologue MLH1 and MutS homologue MSH2 expression in Turkish patients with sporadic colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2007; 7;13(33): 4437-4444.

**136.** Salman M.I., Elhefnawy N.G., Abou-Zeid A.A., Nada M.A. Clinicopathological and immunohistochemical study of mismatch repair gene (hMLH1 and hMSH2) expression in colorectal carcinoma of young Egyptian patients. *Egyptian Journal of Pathology* 2012; 32(1 ): 52–58.

**137.** Edmonston T.B., Cuesta K.H., Burkholder S., Barusevicius A., Rose D., Kovatich A.J., et al. Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers. *Hum Pathol* 2000; 31(12):1506–14.

**138.** Rigau V., Nicole Sebbagh B.S., Sylviane O., Francois P., Najat M., Yann P., et al.

## Références bibliographiques

---

Microsatellite instability in colorectal carcinoma: the comparison of immunohistochemistry and molecular biology suggests a role for hMLH6 immunostaining. *Arch Pathol Lab Med*, 2003; 127:694–700.

**139.** Samowitz W. The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *J Mol Diagn* 2007 ; 9:281–283.

**140.** Di-Fiore F., Sesboué R., Michel P., Sabourin J.C., Frebourg T. Molecular determinants of anti-EGFR sensitivity and resistance in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010; 103(12): 1765–1772.

**141.** Lièvre A., Bachet J.B., Boige V., Cayre A., Le Corre D., Buc E., et al. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2008; 26(3):374-9.

**142.** Janowski E., Timofeeva O., Chasovskikh S., Goldberg M., Kim A., Banovac F. et al. Yttrium-90 radioembolization for colorectal cancer liver metastases in KRAS wild-type and mutant patients: Clinical and ccfDNA studies. *Oncol Rep* 2017; 37(1): 57–65.

**143.** Zahrani A., Kandil M., Badar T., Abdelsalam M., Al-Faiar A., Ismail A. Clinico-pathological study of K-ras mutations in colorectal tumors in Saudi Arabia. *Tumori* 2014 ; 100 (1):75-9.

**144.** AL-Shamsi H.O., Jones J., Fahmawi Y., Dahbour I., Aziz Tabash A. et al. Molecular spectrum of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA, TP53, and APC somatic gene mutations in Arab patients with colorectal cancer: determination of frequency and distribution pattern. *J Gastrointest Oncol* 2016 ; 7(6): 882–902.

**145.** Hu J., Yan W.Y., Xie L., Cheng L., Yang M., Li L. et al. Coexistence of MSI with KRAS mutation is associated with worse prognosis in colorectal cancer. *Medicine (Baltimore)* 2016; 95(50): e5649.

**146.** Svrceka M., Cervera P., Hamelin R., Lascol O., Duval A. et Fléjou J-F. Cancer colorectal : les nouveaux rôles du pathologiste à l'ère de la biologie moléculaire et des thérapies « ciblées ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2010; 428 : 29–41.

**147.** Marchoudi N., Amrani Hassani Joutei H., Jouali F., Fekkak J. et Rhaissi H. Distribution of KRAS and BRAF mutations in Moroccan patients with advanced colorectal cancer. *Pathol Biol (Paris)* 2013; 61(6):273-6.

**148.** Zlobec I., Kovac M., Erzberger P., Molinari F., Bihl M.P. et al. Combined analysis of specific KRAS mutation, BRAF and microsatellite instability identifies prognostic subgroups of sporadic and hereditary colorectal cancer. *Int J Cancer* 2010 ;127(11):2569-75.

**149.** Akkiprik M., Celikel C.A., Düşünceli F., Sönmez O., Güllüoğlu B.M., Sav A. et al. Relationship between overexpression of ras p21 oncoprotein and K-ras codon 12 and 13 mutations in Turkish colorectal cancer patients. *Turk J Gastroenterol* 2008;19(1):22-7.

**150.** Li Z., Chen Y., Wang D., Wang G., L He, J Suo. (2012). Detections of KRAS Mutations and their association with clinopathological features and survival in Chinese colorectal

## **Références bibliographiques**

---

cancers patients. *The journal of International Medical Research* 2012; 40:1589-1598.

**151.** Moerkerk P., Arends J.W., Van Driel M., De Bruïne A., De Goeij A., Ten Kate J. Type and number of Ki-ras point mutations relate to stage of human colorectal cancer. *Cancer Res.* 1994; 54(13):3376-8.

**152.** Scott N., Sagar P., Stewart J., Blair G.E., Dixon M.F., Quirke P. p53 in colorectal cancer: clinicopathological correlation and prognostic significance. *Br J Cancer* 1991 ;63 :317-319.

**153.** Tortola S., Marcuello E., González I., Reyes G., Arribas R., Aiza G. et al .P53 and K-ras Gene Mutations Correlate with Tumor Aggressiveness but Are Not of Routine Prognostic Value in Colorectal Cancer.. *Journal of Clinical Oncology* 1999 ; 17 (5) 1375-1375.

**154.** Liu X., Maureen Jakubowski M.T., Jennifer L. Hunt. MD2 KRAS Gene Mutation in Colorectal Cancer Is Correlated With Increased Proliferation and Spontaneous Apoptosis. *Am J Clin Pathol* 2011; 135:245-252.

**155.** Samowitz W.S., Holden J.A., Curtin K., Edwards S.L., Walker A.R., Lin H.A., et al. Inverse relationship between microsatellite instability and K-ras and p53 gene alterations in colon cancer. *Am J Pathol* 2001; 158(4):1517-24.

**156.** Fujiwara T., Stolker J.M., Watanabe T., Rashid A., Longo P., Eshleman J.R. et al . Accumulated Clonal Genetic Alterations in Familial and Sporadic Colorectal Carcinomas with Widespread Instability in Microsatellite Sequences. *Am J Pathol* 1998; 153(4):1063-78.

### **Sites internet**

(<http://www.hydrocolon-naturopat.com/anatomie.html>).

Rapport Cancer 2015 de l'OMS : WHO ([www.who.int/healthinfo/en/](http://www.who.int/healthinfo/en/))

## **Annexe I**

### **Classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 7<sup>ème</sup> édition 2009)**

#### **1. Extension de la tumeur**

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

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

**T2** = Tumeur infiltrant la musculature sans la dépasser.

**T3** = Tumeur envahissant toute la paroi sans la dépasser.

**T4** = Tumeur dépassant la séreuse.

#### **2. Envahissement ganglionnaire (N)**

**N0** = Absence de métastase ganglionnaire régionale.

**N1** = Métastase dans un à trois ganglions régionaux.

- **N1a** = 1 ganglion envahi.

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

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

**N2** = Métastase dans 4 ganglions régionaux ou plus.

- **N2a** = 4 à 6 ganglions envahis.

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

**Nx** = Statut ganglionnaire inconnu.

#### **3. Métastases (M)**

**M0** = Absence de métastase.

**M1** = Présence de métastases à distance.

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

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

**Mx** = Statut métastatique inconnu.

## *Annexes*

**Tableau 30. Stades regroupés**

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

# Annexes

## Annexe II

### Matériels non biologiques

#### 1. Technique d'histopathologie

**Tableau 31.** Les réactifs utilisés dans l'histopathologie

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

#### Equipement médical

##### Petit matériel

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

Porte lame, Pince, Bistouri, Lame de dissection.

**Tableau 32.** Les appareillages utilisés dans l'histopathologie

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

## Annexes

### 2. Technique d'immunohistochimie

**Tableau 33.** Les réactifs utilisés dans l'immunohistochimie.

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

### Equipement médical

#### Petit matériel

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

**Tableau 34.** Les appareillages utilisés dans l'immunohistochimie.

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

## Annexes

### 3. Technique de la PCR en temps réel :

**Tableau 35** .Les appareillages et les kits utilisés dans la technique de la PCR en temps réel

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

#### Petit matériel

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

# Annexes

## Les kits du KRAS

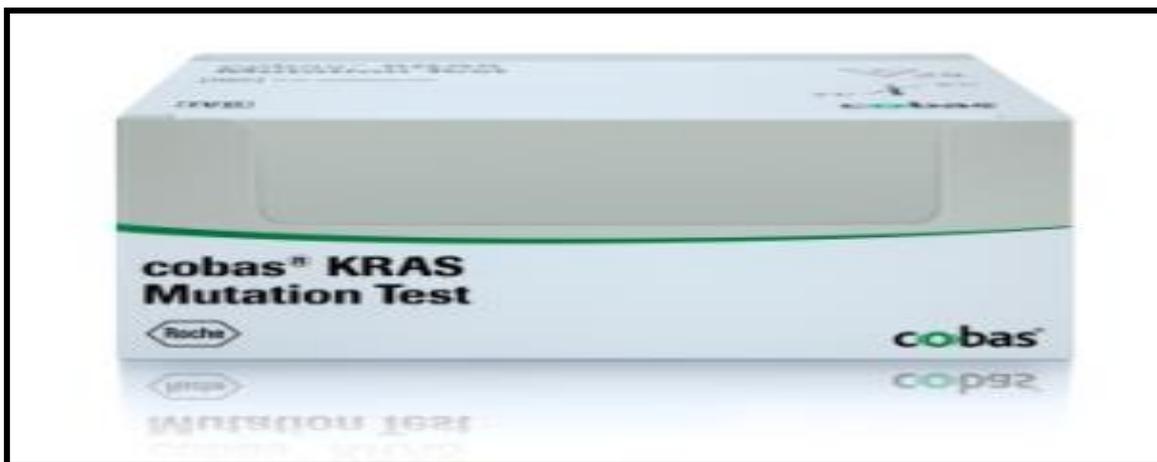
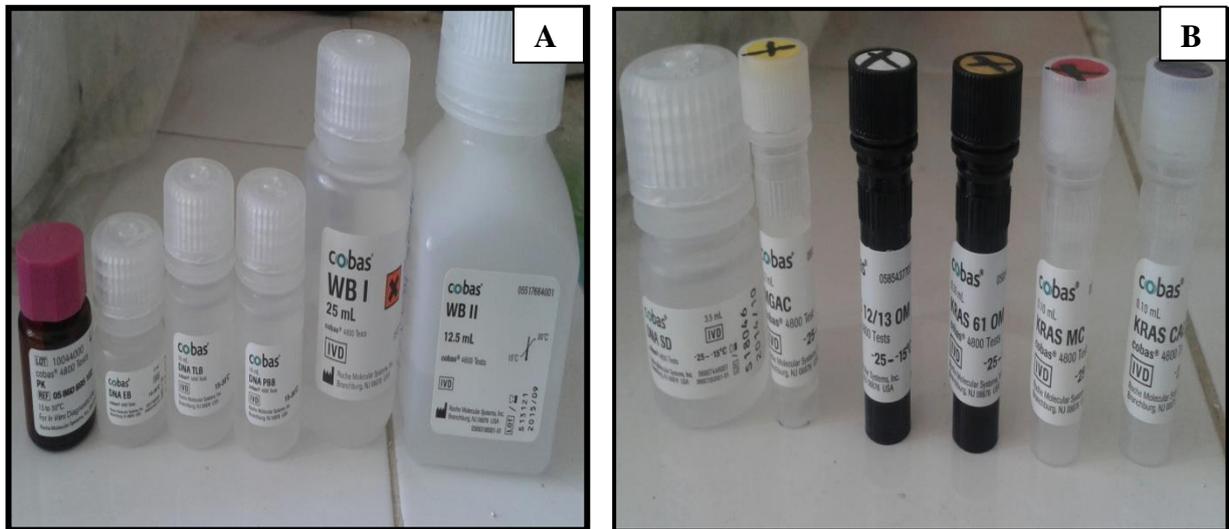


Figure 60. Les kits du KRAS

A .Kit d'extraction du l'ADN

B . Kit de détection des mutations

## Annexes

### Annexe III

**Tableau 36. Caractéristiques des patients**

N°	Sexe	Age (an)	Localisation	Type Histologique	Taille	Stade	Score P53	KRAS	MSH 2	MLH 1
1	F	33	Colon sigmoïde	ABD	6×5×3.5 cm	pT3 N1 M1	2	Mg12	+	+
2	F	59	Colon gauche	ABD	6.5×4.5 cm	pT3 N1 b M1	0	-	+	+
3	F	70	Colon sigmoïde	ABD	2.5×2.5 cm	pT3 N1 M1	1	M12/13	+	+
4	F	82	Colon droit	ABD	10 cm	pT3 N1 M0	0	M12/13	+	+
5	H	79	Rectum	ABD	7.5×5 cm	pT3 N2 a M0	5	Mg12	+	+
6	F	43	Rectum	ABD	1.5×1 cm	pT3 N2 b M1a	4	M12/13	-	-
7	F	75	Colon gauche	ABD	5×3.5 cm	pT3 N1a M1a	4	-	+	+
8	H	73	Colon sigmoïde	ABD	3.5 cm	pT3 N1b M1	5	Mg12	+	+
9	F	64	Rectum	ABD	5×3.5 cm	pT3 N1a M1a	5	Mg61	+	-
10	F	71	Colon droit	ABD	12×1 cm	pT3 N0 M1	5	Mg12/13	+	+
11	F	46	Recto-sigmoïdien	ABD	3.5×3.5 cm	pT1 N1 M1	4	M117	+	+
12	F	54	Rectum	ABD	4 cm	pT3 N2 M1a	2	-	+	-
13	H	57	Rectum	AMD	4×4cm	pT3 N1 Mx	1	MG13	+	-
14	H	74	Récto-sigmoïde	AB	Entre 13 à 2cm	pT3 N1 a Mx	3	-	+	+
15	H	60	Colon-foie	ABD	4×4×3,5 cm	/	0	-	-	+
16	H	77	Colon gauche	AMD	4.5×4×0.5 cm	/	5	MG12	+	+
17	F	39	Sigmoïde	ABD	5,5×4cm	pT3 N1 Mx	5	-	+	+

## Annexes

18	F	32	Rectum	ABD	5,5×5 cm	pT3 N2 a M0	5	MG 12	+	+
19	H	29	Recto-sigmoïde	AB	1.5×1 cm	pT4 N0 Mx	0	MG 12	-	+
20	H	57	Recto-sigmoïde	ABD	4×2,5 cm	pT3 N0Mx	5	-	-	+
21	H	54	Recto-sigmoïde	AMD	3,5×3×2cm	pT3 N2bM1a	5	-	-	+
22	H	60	Foie	APD	0,9 ×0,5cm /1,8×0,5cm	/	5	-	-	-
23	H	28	rectum	A Colloïde	/	/	0	-	-	+
24	H	61	Colon droit	AMD	2×1cm	pT3 N1Mx	3	-	-	-
25	F	46	Sigmoïde	ABD	6×4 cm	pT3 N2BbM0	5	-	+	+
26	F	76	Colon gauche	ABD	4×3.5 cm	pT3 N1 M1	5	-	-	+
27	F	37	Abdomino- périnéale	AB	3×4×2 cm	PT3N0Mx		-	-	-
28	F	47	Colon droit	Carcino me colloïde	5×4 cm/ 24 × 23×14mm/1 cm	pT4 N0 M1b	0	MG 12	-	-
29	F	37	Ovaire	/	/	/	0	-	-	+
30	F	52	Recto-sigmoïde	AMD plage de colloïde	4×3cm	pT3 N2abMx	3	-	-	+
31	H	56	Colon gauche	ABD	6×4cm/cm	pT4 N2aMx	0	MG 13	-	+
32	F	41	Ovaire-Utérus	/	/	/	2	MG	-	+

## Annexes

								12		
33	H	77	Recto-sigmoïde	ABD	/	PT2N1Mx	5	-	+	+
34	H	52	Abdomino-périnéale	AB à MD	3×4×2cm	pT3 N0 M1	5	/	+	+
35	H	47	Péritoine/grêlo-colique	/	3×2cm /2×1,8cm	pT3 N1 b M1	2	/	-	+
36	H	63	Colon droit	AMD et colloïde	Entre 9cm- 15cm	pT3 N1 a M0	4	/	+	+
37	H	62	Bas-Rectum	ABD	3.5 ×3 cm	pT3 N0M0	4	/	+	+
38	F	60	Colon-Foie	AB	2×1et 3×2et 1×1cm	pT3 N1 M1a	1	/	+	-
39	H	64	Iléo- Colique droite	AMD	35× 30 mm	pT4 N1 b Mx	5	/	+	+
40	H	51	Colon droit	AP	10cm	pT3 N1 Mx	5	/	+	/
41	H	52	Rectum	AMD	7 cm	pT3 N2b Mx	4	/	+	+
42	F	51	Foie-gauche		2,5×18mm et 6mmet16m m	pT3 N1 M0	4	/	+	-
43	H	56	Colon sigmoïde	ABD	3.5 cm	pT3 N1 c M0	4	/	+	-
44	F	57	Rectum	AMD	7.4 cm	pT3 N1 M0	5	/	+	+
45	F	43	Recto-sigmoïdien	ABD	2.5×2 cm	pT3 N1 M0 R0	3	/	+	+
46	F	31	Colon sigmoïde	AMD	5×3 cm	pT4 N2b M1	5	/	+	+
47	H	72	Colon droit	ABD	6.5×5cm	pT3 N1b M0	4	/	+	+
48	F	62	Rectum	ABD	4×3.5 cm	pT3 N1 M1	2	/	+	+
49	F	46	Recto-sigmoïdien	ABD	3.5×3.5 cm	pT1 N1 M0	4	/	+	+
50	H	55	Recto-	ABD	7 cm	pT4a N2a	2	/	+	+

## Annexes

			sigmoïdien			M0				
51	F	41	Recto-sigmoïdien	ABD	3×2.5 cm	pT3 N2a M0	2	/	+	+
52	H	77	Colon droit	ABD	4 cm	pT3 N1 M0	0	/	+	+
53	H	83	Rectum	ABD	6×3.5 cm	pT3 N2 b M0	0	/	/	/
54	H	51	Colon sigmoïde	ABD	5 cm	pT2 N1 a M0	0	/	/	/
55	F	70	Colon droit	ABD	3.6×3.5 cm	pT2 N1 B M0	3	/	/	/
56	H	77	Colon gauche	ABD	4 cm	pT3 N1 c M0	5	/	/	/
57	F	68	Rectum	ABD	4.5×4×0.5 cm	pT3 N2 a M0	5	/	/	/
58	H	61	Colon gauche	ABD	6×6 cm	pT3 N1 b M0	4	/	/	/
59	H	43	Rectum	ABD	12×1.5 cm	pT3 Nb1 M0	2	/	/	/
60	H	71	Colon sigmoïde	ABD	2×2.5 cm	pT3 N1 M0	4	/	/	/

## Annexes

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

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

# Annexes

## Annexe IV



**Figure 61. Automate de circulation**



**Figure 62. Enrobage des tissus par la paraffine**



**Figure 63. Remplissage des moules sur la plaque froide**



**Figure 64. Les blocs de paraffine enrobant le prélèvement**



**Figure 65. Confection des coupes de 3 microns au microtome**



**Figure 66. L'étalement du ruban sur la lame**



**Figure 67. Automate de coloration**



**Figure 68. Lame HE montée**

## Annexes

### Annexe V

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

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

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

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

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

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

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

A. Si les concentrations du stock d'ADN sont > 28 ng/μL, utiliser la formule suivante pour calculer la quantité de diluant d'échantillon d'ADN (DNA SD) nécessaire pour préparer au moins 70 μL de stock d'ADN dilué. Cela permet d'assurer que chaque échantillon utilise un minimum de 5 μL de stock d'ADN.

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

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

Tableau 37 .Les calculs de la dilution du stock d'ADN de l'échantillon

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

Tableau 38 .Volumes de réactifs nécessaires pour les mélanges réactionnels actifs MMX

## Annexes

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

**Tableau 39.**Disposition de la plaque d'échantillons

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

**Tableau 40.**Caractéristiques des 11 patients atteints le CCRm.

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

# Annexes

## Annexe VI

### Les appareillages utilisés



**Microtome**



**Etuve**



**Bain marie**



**Micro-centrifugeuse**



**Spectrophotomètre Nanodrop**



**PCR en temps réel (Cobas z 480)**



**Analyseur (Cobas z 480)**

# Résumé

---

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité par cancer en Algérie. Notre étude a porté sur une série rétrospective de 60 cas de CCR colligés au niveau du service d'Anatomie pathologique de CPMC (Alger). L'âge moyen est de 56,87 ans et le sex-ratio de 1,07. Les adénocarcinomes bien différenciés sont prédominants et les cancers étaient essentiellement diagnostiqués à des stades avancés : Stade III (55,52%) et IV (38,89%).

Des données récentes mettent en évidence la valeur pronostique et prédictive potentielle des altérations du K-RAS et des MSI chez les patients atteints de CCR. Le but de cette étude est de caractériser les profils d'expressions clinico-pathologiques, histo-morphologiques de p53, EGFR, MLH1 et MSH2, des cancers colorectaux KRAS mutés et de déterminer leurs impacts sur l'orientation de la chimiothérapie adjuvante et de la thérapie ciblée.

L'analyse immunohistochimique de l'instabilité des microsatellites (MSI), p53 et EGFR a été réalisée sur des échantillons de CCR. L'extinction des protéines MMR est présente dans 21,15 % et 25 % cas pour MLH1 et MSH2, respectivement. Aucune corrélation significative n'a été révélée entre l'expression des deux biomarqueurs et le sexe, l'âge, l'histologie, la localisation tumorale, et le stade pTNM, ( $p > 0,05$ ) sauf celle trouvée entre MLH1 et le type histologique peu différencié et mucineux ( $p < 0,05$ ).

La p53 et l'EGFR sont exprimés respectivement dans 76,67 % et 73,33% des cas étudiés. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation significative entre ces deux marqueurs et les différents paramètres anatomo-pathologiques ( $p > 0,05$ ). Toutefois, la corrélation inverse entre p53 et les MSI n'a pas été signalée.

En outre, une évaluation complète de la mutation de K-RAS a été réalisée pour tous nos cas du CCR par PCR en temps réel avec leurs caractéristiques clinico-pathologiques spécifiques. Cette mutation est retrouvée chez 48,48% des cas métastatiques. Ce résultat est concordant avec ceux de littérature. La mutation K-RAS n'a pas été associée avec l'un des différents paramètres clinico-pathologiques étudiés. Les patients portants cette mutation KRAS ne bénéficieront pas d'une thérapie ciblée.

**Mots clés :** Cancer colorectal, Immunohistochimie, PCR en temps réel, p53, EGFR, KRAS, MSI, MLH1, MSH2, MMR.

# *Sammury*

---

Colorectal cancer (CRC) is one of the major causes of morbidity and cancer mortality in Algeria. Our study focused on a retrospective series of 60 cases of CRC collected at Pathological Department CPMC (Algiers); the average age is 56.87 years and sex-ratio = 1.07. Well-differentiated adenocarcinomas predominate and cancer was evaluated in advanced stages III (55.52%) and IV (38.89%).

Recent data highlight the potential prognosis and predictive value of K-RAS and MSI alterations in patients with CRC. The purpose of this study was to characterize the expression profiles clinicopathological and histomorphological p53 protein, EGFR, MLH1 and MSH2 and KRAS mutated CRC and to determine their impact on performing adjuvant chemotherapy and targeted therapy.

However, Immunohistochemical analysis for microsatellite instability (MSI), p53 and EGFR was performed on samples of CCR. The extinction of the MMR proteins is present in 21.15% and 25% cases for MLH1 and MSH2, respectively. No significant correlation was revealed between the expression of both biomarkers and sex, age, histology, tumor location, and stage pTNM ( $p > 0.05$ ) except that found between MLH1 and histological type poorly differentiated and mucinous ( $p < 0.05$ ). Our results are similar to those reported in the literature.

P53 and EGFR expressed in 76.67% and 73.33% of the cases studied, respectively. We haven't noticed a significant correlation between the two and the different pathological parameters ( $p > 0.05$ ). This corresponds to other literature data. Indeed, the inverse correlation between p53 and the MSI was not reported.

In addition, a full assessment of the K-RAS mutation by real-time PCR, and their clinicopathological specific characteristics. This mutation was found in 48.48% of metastatic cases. This result is consistent with those of literature. KRAS mutations were not associated with any of the different pathological parameters studied. The healthy patients in this KRAS mutation will not benefit from targeted therapy.

**Keywords:** Colorectal cancer, Immunohistochemistry, real-time PCR, p53, EGFR, KRAS, MSI, MLH1, MSH2,MMR.

## ملخص

يعتبر سرطان القولون و المستقيم (CCR) أحد الأسباب الممرضة و المؤدية للوفاة بالسرطان في الجزائر . ركزت دراستنا على سلسلة متكونة من 60 حالة من (CCR) التي تم جمعها في مخبر التشريح المرضي CPMC (الجزائر العاصمة) حيث بلغ متوسط العمر 56.87 عاما مع نسبة الجنس = 1.07. تشكل الأورام الغدية الخبيثة و المتميزة جيدا الأغلبية وجرى تقييم السرطان في مراحل متقدمة III (55.52٪) و VI (38.89٪).

تسلط البيانات الحديثة الضوء على القيمة الإنذارية و التنبؤية المحتملة لتغيرات KRAS و MSI لدى المرضى المصابين بسرطان القولون و المستقيم .وكان الغرض من هذه الدراسة إلى تحديد خصائص النواتج و المتغيرات الإكلينيكية و المورفولوجية و النسجية للبروتينات p53، EGFR، MLH1 و MSH2 و العامل الجيني KRAS و تحديد تأثيرها على تحديد العلاج الكيميائي المساعد و العلاج المستهدف .

لقد حاولنا في دراستنا تقييم تعبير عوامل التنبؤ MSI و p53 و EGFR بواسطة الكشف المناعي النسيجي الكيميائي .بروتينات MMR كانت سلبية في 21.15٪ و 25٪ من الحالات بالنسبة ل MLH1 و MSH2، على التوالي .إن الدراسة الإحصائية كشفت أنه لا توجد أي صلة ملحوظة بين التعبير لهذين العاملين التنبؤيين مع الجنس ، السن ، موقع المرض و درجة تطوره ( $p > 0.05$ ) ، إلا تلك الموجودة بين MLH1 و النوع النسيجي ضعيف التباين و المخاطي و هناك دراسات تماثل نتائج دراستنا.

p53 و EGFR معبرتين في 76.67٪ و 73.33٪ من الحالات التي تمت دراستها، على التوالي .لم نلاحظ وجود صلة إحصائية ملحوظة بين هاذين العاملين و المعايير التشريحية و الباثولوجية المختلفة ( $P > 0.05$ ) . وهذا يتوافق مع بيانات المراجع الأخرى .في الواقع، لم يتم العثور على علاقة عكسية بين p53 و MSI.

وبالإضافة إلى ذلك ،تم إجراء تقييم كامل للطفرة K-RAS بواسطة البحث الجزيئي PCR في الوقت الحقيقي ، و الخصائص الإكلينيكية الخاصة بها. تم العثور على هذه الطفرة في 48.48٪ من الحالات .هذه النتيجة تتفق مع تلك الموجودة في المراجع .لم يرتبط وجود هذه الطفرة KRAS مع أي من الصفات المدروسة .فإن المرضى الحاملين لهذه الطفرة KRAS لن يستفيدوا من العلاج المستهدف.

**كلمات البحث:** سرطان القولون و المستقيم، المناعية، PCR في الوقت الحقيقي ، البروتين p53 ، EGFR ، KRAS ، MSI ، MLH1 ، MSH2 ، MMR.

## Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité par cancer en Algérie. Notre étude a porté sur une série rétrospective de 60 cas de CCR colligés au niveau du service d'Anatomie pathologique de CPMC (Alger). L'âge moyen est de 56,87 ans et le sex-ratio de 1,07. Les adénocarcinomes bien différenciés sont prédominants et les cancers étaient essentiellement diagnostiqués à des stades avancés : Stade III (55,52%) et IV (38,89%).

Des données récentes mettent en évidence la valeur pronostique et prédictive potentielle des altérations du K-RAS et des MSI chez les patients atteints de CCR. Le but de cette étude est de caractériser les profils d'expressions clinico-pathologiques, histo-morphologiques de p53, EGFR, MLH1 et MSH2, des cancers colorectaux KRAS mutés et de déterminer leurs impacts sur l'orientation de la chimiothérapie adjuvante et de la thérapie ciblée.

L'analyse immunohistochimique de l'instabilité des microsatellites (MSI), p53 et EGFR a été réalisée sur des échantillons de CCR. L'extinction des protéines MMR est présente dans 21,15 % et 25 % cas pour MLH1 et MSH2, respectivement. Aucune corrélation significative n'a été révélée entre l'expression des deux biomarqueurs et le sexe, l'âge, l'histologie, la localisation tumorale, et le stade pTNM, ( $p > 0,05$ ) sauf celle trouvée entre MLH1 et le type histologique peu différencié et mucineux ( $p < 0,05$ ).

La p53 et l'EGFR sont exprimés respectivement dans 76,67 % et 73,33% des cas étudiés. Nous n'avons pas retrouvé de corrélation significative entre ces deux marqueurs et les différents paramètres anatomo-pathologiques ( $p > 0,05$ ). Toutefois, la corrélation inverse entre p53 et les MSI n'a pas été signalée.

En outre, une évaluation complète de la mutation de K-RAS a été réalisée pour tous nos cas du CCR par PCR en temps réel avec leurs caractéristiques clinico-pathologiques spécifiques. Cette mutation est retrouvée chez 48,48% des cas métastatiques. Ce résultat est concordant avec ceux de littérature. La mutation K-RAS n'a pas été associée avec l'un des différents paramètres clinico-pathologiques étudiés. Les patients portants cette mutation KRAS ne bénéficieront pas d'une thérapie ciblée.

**Mots clés : Cancer colorectal, Immunohistochimie, PCR en temps réel, p53, EGFR, KRAS, MSI, MLH1, MSH2, MMR.**

## Summary

Colorectal cancer (CRC) is one of the major causes of morbidity and cancer mortality in Algeria. Our study focused on a retrospective series of 60 cases of CRC collected at Pathological Department CPMC (Algiers); the average age is 56.87 years and sex-ratio = 1.07. Well-differentiated adenocarcinomas predominate and cancer was evaluated in advanced stages III (55.52%) and IV (38.89%).

Recent data highlight the potential prognosis and predictive value of K-RAS and MSI alterations in patients with CRC. The purpose of this study was to characterize the expression profiles clinicopathological and histomorphological p53 protein, EGFR, MLH1 and MSH2 and KRAS mutated CRC and to determine their impact on performing adjuvant chemotherapy and targeted therapy.

However, Immunohistochemical analysis for microsatellite instability (MSI), p53 and EGFR was performed on samples of CCR. The extinction of the MMR proteins is present in 21.15% and 25% cases for MLH1 and MSH2, respectively. No significant correlation was revealed between the expression of both biomarkers and sex, age, histology, tumor location, and stage pTNM ( $p > 0.05$ ) except that found between MLH1 and histological type poorly differentiated and mucinous ( $p < 0.05$ ). Our results are similar to those reported in the literature.

P53 and EGFR expressed in 76.67% and 73.33% of the cases studied, respectively. We haven't noticed a significant correlation between the two and the different pathological parameters ( $p > 0.05$ ). This corresponds to other literature data. Indeed, the inverse correlation between p53 and the MSI was not reported.

In addition, a full assessment of the K-RAS mutation by real-time PCR, and their clinicopathological specific characteristics. This mutation was found in 48.48% of metastatic cases. This result is consistent with those of literature. KRAS mutations were not associated with any of the different pathological parameters studied. The healthy patients in this KRAS mutation will not benefit from targeted therapy.

**Keywords: Colorectal cancer, Immunohistochemistry, real-time PCR, p53, EGFR, KRAS, MSI, MLH1, MSH2, MMR**