

République algérienne démocratique et populaire
Ministère de l'enseignement supérieur 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

Numéro d'ordre.....

Séries.....



THESE

En vue de l'obtention du diplôme de doctorat en science

Option : Biologie appliquée

Présentée par : ARIECH Cherifa

THEME

**Biomarqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux thérapies ciblées
et immunothérapies dans les cancers colorectaux métastatiques chez les
patients algériens**

Jury

Président	BENBELAID Fethi	Dr.,MCA	Université de Mohamed Khider, Biskra
Promotrice	AMIR Zine-Charaf	Professeur	Université d'Alger 1
Examinatrices	TERKMANI Fella	Professeur	Université d'Alger 1
	REDOUANE SALAH Sara	Professeur	Université de Mohamed Khider ,Biskra
	MOULAI Nabila	Dr.,MCA	Université de Saad Dahlab, Blida

- Année Universitaire : 2024/2025 -

Remerciements

Je remercie tout particulièrement **Madame le Pr AMIR Zine Charaf**, pour la confiance qu'elle m'a accordé en m'accueillant au sein de son service pour un encadrement en thèse de doctorat, en m'assurant un suivi rigoureux et en m'offrant un soutien remarquable.

Je la remercie également pour l'éveil de l'intérêt à la recherche scientifique qu'elle a suscité en moi.

Je tiens à remercier **Monsieur le Dr BENBELAID Fethi**, de l'université de Biskra, qui me fait l'honneur de présider le jury de ma thèse. Veuillez accepter l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Je remercie vivement les examinatrices d'avoir accepté d'être membre de mon jury de thèse et d'évaluer mon travail. J'en suis honorée. Veuillez recevoir l'expression de ma sincère reconnaissance :

- **Madame le Pr TERKMANI Fella**, de l'université d'Alger 1.
- **Madame le Pr REDOUANE SALAH Sara**, de l'université de Biskra.
- **Madame le Dr MOULAI Nabila**, de l'université de Blida.

Je tiens à remercier vivement **feu Monsieur le Pr BOUZID Kamel** Ex Chef de Service d'Oncologie Médicale pour m'avoir accueilli au sein de son service à l'EHS Pierre et Marie Curie (CPMC) et de son laboratoire d'Oncologie Moléculaire Fondamentale et Appliquée (L.O.M.F.A).

Je tiens à remercier en particulier **Madame le Pr HANNACHI Leila** ainsi que l'ensemble des médecins et des praticiens exerçants au sein du service « d'Anatomie et Cytologie Pathologique » du CHU Mustapha sous la direction de madame le **Pr AMIR Zine Charaf** pour l'aide qu'ils m'avaient apporté.

Je n'oublie pas de remercier vivement **feu Professeur BOUTARFAIA Ahmed** pour m'avoir aidé et encouragé à m'inscrire en thèse de doctorat et pour m'engager dans une carrière de chercheuse.

Comme je n'oublie pas de remercier mes parents, mes frères et mes amies pour leur généreux soutien et pour leur support dans les moments difficiles.

Enfin, je dis : merci maman pour ta présence à mes côtés, pour ta patience et ta tendresse et ton soutien quotidien et merci à vous mes amies Nadia, Amel, Sabrina, Wissam, Fatiha, Ikram, Fadila, Assia, Khalida et Ibtissem.

ملخص

يعد سرطان القولون والمستقيم (CRC) ثاني أكثر أنواع السرطان شيوعًا في الجزائر وأحد أكثر أنواع السرطان شيوعًا في العالم، بفضل علم التحليل الجزيئي، تم تحسين العلاج في عصر الطب التشخيصي. تعتبر الطفرات KRAS، NRAS و BRAF محورًا لشبكة من المؤشرات الحيوية الإنذارية والتنبئية للاستجابة للعلاجات المستهدفة. ويركز عملنا على تحليل البروفایل الطفري للجينات KRAS، NRAS و BRAF ودراسة علاقتها مع السمات السريرية والباثولوجية للمرضى الذين يعانون من سرطان القولون والمستقيم النقيلي.

تم تقييم حالة جينات KRAS، NRAS و BRAF بواسطة PCR في الوقت الحقيقي (على جهاز Idylla و Sacace). تم تقييم dMMR أو MSI بواسطة التقنية الكيميائية المناعية. تم تحليل جميع حالات الاختبارات الإحصائية باستخدام برنامج XLSTAT (الإصدار 2016.02.28451).

تم تحديد وجود طفرات KRAS، NRAS و BRAF في 48.7 %، 5.54 % و 7.19 % من الحالات التي تم اختبارها، كانت الأنواع الفرعية لطفرة KRAS الأكثر شيوعًا هي الطفرات G12D و G12V و G13D. كانت طفرات KRAS و BRAF أكثر انتشارًا عند كبار السن ($P = 0.004$ مقابل $P = 0.04$)، وترتبط هذه الطفرات بالنوع النسيجي جيد التمايز ($P = 0.001$ مقابل $P = 0.02$). وبالإضافة إلى ذلك، لاحظنا أن طفرات BRAF تتمركز بشكل رئيسي في القولون الأيمن (قيمة الاحتمال < 0.0001). بينما طفرات KRAS تتمركز أكثر في القولون الأيسر ($p = 0.018$) من ناحية أخرى، لم يتم الكشف عن أي علاقة بين طفرات NRAS وحالة MSI وخصائص المريض المحددة.

تتوافق نسبة طفرات KRAS، NRAS و BRAF مع بيانات الدراسات السابقة. إن الفهم الأفضل للتحليل الجيني سيسمح لنا بتحديد المؤشرات الحيوية التنبئية والإنذارية التي يمكن أن تساعد أطباء الأورام في اختيار العلاجات المستهدفة الأكثر ملاءمة للمرضى المصابين بسرطان القولون والمستقيم. يبدو أن حدوث طفرات KRAS خارج exon 2 أعلى قيمة مقارنة بالمراجع المنشورة.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم، الكيمياء المناعية، PCR في الوقت الحقيقي، KRAS، NRAS، BRAF، MSI.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est le 2^{ème} cancer le plus fréquent en Algérie est l'un des plus répandus dans le monde. Grâce à l'épidémiologie moléculaire, le traitement du CCR a été amélioré à l'ère de la médecine personnalisée. Les mutations de KRAS, NRAS et BRAF sont considérées comme des pivots d'un réseau de biomarqueurs pronostiques et prédictifs de réponse aux thérapies ciblées. Notre travail porte sur l'analyse du profil mutationnel des gènes KRAS, NRAS et BRAF et leur corrélation avec les caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints de cancer colorectal métastatique.

Le statut des gènes KRAS, NRAS et BRAF a été évalué par PCR en temps réel (sur les automates Idylla et Sacace). Le statut dMMR ou MSI a été analysé par technique immunohistochimique. Tous les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2016.02.28451).

La présence des mutations KRAS, NRAS et BRAF a été identifiée chez 48,7%, 5,54% et 7,19% des cas testés, respectivement. Les sous-types de mutations KRAS les plus fréquents sont G12D, G12V, G13D. Les mutations KRAS et BRAF étaient fréquentes chez les sujets âgés ($p=0,004$ vs $p=0,04$). Ces mutations sont associées au type histologique bien différencié ($p=0,001$ vs $p=0,02$). De plus nous avons observé que les mutations BRAF sont principalement localisées dans le côlon droit ($p>0,0001$). Cependant, les tumeurs situées dans le côlon gauche présentaient une fréquence de mutations KRAS plus élevée que celles du côlon droit ($p=0,018$). En revanche, aucune significativité n'a été trouvée entre les mutations NRAS, le statut des MSI et les caractéristiques spécifiques des patients.

La proportion des mutations KRAS, NRAS et BRAF observée est conforme aux données de la littérature. Une meilleure compréhension de l'analyse génétique nous permettrait de définir des biomarqueurs prédictifs et pronostiques ce qui aiderait les oncologues à choisir les thérapies ciblées les plus adaptées aux patients atteints du cancer colorectal. L'incidence des mutations KRAS en dehors de l'exon 2 semble plus élevée par rapport aux références publiées.

Mots clés : cancer colorectal, immunohistochimique, PCR en temps réel, KRAS, NRAS, BRAF, MSI.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the 2nd second most common cancer in Algeria and one of the most prevalent cancers worldwide. Thanks to molecular epidemiology, treatment has been significantly improved in the era of personalized medicine. Mutations in the KRAS, NRAS, and BRAF genes are considered pivotal in a network of prognostic and predictive biomarkers for response to targeted therapies. Our work focuses on analyzing the mutational profiles of the KRAS, NRAS, and BRAF genes and correlating them with the clinicopathological characteristics of patients with metastatic colorectal cancer.

The status of the KRAS, NRAS, and BRAF genes was assessed by real-time PCR using the Idylla and Sacace platforms. The dMMR or MSI status was analyzed using immunohistochemistry. All statistical tests were evaluated performed using XLSTAT software (version 2016.02.28451).

The presence of KRAS, NRAS and BRAF mutations was identified in 48.7%, 5.54% and 7.19% of the cases tested, respectively. The most common KRAS mutation subtypes were G12D, G12V, G13D. KRAS and BRAF mutations were more frequent in elderly subjects ($p=0.004$ vs $p=0.04$). These mutations were associated with the well-differentiated histological type ($p=0.001$ vs $p=0.02$). Additionally, we observed that BRAF mutations were primarily localized in the right colon ($p>0.0001$). However, tumors located in the left colon had a higher frequency of KRAS mutations than those in the right colon ($p=0.018$). On the other hand, no significant correlation was found between NRAS mutations, MSI status and specific patient characteristics.

The prevalence of KRAS, NRAS and BRAF mutations observed was consistent with literature data. A better understanding of genetic analysis could allow us to define predictive and prognostic biomarkers helping oncologists choose in selecting the most suitable targeted therapies for colorectal cancer patients. The incidence of KRAS mutations outside exon 2 appears to be higher compared to published references.

Key words: colorectal cancer, immunohistochemistry, real-time PCR, KRAS, NRAS, BRAF, MSI.

Table des matières

Liste d'abréviation	I
Liste de figures	II
Liste de tableaux	III
Introduction.....	1
Chapitre 1 . Etude bibliographique	
1.1 Epidémiologie	5
1.2 Anatomie du côlon et du rectum	6
1.2.1 Macroscopie	6
1.2.2 Histologie	7
1.2.2.1 Histologie du côlon	7
1.2.2.2 Structure et organisation des cryptes Coliques.....	8
1.3 La Pathogenèse du cancer colorectal	9
1.3.1 La voie « classique » de la séquence adénome-carcinome.	10
1.3.2 Altérations moléculaires dans la séquence adénome-carcinome	12
1.3.2.1 L'instabilité chromosomique (CIN)	12
1.3.2.1.1 Le gène APC.....	13
1.3.2.1.2 Le gène TP53.....	14
1.3.2.1.3 Le gène TGF-B.....	14
1.3.2.1.4 Le gène RAS	15
1.3.2.1.4.1 Structure moléculaire du gène KRAS	15
1.3.2.1.4.2 Les mutations de KRAS	15
1.3.2.1.4.3 La fonction de KRAS	16
1.3.2.1.5 Les gènes PI3K/AKT	17
1.3.2.1.6 Le gène PTEN	18
1.3.2.1.7 Le gène BRAF.....	18
1.3.2.1.7.1 Le rôle oncogénique de la protéine BRAF.....	18
1.3.2.1.7.2 La mutation BRAF V600E : définition et prévalence.....	19
1.3.2.2 La voie d'instabilité des microsatellites	19
1.3.2.2.1 Définition	19
1.3.2.2.2 Le système de réparation des mésappariements d'ADN (MMR).....	20
1.3.3 La voie festonnée /CIMP : séquence d'adénome festonné a carcinome	21
1.3.3.1 Caractéristiques histopathologiques et endoscopiques des lésions colorectales festonnées.....	22
1.3.3.2 Altérations moléculaires dans la séquence d'adénome festonné a carcinome	23
1.4 Les facteurs de risque de cancer colorectal	24
1.4.1 L'âge.....	24
1.4.2 Les antécédents familiaux	24
1.4.3 Le diabète sucré.....	24
1.4.4 L'obésité	24
1.4.5 Le régime alimentaire.....	25
1.4.6 La consommation d'alcool et de tabac.....	25
1.4.7 L'aspirine et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)	25
1.4.8 L'inactivité physique	25
1.4.9 Le genre et les facteurs socioéconomiques	25
1.5 La classification du cancer colorectal	26
1.5.1 La classification traditionnelle TNM du cancer colorectal	26
1.5.2 La nouvelle classification consensuelle des sous-types moléculaires.....	27

1.6	Traitement du cancer colorectal métastatique	29
1.6.1	La Chirurgie	29
1.6.2	La Radiothérapie	30
1.6.3	La Chimiothérapie.....	30
1.6.4	La Thérapie ciblée	30
1.6.4.1	Les anti-EGFRS	31
1.6.4.1.1	Mécanisme Moléculaire de la signalisation EGFR	31
1.6.4.1.2	Cétuximab et panitumumab	31
1.6.4.2	Les anti-VEGFR.....	32
1.6.4.2.1	Mécanisme moléculaire de la signalisation VEGF/VEGFR	32
1.6.4.2.2	Bévacizumab	32
1.6.4.2.3	Ramucirumab	32
1.6.5	Immunothérapie	33
1.6.6	Les facteurs prédictifs de l'efficacité des agents ANTI-EGFR	34
1.6.6.1	Les mutations KRAS et NRAS	34
1.6.6.2	La mutation PIK3CA et PTEN.....	34
1.6.6.3	Les mutations activatrices HER2, HER3 ou MET et HER2	34
1.7	Considérations générales sur le traitement basé sur des biomarqueurs moléculaires prédictifs et pronostiques	34
1.7.1	RAS	35
1.7.2	BRAF	35
1.7.3	MMRD/MSI-H.....	35

Chapitre 2 . Matériel et méthodes

2.1	Matériel	37
2.2	Méthodes	38
2.2.1	Histopathologie	38
2.2.1.1	La Macroscopie	38
2.2.1.2	Les étapes de l'examen microscopique	38
2.2.1.3	La coloration a l'hématoxyline – eosine (HE)	40
2.2.2	Immunohistochimie.....	41
2.2.2.1	Procédure de l'immun-détection de MLH1, MSH2, MSH3 et PMS2	42
2.2.3	Le test moléculaire	43
2.2.3.1	Recherche de mutations par Idylla	43
2.2.3.2	Recherche de mutation par RT-PCR (Sacace).....	44
2.2.4	Analyse statistique.....	48

Chapitre 3 . Résultats

3.1	Histopathologie et caractéristiques des patients.....	50
3.1.1	Répartition des cas de CCR selon le sexe	50
3.1.2	Répartition des patients selon l'âge.....	50
3.1.3	Répartitions des cas de CCR en fonction de la localisation tumorale.....	51
3.1.4	Répartition des cas de CCR en fonction du grade de différenciation	52
3.1.5	Distribution des cas de CCR selon le stade.....	53
3.2	Etude de l'histopathologie des tumeurs	53
3.2.1	L'examen macroscopique.....	53
3.2.2	Examen microscopique	54
3.2.2.1	Les différents sous-types histologiques du cancer colorectal	55
3.3	Etude immunohistochimique de MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2.....	56
3.3.1	Immunodétection de MLH1	57
3.3.2	Immunodétection de MSH2	58

3.3.3	Immunodétection de MSH6	59
3.3.4	Immunodétection de PMS2	60
3.3.5	L'analyse immunohistochimique du statut MMR	61
3.3.6	Corrélation des protéines du système MMR avec les caractéristiques clinicopathologiques des patients et les différentes mutations.....	62
3.3.6.1	Etude de la corrélation entre les protéines du système MMR et le sexe	62
3.3.6.2	Etude de la corrélation entre l'âge et les protéines du système MMR.....	63
3.3.6.3	Etude de la corrélation entre le site tumoral et l'expression des protéines du système MMR	64
3.3.6.4	Etude de la corrélation entre l'expression des protéines du système MMR et le grade de différenciation	65
3.3.6.5	Corrélation du stade tumoral avec le statut MSI ou MSS	66
3.4	Détection des mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF par PCR en temps réel	67
3.4.1	Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF	67
3.4.2	Corrélation des RAS et BRAF avec les caractéristiques clinicopathologiques des patients	69
3.4.2.1	Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF en fonction du sexe	70
3.4.2.2	Evaluation des statuts RAS et BRAF en fonction de l'âge	71
3.4.2.3	Etude de la relation entre le site tumoral et les statuts mutationnels KRAS, NRAS et BRAF	71
3.4.2.4	Corrélation entre le type histologique et les statuts KRAS, NRAS et BRAF ..	73
3.4.2.5	Corrélation entre le stade et les statuts KRAS, NRAS et BRAF.....	74
3.4.3	Evaluation des relations entre le statut KRAS et les statuts NRAS et BRAF	75
3.4.4	Corrélation du statut NRAS avec le statut BRAF	77

Chapitre 4 . Discussion

4.1	Discussion	79
4.1.1	Les caractéristiques clinicopathologiques des patients	79
4.1.2	Profils mutationnels des gènes KRAS, NRAS et BRAF et leurs corrélations avec les facteurs clinicopathologiques des patients	80
4.1.2.1	Le gène KRAS	80
4.1.2.2	Le gène NRAS	82
4.1.2.3	Le gène BRAF.....	82
4.1.3	Evaluation du statut MSI.....	83
	Conclusion.....	85

Annexes

Références bibliographiques

Liste des abréviations

ADN	Acide Désoxyribonucléique.
AKT	Alpha serine/Threonine-protein Kinase.
APC	Adenomatous Polyposis Coli.
AXIN	Axis Inhibition Protein.
BAX	(Bcl-2)-associated X.
BRAF	V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B.
CAAX	Protein motif where the C is a cysteine.
CCR	Cancer Colorectal.
CIMP	Phénotype méthylateur (CpG Island Methylation Phenotype).
CIN	Chromosomal Instability (Instabilité chromosomique).
CK1α	Casein Kinase 1 α .
CpG	Séquence riche en C et G.
DCC	Deleted in Colorectal Cancer.
GEF	Guanine.
GSK3	Glycogen Synthase Kinase-3.
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor.
EMT	Epithelial Mesenchymal Transition.
ErbB	Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene.
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinase.
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2.
HNPCC	Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer.
HRAS	Harvey Rat Sarcoma Virus.
IGFBP-7	Insulin-Like Growth Factor-Binding Protein 7.
JAK	Janus Kinase.
KRAS	Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog.
MAPK	Mitogen-activated protein kinase.
MGMT	O (6)-Methylguanine-DNA-methyltransferase.
MICI	Maladie Inflammatoire Chronique de l'Intestin.
MMR	MisMatch Repair.
MLH1	MutL protein homolog 1 Human MutL Homolog 1.
MSH2	MutS Homolog 2.
MSH6	MutS Homolog 6.
MSI	Microsatellite Instability.
MSS	Microsatellite Stability.
MYC	Myelocytomatosis oncogene MYC.
NRAS	Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog.
FAP	Polypose Adénomateuse Familiale.
p16 (CDKN2A)	Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A.
PBS	Phosphate Buffered Saline.
PCR	Polymerase Chain Reaction (Réaction en chaîne par polymérase).

PD-1	Programmed cell death protein 1.
PIP 3	Phosphatidylinositol 3-trisphosphate.
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha.
PKC	Protéine Kinase C.
PLC-γ	Phosphatidylinositol-Specific -Gamma-1.
PMS2	Postmeiotic Segregation Increased 2.
PTEN	Phosphatase and TENsin homolog.
pTNM	Pathologic Tumor Nodes Metastasis.
RALGDS	Ral Guanine Nucleotide Dissociation Stimulator.
SCNA high	High frequency of DNA Somatic Copy Number Alterations.
SMAD4	Mothers Against Decapentaplegic Homolog 4.
SOS	Son OF Sevenless homolog.
SSA/P	Sessile Serrated Adenoma/Polyp.
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription.
TCF	Transactivation pf Cell Factor.
TGF- β	Transforming Growth Factor Beta.
TP53	Tumor Protein 53.
TSA	Traditional Serrated Adenoma.
VEGFR	Vascular Endothelial Growth Factor Receptor.
WNT	Wingless-type.
5-FU	5 Fluoro Uracile.

Liste des figures

Figure 1. Estimations et proportions de cas incidents et de décès des principaux types de cancer dans le monde en 2020.....	6
Figure 2. Anatomie du côlon et du rectum.	7
Figure 3. Histologie du côlon et organisation des cryptes.....	8
Figure 4 . Structure des cryptes coliques. L'unité fonctionnelle de la base du côlon est la crypte.	9
Figure 5. Les différentes voies de la pathogène du cancer colorectal.	10
Figure 6. Séquence conventionnelle d'adénome à carcinome.....	11
Figure 7. La voie d'instabilité chromosomique.....	12
Figure 8. La voie simplifiée WNT/ β -caténine.....	13
Figure 9 . Pourcentage de différentes mutations RAS dans les cancers colorectaux	16
Figure 10. La voie de signalisation RAS.....	17
Figure 11. Voie de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) dans le cancer colorectal métastatique (CCRm) BRAF V600Emuté	19
Figure 12. Mécanisme du système de réparation des mésappariements	21
Figure 13. Aspect endoscopique représentatif des lésions festonnées du cancer colorectal.....	22
Figure 14. Présentation des deux voies festonnées.	23
Figure 15 . Les stades du cancer colorectal selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8 ^{ème} édition	27
Figure 16. Résumé des caractéristiques de chaque sous-groupe de sous-types de consensus moléculaires (CMS).....	28
Figure 17. Traitement par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires pour le cancer colorectal métastatique.	33
Figure 18. Cibles moléculaires dans le cancer colorectal métastatique.	34
Figure 19. Représentation schématique de l'immunohistochimie.	41
Figure 20 . Le processus de PCR	44
Figure 21. Les étapes de la lyse cellulaire.....	45
Figure 22. Le processus de l'extraction.....	46
Figure 23. Le nombre des cycles de PCR.....	48
Figure 24. Répartition des cas de CCR selon le sexe..	50
Figure 25. Répartition des patients selon l'âge.	51
Figure 26. Répartition des cas de CCR en fonction du site tumoral.	52
Figure 27. Répartition des cas de CCR en fonction du grade.....	52
Figure 28. Distribution des cas de CCR selon le stade.....	53
Figure 29. Pièce réséquée du côlon transverse, mesurée 60cm.....	54

Figure 30. Coupe histologique de la paroi saine du côlon .	54
Figure 31. Aspect d'un adénocarcinome bien différencié.	56
Figure 32. Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié.	56
Figure 33. Aspect histologique des carcinomes de haut grade colorés à HE.	56
Figure 34. Fréquence de l'expression de la protéine MLH1.	57
Figure 35. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MLH1 dans le cancer colorectal.	58
Figure 36. Fréquence de l'expression de la protéine MSH2.	58
Figure 37. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MSH2 dans le cancer colorectal.	59
Figure 38. Fréquence de l'expression de la protéine MSH6.	59
Figure 39. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MSH6 dans le cancer colorectal.	60
Figure 40. Fréquence de l'expression de la protéine PMS2.	60
Figure 41. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine PMS2 dans le cancer colorectal.	61
Figure 42. Evaluation du statut MMR.	62
Figure 43. Expression des protéines du système MMR en fonction du sexe.	63
Figure 44. Evaluation du profil des protéines du système MMR en fonction de l'âge.	64
Figure 45. Expression des protéines MMR selon le site tumoral.	65
Figure 46. Expression des protéines MMR en fonction du grade.	66
Figure 47. Expression des protéines MMR en fonction du stade.	67
Figure 48. Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF.	68
Figure 49. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le sexe.	70
Figure 50. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec l'âge.	71
Figure 51. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le site tumoral.	72
Figure 52. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le type histologique.	73
Figure 53. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le stade.	75
Figure 54. Association du statut mutationnel KRAS et les statuts mutationnels NRAS et BRAF.	76
Figure 55. Association du statut mutationnel NRAS et le statut mutationnel BRAF.	77

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les stades du cancer colorectal selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8 ^{ème} édition	26
Tableau 2 : Le profil immunohistochimique de MLH1 dans le cancer colorectal.	57
Tableau 3 : Le profil immunohistochimique de MSH2 dans le cancer colorectal.	58
Tableau 4: Le profil immunohistochimique de MSH6 dans le cancer colorectal.	59
Tableau 5: Le profil immunohistochimique de PMS2 dans le cancer colorectal.	60
Tableau 6: Expression des protéines MMR au niveau des adénocarcinomes colorectaux.	61
Tableau 7: Distribution des protéines du système MMR en fonction du sexe des patients.	62
Tableau 8: Distribution des protéines du système MMR en fonction de l'âge des patients.....	63
Tableau 9: Distribution des protéines du système MMR selon le site tumoral.....	64
Tableau 10: Distribution des protéines du système MMR en fonction du grade.	65
Tableau 11 : Distribution de l'expression des protéines du système MMR en fonction du stade de la tumeur.	66
Tableau 12: Résultats des muatations des gènes KRAS, NRAS et BRAF.....	67
Tableau 13: Fréquence et distribution des mutations KRAS, NRAS et BRAF.....	68
Tableau 14: Corrélation entre les statuts KRAS, NRAS et BRAF et le sexe.....	70
Tableau 15: Corrélation entre l'âge et les statuts RAS et BRAF	71
Tableau 16: Corrélation entre le site tumoral et les statuts mutationnels KRAS, NRAS et BRAF.....	72
Tableau 17: Corrélation entre le type histologique et les statuts KRAS, NRAS et BRAF.	73
Tableau 18: Corrélation entre le stade et les statuts KRAS, NRAS et BRAF.....	75
Tableau 19:Evaluation des relations entre le statut KRAS et les statuts NRAS et BRAF.	76
Tableau 20: Etude de la relation entre le statut NRAS et le statut BRAF.	77

Introduction

Le cancer colorectal (CCR) est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité en Algérie. Il est le deuxième cancer mortel et la troisième tumeur maligne la plus répandue dans le monde. Compte tenu des progrès des traitements primaires, la chirurgie reste le traitement curateur au stade idéal, complétée par la chimiothérapie et la radiothérapie locale dans les stades avancés afin d'éliminer la tumeur et les métastases [1].

Cependant, malgré l'émergence de nombreux programmes de dépistage du CCR à un stade précoce, près de 25% des cas de CCR sont diagnostiqués à un stade tardif, souvent avec des métastases, au moment où 20% des patients peuvent développer des métastases métachrones, ce qui pose des difficultés de contrôle chirurgical curatif et entraîne des décès [1,2].

Le pronostic des patients atteints d'un cancer colorectal métastatique (CCRm) reste sombre malgré son amélioration observée sur les 20 dernières années après l'introduction des médicaments de chimiothérapie actifs, tel que l'oxaliplatine, l'irinotécan, le TAS-102...[3,4], ainsi que les médicaments ciblés, en particulier, les agents qui bloquent le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) dits les inhibiteurs d'EGFR, tels que les anticorps monoclonaux anti-EGFR cetuximab ou panitumumab, qui, en association avec la chimiothérapie, présentent une option thérapeutique efficace chez les patients atteints de CCRm [5,6].

Le récepteur de la tyrosine kinase EGFR appartient à la famille ErbB (Erythroblastose endogène B) /HER (récepteur du facteur de croissance épidermique humain). L'activation de ce récepteur déclenche en aval diverses voies de signalisation qui interviennent dans la prolifération cellulaire, jouant ainsi un rôle vital dans l'initiation et la progression du cancer colorectal [7]. Les voies de signalisation activées, notamment les voies RAS-RAF-BRAF-MAPK et phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) -AKT, sont des moteurs clés de la croissance et de la progression tumorale [8,9].

Les protéines RAS sont des proto-oncogènes fréquemment mutés dans les cancers humains. Elles sont codées par trois gènes exprimés de manières ubiquitaires le HRAS, le KRAS et le NRAS. Ces protéines sont des GTP-ases qui agissent comme des commutateurs moléculaires, régulant les voies responsables de la prolifération et donc la survie cellulaire. La fonction aberrante du KRAS et du NRAS est associée à des troubles du développement hyperprolifératif et au cancer. Les données cliniques montrent que le KRAS est l'isoforme le plus fréquemment muté et se retrouve dans 22% de tous les cancers analysés contre 8% pour le NRAS et 3% pour le HRAS [10]. La mutation du proto-oncogène RAF de type B(BRAF) définit un nouveau biomarqueur qui gagne de l'intérêt en raison de son association à un pronostic défavorable par

rapport aux CCRs de type BRAF sauvage bien que cette mutation n'ait à ce jour aucun rôle prédictif clair pour orienter les décisions thérapeutiques [11].

Les métastases à distance sont à l'origine de beaucoup de problèmes chez les patients atteints de CCR en période post opératoire et sont associées à une morbidité et à une mortalité élevées. Le protocole de traitement décidé est souvent basé sur les caractéristiques pronostiques du patient, y compris les caractéristiques clinicopathologiques traditionnelles telles que le stade du TNM, le degré de différenciation histopathologique, l'invasion des tissus environnants, le nombre de métastases ganglionnaires et l'instabilité des microsatellites (MSI). Le système ADN-MMR est composé de 4 gènes MMR et de leurs protéines codées (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2). Une carence en MMR entraîne soit la production d'une protéine tronquée non fonctionnelle, soit la perte d'une protéine, qui va engendrer l'instabilité des microsatellites (MSI). Jusqu'à ce jour, le statut du MSI est le seul biomarqueur prédictif de la réponse aux inhibiteurs de points de contrôle immunitaires d'une tumeur[12].

L'épidémiologie pathologique moléculaire constitue un puissant outil qui permet de décrypter les résultats du traitement en fonction des modèles d'altération moléculaire. L'optimisation d'un traitement initial et les thérapies basées sur l'exposition continue des patients à des lignes de traitement ont montrés une efficacité remarquable. En revanche, un changement du paradigme est en cours via une tendance à aller vers une médecine de précision avec des thérapies personnalisées basées sur les caractéristiques moléculaires spécifiques de la maladie.

Dans cette perspective, l'amélioration des connaissances dans la biologie et la génétique du cancer colorectal a permis aux chercheurs de mieux définir les biomarqueurs prédictifs qui aideraient les oncologues à sélectionner les nouvelles stratégies. Cela va permettre de définir des thérapies ciblées et par conséquent plus adaptées au patient. Les gènes KRAS, NRAS, BRAF sont des gènes clés dans la carcinogenèse colorectale. Cependant, il existe encore peu de données disponibles sur les statuts mutationnels de ces gènes chez les patients atteints de CCRm en Algérie. Dans ce travail de recherche, nous nous sommes intéressés à l'étude des profils moléculaires des biomarqueurs KRAS, NRAS, BRAF et instabilité des microsatellites (MSI) en tant que facteurs pronostiques et prédictifs de réponse aux thérapies ciblées dans les cancers colorectaux métastatiques chez les patients algériens. L'objectif de notre recherche est d'analyser les profils mutationnels des gènes KRAS, NRAS et BRAF en termes de fréquence, de distribution et de corrélations avec des facteurs clinicopathologiques dans une population algérienne.

Chapitre 1. Etude bibliographique

1.1 Epidémiologie

Depuis des décennies, la fréquence du cancer colorectal (CCR) augmente de façon remarquable dans tous les pays du monde. Le CCR est le deuxième cancer le plus mortel et la troisième tumeur maligne la plus répandue dans le monde, il est à lui-même le troisième cancer le plus fréquent dans le monde chez l'homme, après le cancer du poumon et le cancer de la prostate et le deuxième chez la femme après le cancer du sein [13].

Selon le GLOBOCAN 2020, les statistiques rapportent environ de 1,9 million de cas de CCR survenus et de 935 173 décès signalés, ce qui représente 10% de nouveaux cas d'atteinte par le cancer et 9,39% de décès par cancer dans le monde (**figure 1**) [13]. Le CCR est la troisième cause de décès liés au cancer chez les deux sexes dans le monde, avec environ 515 637 décès chez les hommes et 419 536 décès chez les femmes. De grandes variations géographiques des taux d'incidence et de mortalité ont été observées. Les taux d'incidence étaient les plus élevés en Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande et les taux de mortalité les plus élevés étaient en Europe de l'Est. Les taux d'incidence du cancer du côlon et du rectum ont tendance à être faibles dans la plupart des régions d'Afrique et au sud de l'Asie centrale. Selon les estimations de GLOBOCAN 2020[13], il y aurait dans le monde 1,15 million de nouveaux cas, de cancer du côlon, 0,7 million de nouveaux cas de cancer rectal et 50 000 nouveaux cas de cancer anal dans l'année 2020.

En Algérie, le CCR se classe au deuxième rang par ordre de fréquence, en 2020, on estime 6526 nouveaux cas diagnostiqués chez les deux sexes, il se classe également au troisième rang des cancers chez l'homme après le cancer du poumon et le cancer de la prostate avec plus de 3458 nouveaux cas et au deuxième rang chez la femme après le cancer du sein avec plus de 3068 cas, estimés en 2020. En Algérie, le CCR est marqué par une transition épidémiologique significative, liée à l'augmentation de l'espérance de vie, des transformations de l'environnement, et des changements de mode de vie [14].

Le grand nombre de cas de CCR pose un problème de santé publique à l'échelle mondiale. La sensibilisation au CCR a pris une importance accrue engendrant des actions dans le but de promouvoir des choix de modes de vie sains, de recourir à des nouvelles stratégies de gestion du CCR et de mettre en œuvre des programmes mondiaux de dépistage essentiels pour prévenir la morbidité et la mortalité par le CCR [15].

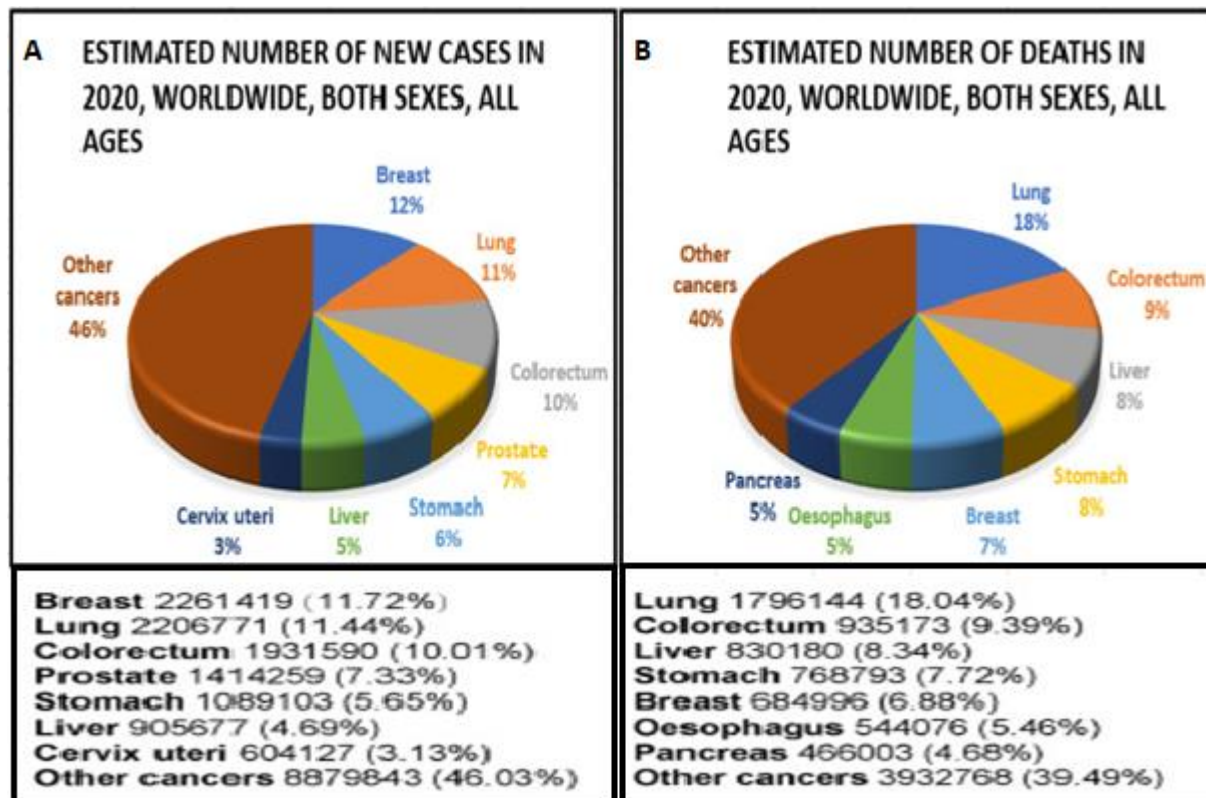


Figure 1. Estimations et proportions de cas incidents et de décès des principaux types de cancer dans le monde en 2020.

(A) Estimation du nombre de nouveaux cas de cancer en 2020 dans le monde. (B) Estimation du nombre de décès liés au cancer en 2020 dans le monde [13].

1.2 Anatomie du côlon et du rectum

1.2.1 Macroscopie

Le gros intestin fait partie du système digestif qui comprend : la bouche, l'œsophage, l'estomac, l'intestin grêle, le colon et le rectum [16]. Le côlon s'étend de la valvule iléo-colique à l'anus et mesure en moyenne 120 cm à 150 cm chez l'adulte et se divise en plusieurs segments :

- ✓ Le cæcum: la partie sacculaire la plus proximale du gros intestin et se trouve en dessous d'une ligne horizontale définie par la valve iléo-colique, où débouche l'appendice.
- ✓ Le côlon ascendant ou le côlon droit : mesure de 15 cm à 20 cm et s'étend jusqu'à l'angle hépatique.
- ✓ Le côlon transverse : mesure en moyenne 30 cm à 60 cm et s'étend de l'angle hépatique à l'angle splénique et possède un mésentère.
- ✓ Le côlon descendant : commence de l'angle splénique puis devient rétropéritonéal et s'étend sur 20 à 25 cm.
- ✓ Le côlon sigmoïde : atteint arbitrairement le rectum à peu près au niveau de la troisième vertèbre sacrée.

- ✓ Le rectum : mesurant de 10 cm à 15 cm de longueur et se termine au niveau du canal anal (**Figure 2**). Le tiers supérieur du rectum est recouvert de péritoine et les deux tiers inférieurs se trouvent dans le rétropéritoine entouré par le mésorectum graisseux [17].

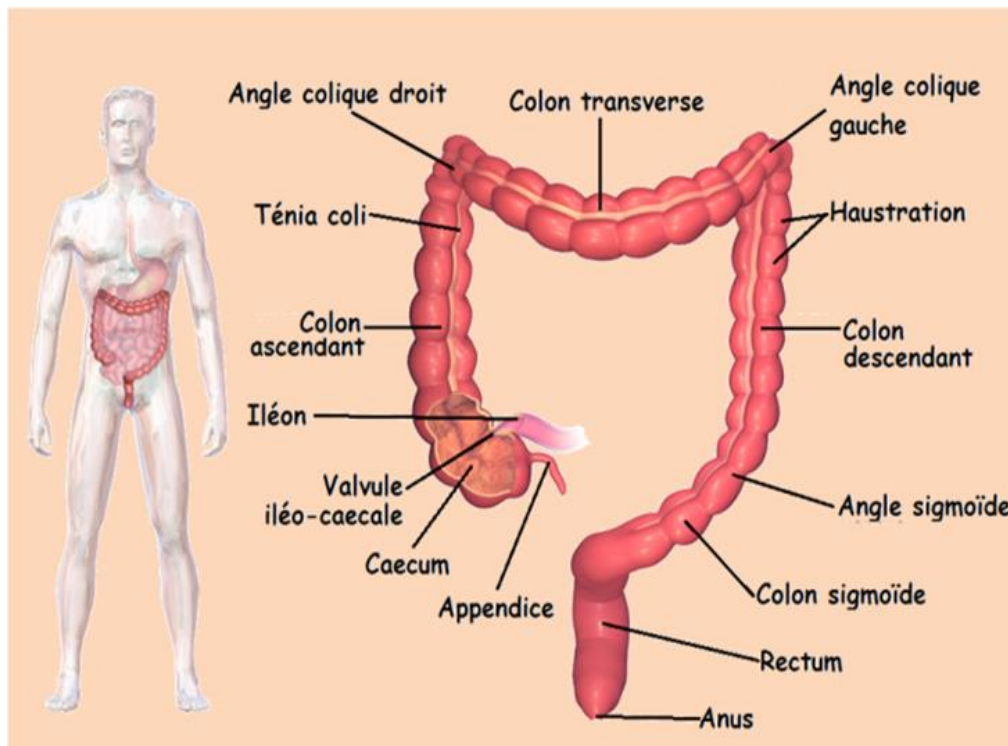


Figure 2. Anatomie du côlon et du rectum.

(https://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain8b_1.html)

1.2.2 Histologie

1.2.2.1 Histologie du côlon

Les parois du côlon et du rectum sont composées de cinq couches histologiques distinctes [18] (**Figure 3**). On y trouve de l'intérieur vers l'extérieur :

La muqueuse qui constitue la couche la plus interne (luminale) du côlon. A noter que contrairement à l'intestin grêle, le côlon est dépourvu de villosités, il abrite des cryptes ou glandes dites « de Lieberkühn » et la lamina propria, qui se trouve sous les cryptes. Ces cellules caliciformes, majoritaires et entérocytes constituent l'unité fonctionnelle du côlon [19]. De plus, les cellules cylindriques façonnent l'épithélium de surface qui fonctionne comme une barrière protectrice entre l'hôte et la lumière intestinale. La muqueuse et la sous-muqueuse sous-jacente sont séparées par la couche musculaire lisse de **la musculature muqueuse**.

La sous-muqueuse, et contient des fibroblastes, un système vasculaire, des nerfs et une variété de globules blancs situés sous des brins de tissu de collagène. Cette couche abrite un plexus neuronal dit le plexus de Meissner, qui innerve la musculature muqueuse. Les couches internes

du côlon sont entourées d'une épaisse couche musculaire (muscularis externa) constituée de tissu musculaire circulaire et longitudinal. Ceux-ci sont innervés par le plexus d'Auerbach situé dans la tunique **muscleuse**. Les composants histologiques les plus externes du côlon sont formés de la sous-séreuse et de la séreuse (intrapéritonéale). **La séreuse** qui est la couche la plus superficielle est dérivée du péritoine viscéral qui entoure le côlon, ainsi que les viscères pelviens abdominaux et les mésentères. Cependant, le rectum est entouré par l'adventice (rétropéritonéale) [18].

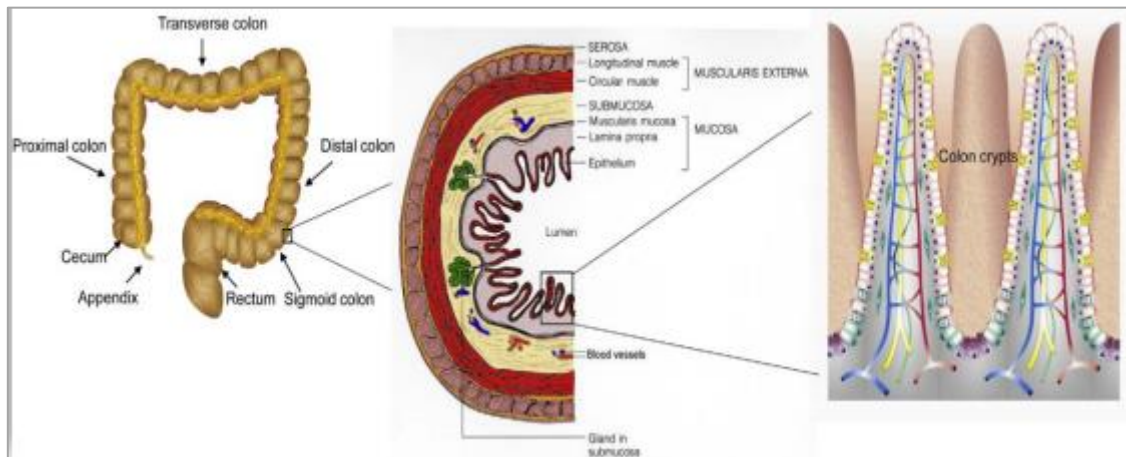


Figure 3. Histologie du côlon et organisation des cryptes [20].

1.2.2.2 Structure et organisation des cryptes coliques

L'anatomie de l'épithélium colique consiste en une structure en forme de « collines et de vallées » appelées cryptes, formées par une seule couche de cellules épithéliales (**Figure 4**). Il est bien établi que les cryptes du côlon montrent une organisation topographique polarisée où la position d'une cellule spécifique est étroitement liée à sa fonction, à son comportement et à sa capacité de prolifération et de transformation [21]. L'épithélium mature du côlon est composé de deux principaux types de cellules différenciées, des cellules entérocytes et des cellules caliciformes, avec une population mineure de cellules entéroendocrines. Les cellules caliciformes se trouvent dans la zone médiane des cryptes et leur fonction est la sécrétion de mucine. Les cellules endocrines sont généralement confinées au tiers inférieur des cryptes et les entérocytes absorbantes, également appelées colonocytes, se trouvent au tiers supérieur et à la surface de la crypte [22].

D'autre part, les cellules souches indifférenciées du côlon occupent la base de ces structures. Ainsi, l'état de différenciation des cellules dépend de leur position le long de la crypte, les cellules moins différenciées sont situées en bas, et les plus différenciées sont situées en haut. Ce processus de différenciation est associé aux changements morphologiques, qui a lieu lors de

la migration vers le lumen. Lorsque les colonocytes atteignent la surface de la crypte, le processus de différenciation est terminé. En revanche, pour une fonction efficace et correcte du côlon, l'élimination des colonocytes sénescents est essentielle [22].

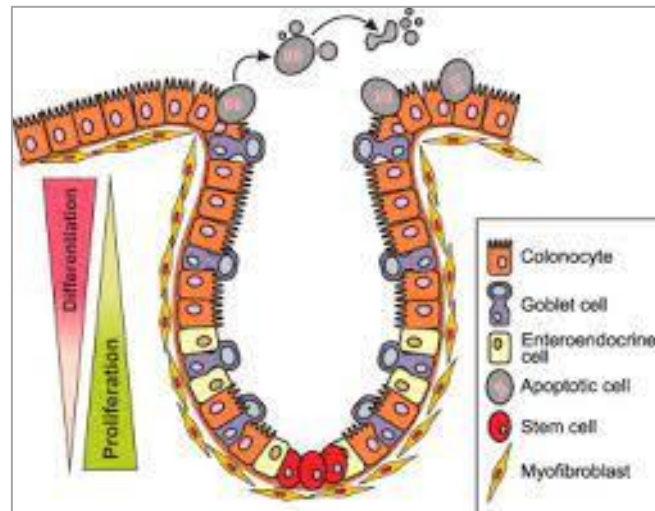


Figure 4. Structure des cryptes coliques. L'unité fonctionnelle de la base du côlon est la crypte [22].

1.3 La pathogenèse du cancer colorectal

La pathogenèse du CCR est due à l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques dont certaines sont responsables de l'activation d'oncogènes ou de l'inactivation de gènes onco-suppresseurs, capables de piloter l'évolution maligne de l'épithélium normal jusqu'à des lésions néoplasiques précoces au CCR [23,24] à travers l'apparition de foyers de cryptes aberrantes, des adénomes et des lésions néoplasiques précoces/adénomes festonnés. Une telle transformation maligne prend jusqu'à 15 ans, en fonction des caractéristiques de la lésion et d'autres facteurs de risque indépendants tels que le sexe, l'indice de masse corporelle et le mode de vie sédentaire [25].

La transformation néoplasique affectant l'épithélium du côlon est caractérisée par deux voies morphologiques distinctes de carcinogenèse, à savoir les voies de néoplasie conventionnelle et alternative/festonnée (**Figure 5**), chacune étant définie par des altérations génétiques et épigénétiques spécifiques, des caractéristiques cliniques et histologiques typiques, conduisant à des phénotypes différents [26,27,28,29].

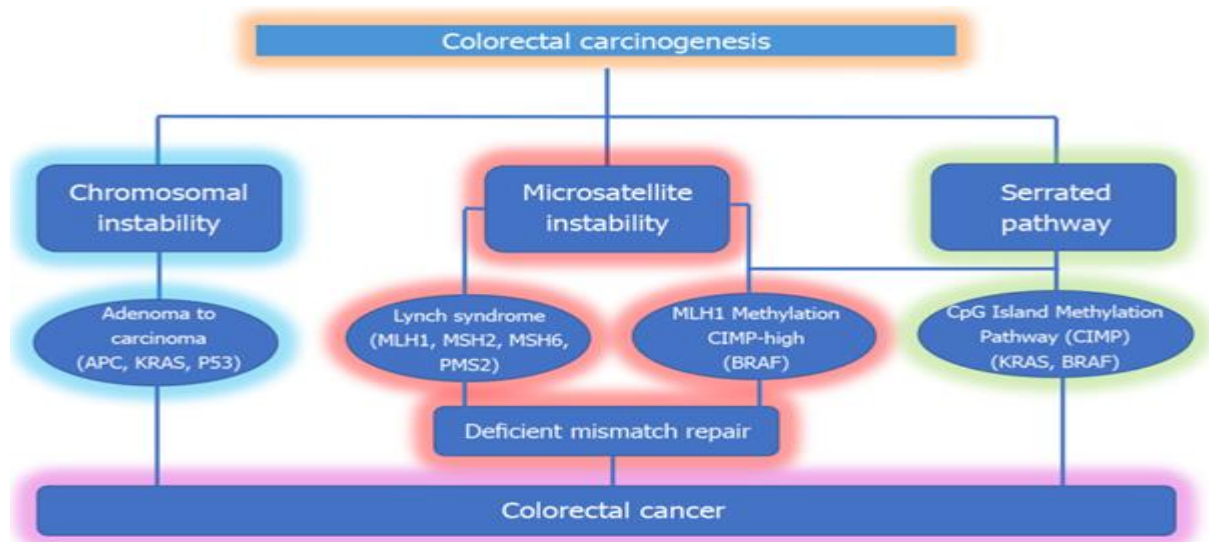


Figure 5. Les différentes voies de la pathogenèse du cancer colorectal [30].

1.3.1 La voie « classique » de la séquence adénome-carcinome.

Le modèle conventionnel, dit séquence adénome-carcinome, est histologiquement homogène et caractérise morphologiquement l'adénome comme une lésion précurseur [31], y compris l'adénome tubulaire ou tubulovilleux. La séquence adénome-carcinome est un terme utilisé pour décrire la progression du cancer. Fearon et Vogelstein (1988) ont décrit la séquence adénome-carcinome comme une voie mutationnelle en plusieurs étapes, dans laquelle chaque altération histologique est la conséquence d'une dérégulation moléculaire [29,32,33,34,35].

Le modèle de la séquence adénome-carcinome souvent appelé modèle de « Vogelgram » a reçu plusieurs distinctions et dispose d'une notoriété mais il fait l'objet de critiques par les experts et la recherche d'alternatives est toujours en cours [36]. L'intensification des recherches sur la carcinogenèse colorectale a accumulé des preuves frappantes de plusieurs voies génétiques fréquemment affectées par des altérations. Jass (2007)[37] décrit le lien dogmatique du CCR au modèle monodirectionnel comme préjudiciable à la recherche dans le domaine. Par conséquent, Issa (2008) [38] postule que le concept de séquence adénome-carcinome doit être révisé.

Le CCR se développe lorsque les cellules épithéliales acquièrent une série de modifications génétiques ou épigénétiques qui leur permettent d'être hyperprolifératives. Ces cellules à développement rapide forment un adénome bénin, qui peut évoluer vers le cancer et métastaser. Le cancer commence comme un adénome minuscule qui devient un adénome géant pour finir en cancer. Au niveau moléculaire, ce modèle admet un fond hétérogène, basé sur l'un des deux mécanismes de tumorigenèse (**Figure 6**) : (i) l'instabilité chromosomique (CIN) ou (ii) l'instabilité des microsatellites (MSI) [39].

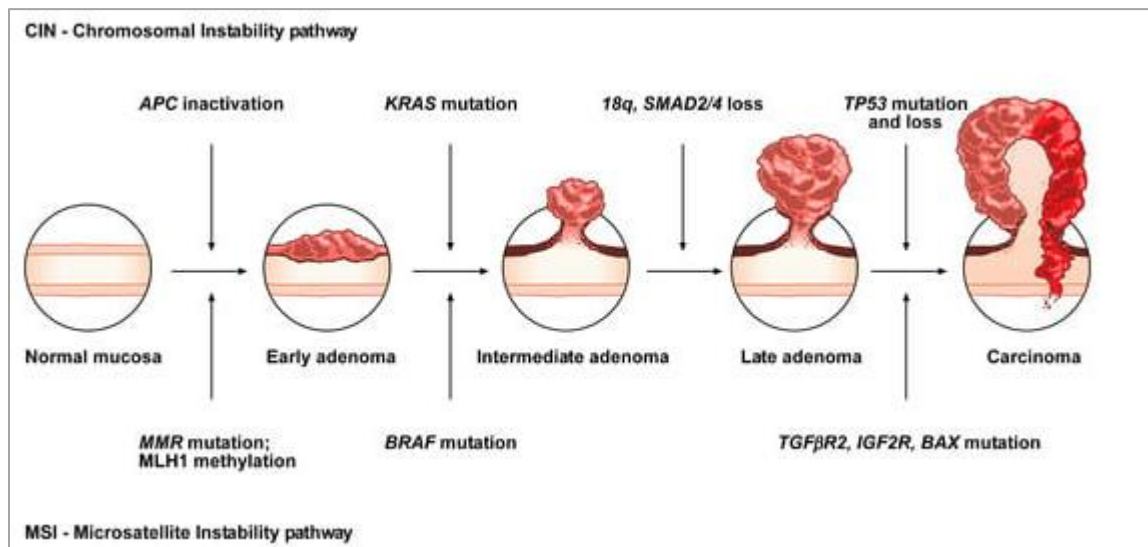


Figure 6. Séquence conventionnelle d'adénome à carcinome [29].

L'inactivation du gène suppresseur de tumeur (APC) s'observe à un stade précoce du développement d'une tumeur du côlon. L'activation de l'oncogène K-RAS est associée à la transition d'un adénome précoce à un adénome intermédiaire. Lors de la transition d'un adénome intermédiaire à un adénome tardif, des changements au niveau génomique sont observés, telle que la perte du chromosome 18, ainsi que la perte des locus. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 (TP53) et le gain du chromosome 8q sont associés à une transition tardive adénome-carcinome. Quant à la capacité de métastaser, la transition nécessite des changements supplémentaires telle que la perte du chromosome 8p qui est associée à la transition carcinome-métastase [27,33,40].

La voie de l'instabilité chromosomique (CIN) commence par des mutations bi-alléliques du gène suppresseur de tumeur APC au sein de la muqueuse colique normale. Cette dernière se différencie progressivement en adénocarcinome lors de l'acquisition de mutations supplémentaires dans les gènes KRAS, SMAD4 et TP53 avec une dérégulation des voies de signalisation Wnt/β-caténine, MAPK, PI3K et TGF-β [29].

Alternativement, la voie MSI implique une altération initiale de la signalisation Wnt qui conduit à la formation d'un adénome précoce. Ensuite, la mutation BRAF se verra suivie d'altérations des gènes TGFBR2, IGF2R et BAX qui participent à la progression vers les stades intermédiaires et tardifs de la carcinogenèse [29].

1.3.2 Altérations moléculaires dans la séquence adénome-carcinome

1.3.2.1 L'instabilité chromosomique (CIN)

La voie de la tumorigenèse du CCR qui implique les mutations RAS est l'instabilité chromosomique [41]. La voie traditionnelle adénome-carcinome commence lorsqu'il se produit des mutations qui inactivent le gène suppresseur de tumeur APC. Nous citons, la mutation de l'homologue de l'oncogène viral du sarcome de rat Kirsten (KRAS) qui conduit à des adénomes plus gros [41,42]. Enfin, des mutations supplémentaires se produisent dans le TP53, dans le PIK3CA et une perte de 18q conduisent à un cancer invasif (**Figure 7**) [42,43,44].

La CIN représente la forme la plus répandue d'instabilité génomique, elle est détectée dans 85 % des CCR sporadiques et est fréquemment observée dans les sites du cancer du côlon distaux plutôt que proximaux. La CIN consiste en un gain ou en une perte d'une partie ou de tout le(s) chromosome(s) et est généralement associée à des mutations de proto-oncogènes dits aussi gènes suppresseurs de tumeurs [39].

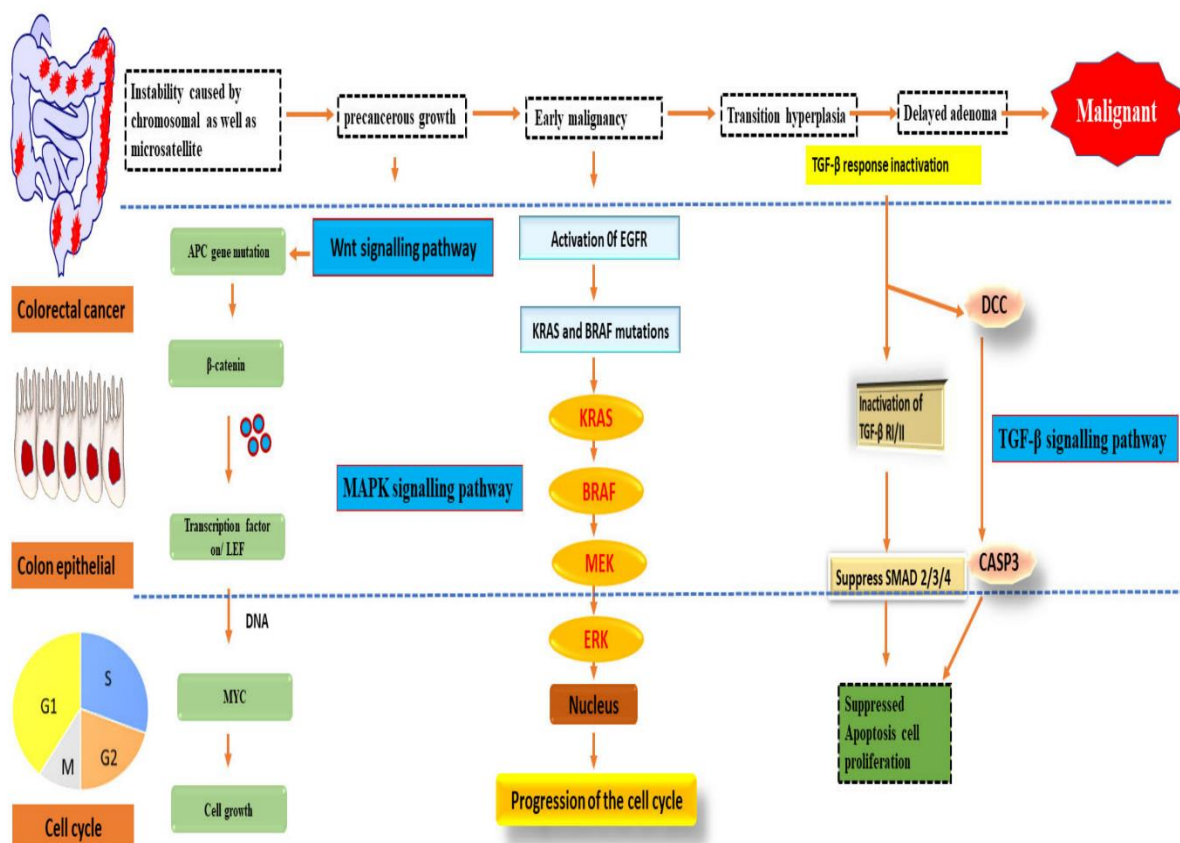


Figure 7. La voie d'instabilité chromosomique [44].

1.3.2.1.1 Le gène APC

Le gène responsable de la polypose adénomateuse du côlon (APC) a été découvert dans les années 1970, il se situe sur le chromosome 5, dans la région q21. Le gène suppresseur de tumeur (APC) code pour une protéine de 312 kDas [45] et est impliqué dans la régulation de la β -caténine dans le cadre de la voie de signalisation WNT car il empêche de manière constante l'activation de la β -caténine qui entraîne la prolifération cellulaire incontrôlée [46,47].

Dans les entérocytes normaux, le complexe de destruction de la β -caténine maintient le signal WNT au niveau intracellulaire dans des niveaux appropriés, il comprend les gènes APC, AXIN, GSK3 β , et CK1 α [47].

En l'absence du ligand Wnt, le complexe de destruction contenant l'APC, favorise l'ubiquitination de la β -caténine dans le cytosol, déclenche par le protéasome la dégradation ultérieure de la β -caténine, de même que les gènes cibles de la voie Wnt sont également gardés réprimés dans le noyau, par le répresseur Groucho qui interagit avec les facteurs de transcription TCF et LEF liés à l'ADN (**Figure 8-A**) [47].

En l'absence de mutation APC, le ligand Wnt se lie aux récepteurs Frizzled localisés à la surface des cellules et il active la signalisation Wnt. Cela déclenche la séquestration du complexe de destruction dans la membrane cellulaire et facilite la production de β -caténine, qui pénètre dans le noyau et active les gènes cibles de la voie Wnt [48](**Figure 8-B**).

Lorsque l'APC est muté, le « complexe de destruction » défectueux est incapable de se lier et d'ubiquitiner la β -caténine ; de ce fait, il agit comme un signal de prolifération incontrôlé, même en l'absence d'activation de la voie de signalisation Wnt par le ligand Wnt (**Figure 8-C**) [47].

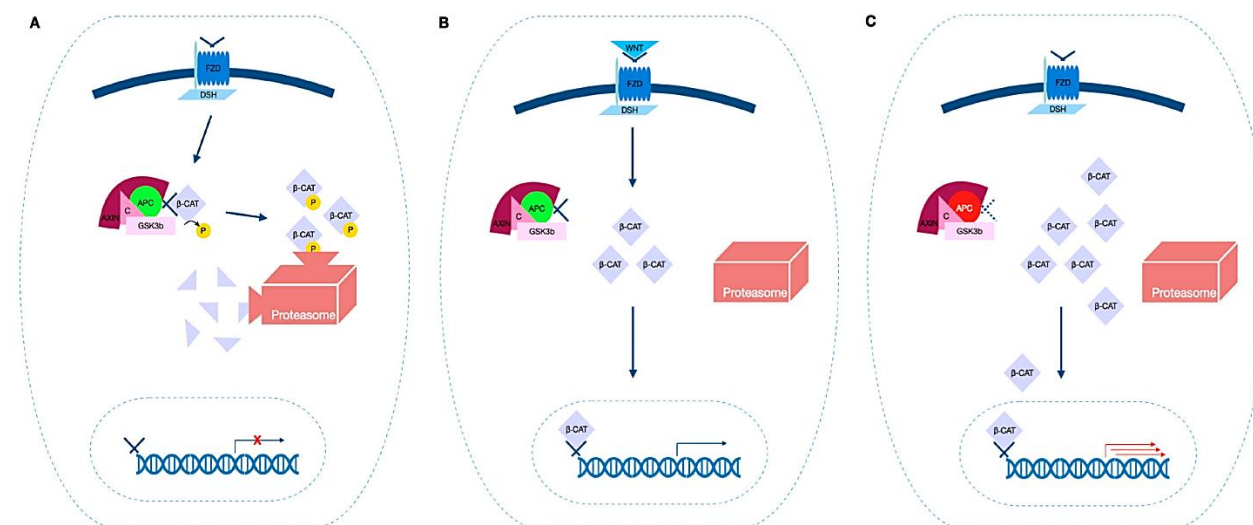


Figure 8. La voie simplifiée WNT/ β -caténine [47].

Les études actuelles impliquent une signalisation aberrante Wnt/ β -caténine suite à l'inactivation du gène APC ou à l'activation de mutations dans le gène β -caténine comme événement déclencheur du développement de l'adénome colique [49,50]. L'inactivation complète du gène APC est responsable de la majorité des FAP caractérisées par une polypose colique abondante et un carcinome colorectal [51]. Des mutations inactivatrices du gène ont été rapportées chez 34 à 70 % des patients atteints d'un cancer colorectal sporadique [52,53,54].

1.3.2.1.2 Le gène TP53

Le gène TP53 connu du nom «gardien du génome », situé sur le bras court du chromosome 17, code pour une protéine régulant le cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose [55]. Des mutations ou une perte de fonction du gène TP53 sont rapportées dans 50 à 75 % des cas de CCR [56,57].

L'inactivation du gène TP53, suppresseur de la tumeur, entraîne la progression tumorale permettant une prolifération cellulaire excessive. En effet, la transition de l'adénome au carcinome invasif est généralement associée à l'inactivation du TP53 [58]. La perte d'hétérozygotie (LOH) du chromosome 17q où se trouve TP53 est un événement fréquent dans les CCR, du fait du rôle essentiel du chromosome 17q dans la séquence canonique adénome-adénocarcinome. Similaire au gène APC, le gène TP53 est plus fréquemment muté dans les CCR non hypermutés que dans les CCR hypermutés [59] ; ainsi, il convient de noter que dans la reprogrammation métabolique de la tumeur interviennent non seulement les pertes d'activité du gène TP53, mais également les mutants TP53 «gain de fonction », ce qui favorise la progression et l'invasion de la tumeur [60,61].

1.3.2.1.3 Le gène TGF- β

Dans les processus cellulaires fondamentaux, notamment dans la croissance cellulaire, la voie TGF- β joue un rôle essentiel dans la différenciation et l'apoptose. Les modifications chromosomiques impliquant le gène TGF- β contribuent fortement à la voie CIN dans la carcinogenèse colorectale. La perte d'hétérozygotie (LOH) fait référence à l'absence de l'une des deux allèles d'un gène, l'allèle restant, étant affecté par une mutation [62]. Par ailleurs, il est à noter que dans environ 70 % des cas du CCR avancé, une LOH du chromosome 18q [63] est le plus souvent observée, des travaux montrent qu'elle est associée à un mauvais pronostic du CCR [64]. La LOH du chromosome 18q est l'une des principales altérations génomiques associées à l'inactivation de la voie TGF- β . Le chromosome 18q code pour deux gènes suppresseurs de tumeurs importants, SMAD2 et SMAD4, dont la perte d'hétérozygotie (LOH) inactive la voie de signalisation TGF- β et favorise, l'évasion de l'apoptose et la prolifération

cellulaire. Presque tous les CCR présentent une activation de gène MYC par l'inactivation de la voie TGF- β et/ou une signalisation Wnt activée, indiquant un rôle important pour MYC dans le CCR [59]. Dans les tissus colorectaux normaux ou précoces du CCR, le gène TGF- β sert de suppresseur de tumeur en induisant l'apoptose et en inhibant la prolifération et l'immortalisation des cellules, d'où l'inactivation de la voie TGF- β favorise la tumorigenèse colorectale.

Au cours des derniers stades de la carcinogenèse colorectale, le gène TGF- β devient un oncogène et son activation favorise la progression, l'invasion et les métastases tumorales du cancer [60,65].

1.3.2.1.4 Le gène RAS

1.3.2.1.4.1 Structure moléculaire du gène KRAS

Le sarcome du rat de Kirsten (KRAS) est un oncogène fréquemment muté dans les tumeurs humaines, et en particulier dans le CCR [66], le gène KRAS, situé sur le bras court du chromosome 12 (12p12.1), code pour une petite protéine G à un poids moléculaire de 21 kDa. La protéine KRAS est composée de six brins bêta et de cinq hélices alpha, avec deux domaines majeurs : le domaine G et l'élément structurel C-terminal [67,19]. Le domaine G, très bien conservé, contient les boucles switch I et switch II, responsables de l'échange GDP-GTP [68]. L'extrémité C-terminale est une région hypervariable contenant le motif CAAX, qui joue un rôle important dans la régulation de la localisation de KRAS sur la surface interne de la membrane plasmique [69].

1.3.2.1.4.2 Les mutations de KRAS

Les mutations de l'oncogène KRAS conduisent à une prolifération accrue des cellules de CCR qui en combinaison avec d'autres mutations comme dans le gène APC, favorisent la tumorigenèse. Près de 85 % des mutations du KRAS dans le CCR se produisent dans l'un des trois principaux points chauds à savoir les codons 12, 13 et 61 [70,71]. Les mutations les plus répandues touchent le codon 12, représentant environ 65 % des allèles mutants KRAS. De plus, G12D et G12V sont les deux sous-types les plus fréquents dans le CCR (**Figure 9**). Chaque mutation a une signature biologique distincte, avec la plus grande variabilité observée entre les mutations KRAS, G13D et G12D, qui présentent différentes réponses au traitement du CCR [72].

Deux autres isoformes RAS contiennent également des mutations oncogènes dans le CCR: les oncogènes viraux du sarcome de Harvey et du neuroblastome du rat (respectivement, HRAS et NRAS) [73]. KRAS lui-même code pour deux isoformes protéiques hautement liées,

KRAS-4B et KRAS-4A, contenant respectivement 188 et 189 acides aminés [74,75]. Ces isoformes sont toutes deux impliquées dans la prolifération, la différenciation et la croissance cellulaire via la voie de signalisation RAS/MAPK [76].

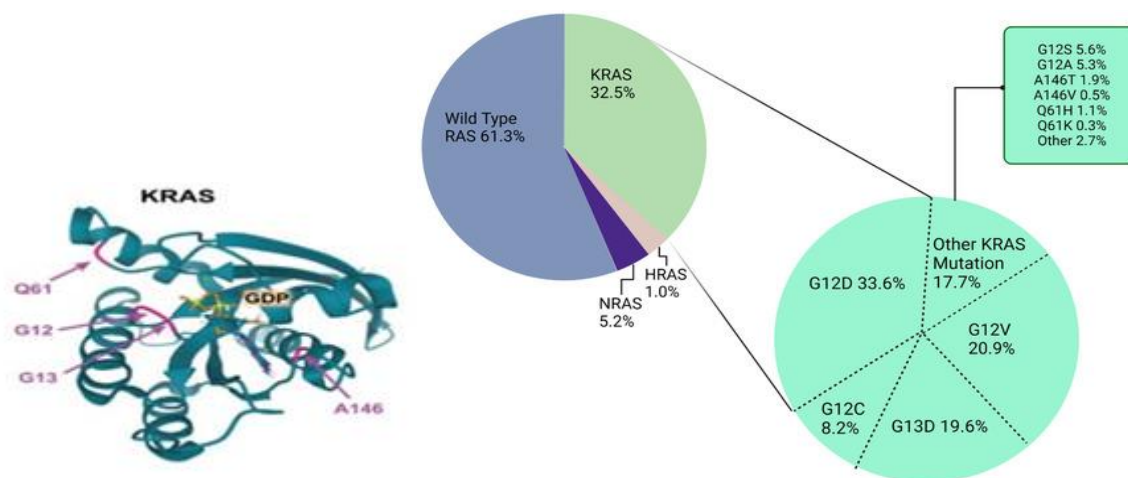


Figure 9. Pourcentage de différentes mutations RAS dans les cancers colorectaux [73].

1.3.2.1.4.3 La fonction de KRAS

En ce qui concerne sa fonction, le KRAS est une guanine triphosphatase (GTPase) qui se trouve généralement sur la partie interne de la membrane cellulaire, ancrée par une modification lipidique post-traductionnelle au niveau de son site C-terminal [77]. Le KRAS de type sauvage fonctionne comme un commutateur moléculaire binaire contrôlé, alternant entre les conformations de transduction de signal inactives et actives. Une fois que le KRAS est dans son état lié au GTP, il subit des changements structuraux qui lui permettent de se lier et de coopérer avec les molécules de signalisation en aval. Le RAS est inactif lorsqu'il est lié au guanosine diphosphate (GDP) mais une fois lié au GTP, le KRAS transmet activement le signal des récepteurs de la surface cellulaire tels que le récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR) en se liant aux protéines effectrices en aval, provoquant finalement la croissance et la prolifération cellulaires [78]. Le KRAS-GTP alimente plusieurs voies en aval, y compris la voie du fibrosarcome rapidement accéléré (RAF)-protéine kinase activée par un mitogène (MEK)-kinase régulée par le signal extracellulaire (ERK) et la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) - protéine kinase B (AKT)-cible mécaniste de la voie de la rapamycine (mTOR).

Ces voies stimulent la croissance et la survie des cellules cancéreuses, souvent en stimulant la signalisation MAPK, ce qui, augmente la phospho-ERK, et conduit à son tour à une transcription améliorée des gènes de réponse [73,76,83].

Les facteurs de croissance qui se lient à leurs récepteurs EGFR activent les facteurs d'échange de guanine (GEF) tels que SOS qui sont attachés par la protéine adaptatrice GRB2, SOS stimule la libération du

GDP lié par le RAS, conduisant à l'activation du RAS-GTP. Les protéines activant la GTP ase (GAP) peuvent se lier au RAS-GTP et accélérer la conversion du RAS-GTP en RAS-GDP (guanosine diphosphate). Le RAS activé régule plusieurs fonctions cellulaires via des effecteurs, notamment la voie Raf-MEK-ERK, PI3K, RALGDS, le gène de type RALGDS (RLG) et RGL2 [79] (**Figure 10**).

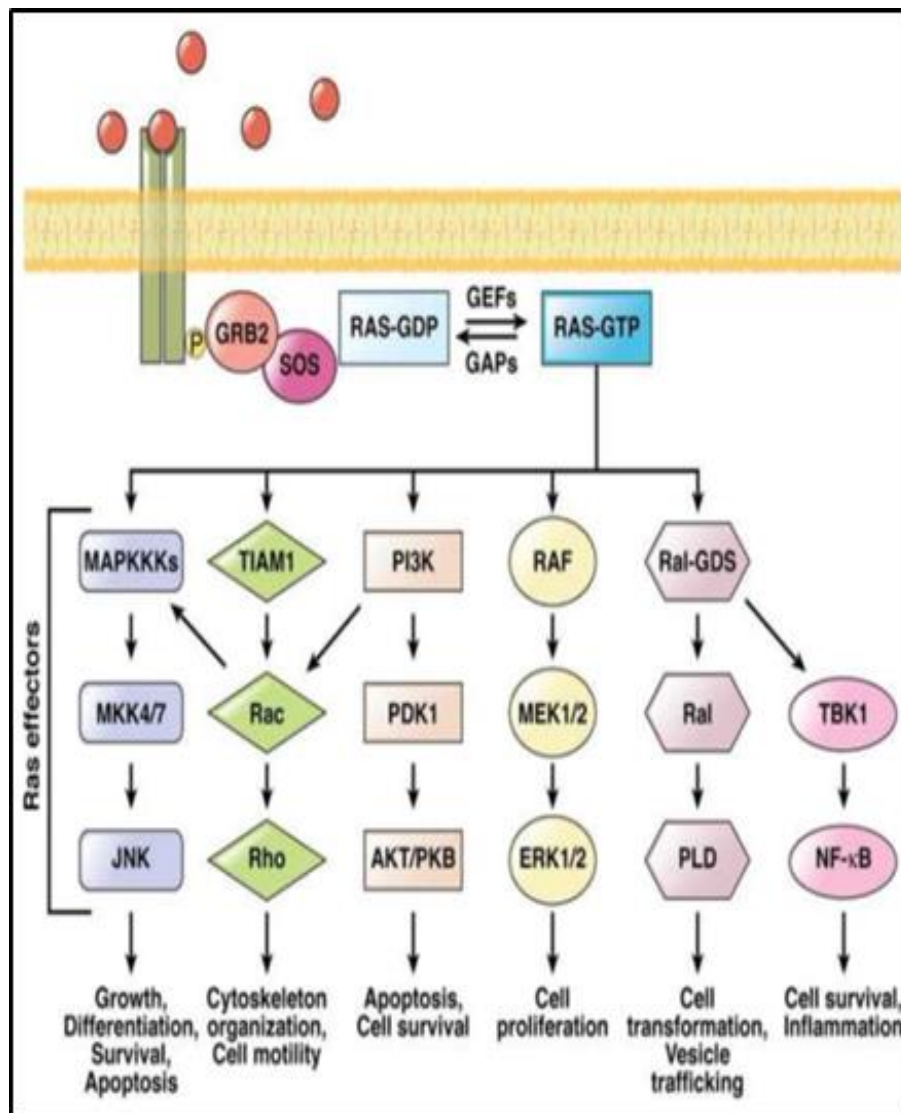


Figure 10. La voie de signalisation RAS.

1.3.2.1.5 Les gènes PI3K/AKT

Le mutant KRAS exerce également son effet en stimulant la prolifération via la voie PI3K/AKT. Le statut mutationnel de PI3K (la cible phosphoinositide 3-kinases) est un marqueur pronostique potentiel dans le CCR, car les mutations dans la sous-unité alpha catalytique de PI3K sont fréquemment associées à des mutations du KRAS et associées à un mauvais pronostic dans le CCR [80]. Le KRAS de type sauvage activé et le KRAS mutant activé de manière constitutive se lient directement au PI3K qui est activé lui aussi par le RAS, fini par générer des messagers lipidiques secondaires PIP3 dans la membrane. Ce signal peut se propager en aval à

travers plusieurs molécules effectrices, notamment, dans les cellules du CCR où il a été démontré que les mutations du KRAS conduisent à une signalisation du MAPK anormalement élevée [81,82].

Les mutations activatrices de PIK3CA, le gène codant pour la sous-unité catalytique de PI3K, sont identifiées comme de nouveaux mécanismes d'induction de la signalisation oncogène de PI3K. Le PIK3CA est somatiquement muté dans plus de 25 % des cancers colorectaux [83].

1.3.2.1.6 Le gène PTEN

Le gène PTEN est une phosphatase qui régule négativement la voie de signalisation PI3K/AKT en déphosphorylant le PIP3 pour inhiber l'activation de l'AKT via l'hyperactivation de la signalisation PI3K [84]. Le gène PTEN s'active dans le cas du cancer et il a pour rôle de protéger le génome (citez le génome) de l'instabilité. Des études cliniques ont montré que lors d'une mutation PI3KCA, il y aurait une résistance aux inhibiteurs monoclonaux de l'EGFR, au cétuximab ou au panitumumab, alors que d'autres études n'avaient pas confirmé cet effet. De plus, l'inactivation de PTEN est associée soit à un manque de réponse tumorale, soit à une survie globale défavorable. Dans les deux cas, ces données indiquent que l'évaluation concomitante de l'état moléculaire des voies PIK3CA/PTEN et KRAS permet d'identifier jusqu'à 70 % des patients atteints de CCRm et les moins susceptibles de répondre aux anti-EGFR [83].

1.3.2.1.7 Le gène BRAF

1.3.2.1.7.1 Le rôle oncogénique de la protéine BRAF

L'oncogène BRAF, situé sur le bras long du chromosome 7, code pour une protéine BRAF appartenant à la famille des sérine/thréonine kinases RAF (ARAF, BRAF et CRAF). Cette protéine interagit fortement dans la régulation de la voie de signalisation RAS/ MAP kinase/ERK, qui affecte la division, la différenciation, la migration, la survie et l'angiogenèse cellulaire. Les protéines RAF activées conduisent à la phosphorylation et à l'activation des protéines (MAPK-ERK-Kinase) et MEK2, qui à leur tour, phosphorylent et activent ensuite les ERK1 (Extracellular signal-Related Kinase) et ERK2. Une fois activées, les protéines ERK vont pénétrer dans le noyau où elles vont stimuler l'expression des gènes impliqués dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire (**Figure 11**)[85].

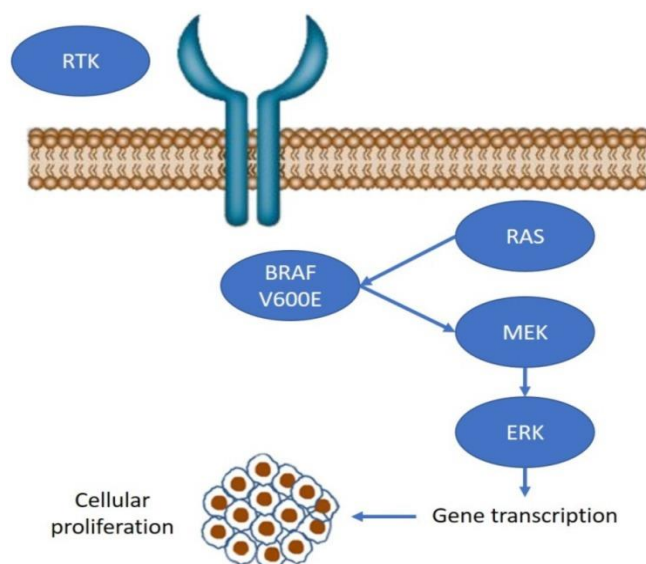


Figure 11. Voie de la protéine kinase activée par un mitogène (MAPK) dans le cancer colorectal métastatique (CCRm) avec la mutation BRAF V600E. Cette voie est essentielle pour comprendre les mécanismes de la prolifération cellulaire dans le CCRm [85].

1.3.2.1.7.2 La mutation BRAFV600E : définition et prévalence

Le gène BRAF V600E est une mutation activatrice qui représente environ 90 % de toutes les mutations BRAF observées dans le CCR [86]. Il résulte de la transversion de la thymidine en adénine située au niveau de l'exon 15 du gène, en position 1 799 (c.1 799T>A), provoquant une substitution de la valine en glutamate qui conduit à l'activation constitutive de la MEK et à une prolifération cellulaire non inhibée indépendante de l'EGFR [87]. Les mutations BRAF et KRAS/NRAS s'excluent mutuellement dans le CCR [87,88]. Ce fait conforte l'hypothèse selon laquelle le gène BRAF est le principal effecteur de KRAS/NRAS dans la voie MAPK et que les deux mutations ont des effets équivalents sur la tumorigenèse [89]. Les mutations somatiques de BRAF ne sont présentes que dans 5 à 10 % des CCR où celles-ci correspondent majoritairement à la mutation V600E [90].

1.3.2.2 La voie d'instabilité des microsatellites

1.3.2.2.1 Définition

Les microsatellites sont des séquences d'ADN répétitives qui ne codent pas pour des protéines, avec une longueur allant d'une à dix paires de bases nucléotidiques. En raison de leur forte susceptibilité aux mutations lors de la réplication de l'ADN, ils constituent un lieu courant pour les erreurs d'ADN. Le système de réparation des mésappariements englobe quatre protéines (MLH1, PMS2, MSH2 et MSH6) chargées de détecter et de corriger ces erreurs, qui agissent comme des hétérodimères fonctionnels (MLH1/PMS2 et MSH2/MSH6) [91].

L'instabilité des microsatellites (MSI) est un phénotype moléculaire dû à un système de réparation des mésappariements d'ADN défectueux et on la retrouve dans 10 à 15 % des cancers colorectaux sporadiques (CRC) [92]. Les cas sporadiques de MSI sont causés par l'inactivation des gènes MMR par des mutations somatiques ou par un silençage épigénétique (par exemple, hyperméthylation somatique du promoteur MLH1), fréquemment associées à des mutations BRAF. La MSI-high est une caractéristique du syndrome de Lynch, également connu sous le nom de CRC héréditaire sans polypose (HNPCC), un syndrome génétique autosomique dominant caractérisé par un risque accru de développer certains types de cancers, en particulier le CCR et les cancers de l'endomètre [91].

On distingue 3 types de MSI définis en fonction de sa fréquence : une haute instabilité microsatellitaire (MSI-H), une faible instabilité microsatellitaire (MSI-L) et une stabilité des microsatellites (MSS) [93].

1.3.2.2.2 Le système de réparation des mésappariements d'ADN (MMR)

Le système efficace de réparation des mésappariements (MMR) qui préserve la stabilité des microsatellites (MSS) est défini par la présence de protéines fonctionnelles impliquées dans cette machinerie de réparation de l'acide désoxyribonucléique (ADN). Ce système (MMR) vise à corriger les erreurs commises lors de la synthèse de l'ADN par les polymérases, erreurs non corrigées lors de son activité d'édition et par les mésappariements de bases générés lors de la réplication et de la recombinaison de l'ADN [94]. Il s'agit de la protéine MutS homologue 2 (MSH2), la protéine MutS homologue 3 (MSH3), l'homologue 6 de la protéine MutS (MSH6), l'homologue 1 de la protéine mutL humaine (MLH1), la ségrégation post-méiotique accrue de l'homologue 1 (PMS1) et de l'homologue 2 de PMS1 (PMS2).

Ces protéines fonctionnent en dimères, MSH2 avec MSH6 ou MSH3 et MLH1 avec PMS2, pour analyser l'ADN et identifier les mésappariements base-base (AC ou AG au lieu d'AT) et les boucles d'insertion/délétion [95,96]. MSH6 et MSH2 forment le complexe MutS α , qui identifie les mésappariements d'une seule base. Lors de la reconnaissance des mésappariements d'une base unique par MutS α , l'hétérodimère se lie au complexe MutL α formé par MLH1 et PMS2 [97].

L'interaction de MutL α avec les complexes MutS via MLH1 est essentielle pour la coordination des événements de réparation en aval, de même que l'antigène nucléaire cellulaire en prolifération (PCNA) est impliqué dans l'initiation du ROR car il interagit avec MutS α et MutS β [98].

Le PCNA active également MutL α dont l'activité endonucléase est requise pour l'excision des bases mésappariées par l'exonucléase I [97,98]. Ensuite, la polymérase δ , assistée par PCNA, peut effectuer une resynthèse de l'ADN et un nouveau brin d'ADN est scellé par l'ADN ligase I. Les boucles d'insertion-délétion sont reconnues par le complexe MutS β à partir de l'hétérodimère MSH2-MSH3. MutS β se lie à MutL α pour réparer les mésappariements en utilisant le même processus qu'un mésappariement à base unique (**Figure 12**) [94,95,99].

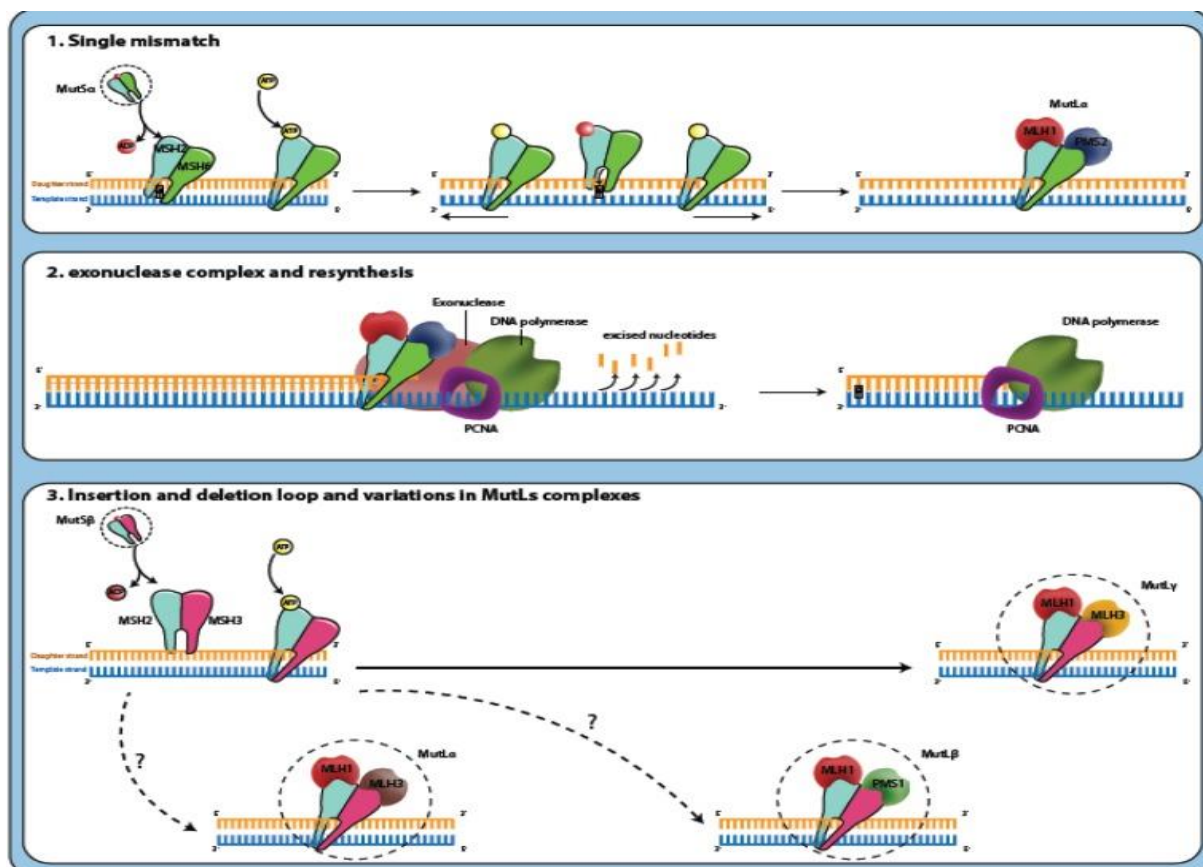


Figure 12. Mécanisme du système de réparation des mésappariements [100].

1.3.3 La voie festonnée /CIMP : séquence d'adénome festonné à carcinome

Contrairement à la voie conventionnelle adénome-carcinome, une voie alternative, caractérisée par la présence d'adénomes/polypes festonnés comme lésions précurseurs, a été documentée au cours des 10 dernières années [101]. Il a été estimé que 15 à 30 % de tous les CCRs résultent de lésions néoplasiques festonnés précoces. Ces lésions, caractérisées histologiquement par un aspect « festonné » ou (en dents de scie) des cryptes glandulaires épithéliales au sein des polypes précurseurs ont longtemps été considérées comme inoffensives [101,102].

Au niveau moléculaire, les lésions colorectales festonnées présentent rarement des mutations APC. La majorité des CCRs résultant de lésions festonnées sont porteuses de mutations BRAF tandis que les mutations KRAS restent moins fréquentes. Ils sont également associés à deux

voies, à savoir le MSI et le phénotype de méthylation épigénétique des îlots CpG (CIMP) qui sont impliqués dans l'instabilité génomique. Ce dernier étant considéré comme le mécanisme majeur qui entraîne la voie festonnée vers le CCR, est divisé en CIMP-H et CIMP-L en fonction du degré de méthylation du gène [103]. Dans l'ensemble, les CCRs ont été classés en cinq sous-types moléculaires en fonction de leur statut MSI et CIMP, parmi lesquels les trois signatures suivantes décrivent des lésions festonnées [37] :

- ✓ CIMP-H, MLH1 méthylé, MSI, lésions de BRAF muté, connues sous le nom de MSI sporadiques;
- ✓ CIMP-H, MLH1 partiellement méthylé, MSS, lésions de BRAF muté ;
- ✓ CIMP-L, MGM méthylé, MSS, lésions de KRAS muté.

1.3.3.1 Caractéristiques histopathologiques et endoscopiques des lésions colorectales festonnées

La néoplasie festonnée du CCR représente l'un des sous-types de CCR classés histologiquement par l'organisation mondiale de la santé (OMS) en trois catégories morphologiques : (a) polype hyperplasique (HP), (b) adénome/polype festonné sessile (SSA/P) avec ou sans dysplasie cytologique (SSAD) et (c) l'adénome/polype festonné traditionnel (TSA) (**Figure 13**) [104].

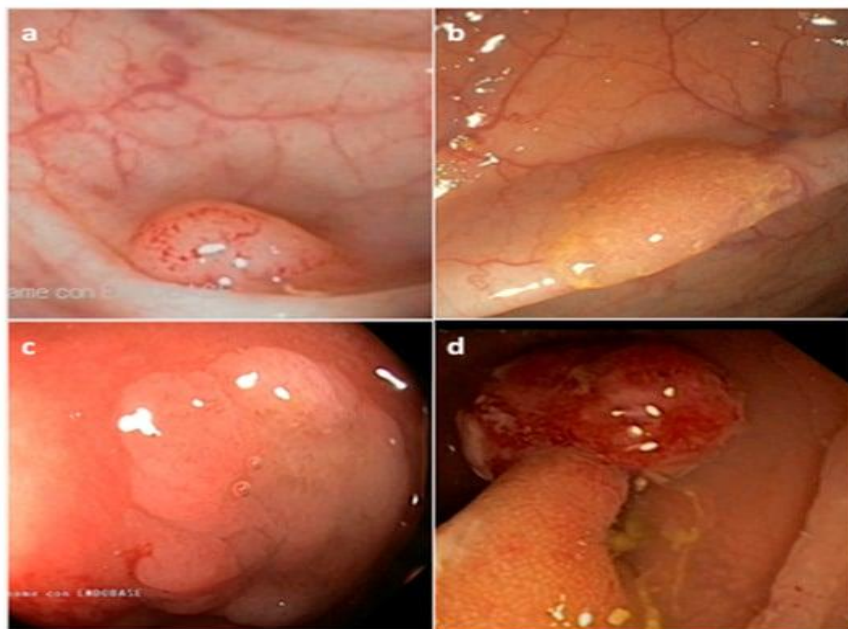


Figure 13. Aspect endoscopique représentatif des lésions festonnées du cancer colorectal.

(a) Polype hyperplasique ; (b) Adénome/polype festonné sessile ; (c) Adénome/polype festonné sessile avec dysplasie ; (d) Adénome festonné traditionnel [29].

1.3.3.2 Altérations moléculaires dans la séquence d'adénome festonné à carcinome

Les mécanismes carcinogénétiques colorectaux qui conduisent à la transformation maligne de la muqueuse normale du côlon en polype festonné, puis en carcinome, peuvent être distingués selon des voies festonnées traditionnelles et sessiles respectivement TSA et SSA/P, basées sur les lésions impliquées dans le processus oncogène et sur différentes molécules. Elles sont caractérisées par des mutations BRAF ou KRAS, l'hyperméthylation des îlots CpG et le statut MSI (Figure 14) [105,106].

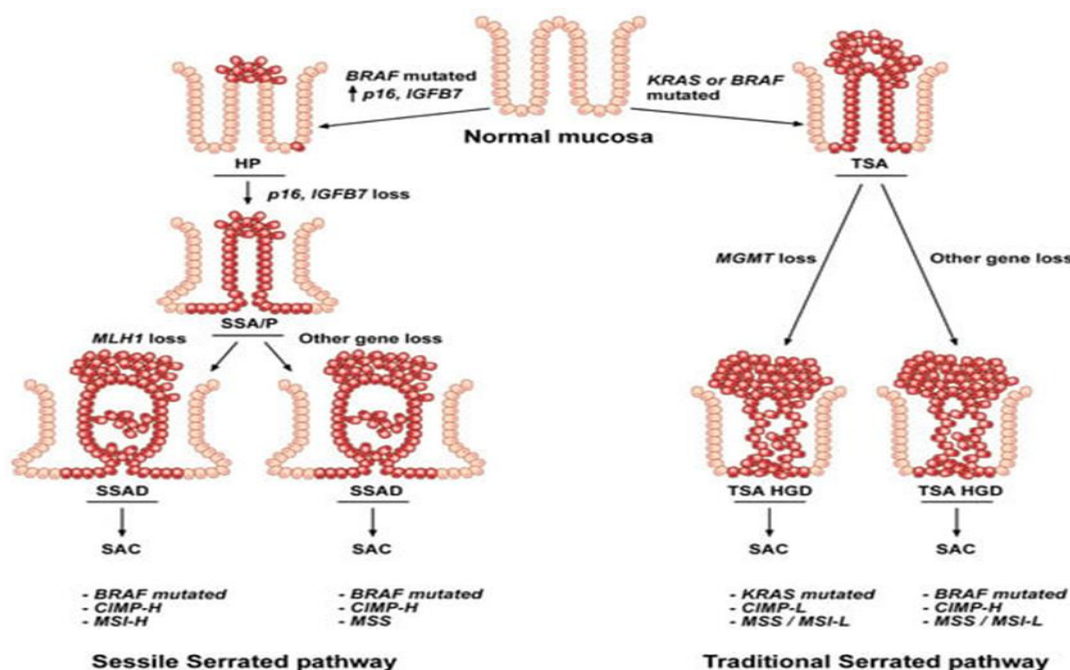


Figure 14. Présentation des deux voies festonnées [29].

Comme la séquence conduisant au cancer colorectal festonné (CCR) peut se produire selon deux voies moléculaires différentes, la voie sessile et la voie festonnée traditionnelle, le processus tumorigène implique une accumulation progressive de modifications génétiques et épigénétiques spécifiques affectant les cellules épithéliales normales du côlon. Dans la voie sessile festonnée, la transformation de la muqueuse normale commence par des mutations de BRAF, suivies par une hyperméthylation des promoteurs p16 et IGFBP7 et la progression ultérieure vers un adénocarcinome festonné, principalement par des altérations épigénétiques de MLH1. En revanche, la voie festonnée traditionnelle implique des mutations KRAS ou BRAF dans les cellules normales du côlon qui, associée à la mutation MGMT ou à d'autres altérations de la méthylation des gènes, évolue de manière maligne vers une dysplasie de haut grade d'adénome festonné traditionnel (TSA) puis vers un adénocarcinome festonné (SAC) [29].

1.4 Les Facteurs de risque de cancer colorectal

Le développement du cancer colorectal est associé à des facteurs de risque modifiables et non modifiables. Les antécédents familiaux et individuels (sexe, âge, race, antécédents de maladie inflammatoire de l'intestin (MICI)) et les antécédents familiaux sont des facteurs non modifiables car ils ne peuvent pas être contrôlés par l'individu alors que les facteurs modifiables sont associés aux habitudes et au mode de vie de l'individu et dont l'altération peut réduire le risque de CCR.

1.4.1 L'âge

Le principal facteur de risque de cancer colorectal est l'âge et c'est au-delà de la cinquantaine, que le risque de développer un CCR augmente, tandis qu'en dehors des cancers héréditaires, il est rare que le cancer colorectal apparaisse en dessous de cinquante ans [107,108].

1.4.2 Les antécédents familiaux

Le risque de développer un CCR se voit considérablement augmenté lorsqu'il existe des antécédents familiaux du cancer colorectal. Des études épidémiologiques ont signalé un risque deux fois plus élevé de CCR chez les parents au premier degré de patients atteints de CCR. [109,110].

Les chercheurs ont estimé que 2 à 8 % des cas de CCR sont issus de syndromes héréditaires. Les formes les plus courantes de CCR d'origine génétique (héréditaire) comprennent les mutations germinales du gène APC (polypose adénomateuse familiale) et les mutations germinales des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (syndrome de Lynch) [111].

1.4.3 Le diabète sucré

Le diabète sucré est un trouble métabolique complexe caractérisé par une hyperglycémie chronique due à une sécrétion d'insuline insuffisante et/ou à une résistance à l'insuline. La recherche sur l'incidence des troubles métaboliques suggère que le diabète est un facteur de risque indépendant de plusieurs cancers gastro-intestinaux, dont le cancer colorectal [112,113]. Des études épidémiologiques ont montré que les personnes atteintes de diabète sucré de type 2 ont environ deux à trois fois plus de risques de développer un CCR que les personnes non diabétiques [114].

1.4.4 L'obésité

L'obésité est associée à un risque élevé de CCR. Une méta-analyse a révélé que les hommes et les femmes en surpoids ont respectivement environ 50 % et 20 % plus de risques de développer

un CCR que les personnes ayant un poids normal. Le risque global de CCR augmente de 3 % pour chaque cinq kilogrammes de gain de poids [115].

1.4.5 Le régime alimentaire

Une consommation élevée de viande rouge et/ou transformée et de boissons sucrées est associée à un risque accru de CCR, tandis que les légumes, les fruits, les fibres et le calcium sont liés à un risque plus faible d'atteinte de CCR [116].

1.4.6 La consommation d'alcool et de tabac

Il a également été démontré que le tabagisme et la consommation d'alcool font augmenter le risque de CCR [110,117].

1.4.7 L'aspirine et les médicaments anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS)

L'utilisation à long terme des AINS et de l'aspirine a montré un rôle protecteur contre le développement de CCR [118]. Les directives de l'American College of Gastroenterology (ACG) fournissent une recommandation conditionnelle pour l'utilisation de l'aspirine pour la prévention du CCR chez les patients âgés de 50 à 64 ans [119,120].

1.4.8 L'inactivité physique

L'inactivité physique et l'obésité, facteurs de risque modifiables et interdépendants, représentent environ un quart à un tiers des cas de CCR. Plusieurs études montrent que des niveaux réduits de l'activité physique augmentent le risque d'atteinte de CCR jusqu'à 50 % [117].

1.4.9 Le genre et les facteurs socioéconomiques

Selon la Société Américaine du Cancer, le risque de développer un cancer colorectal chez les hommes est d'environ 30 % plus élevé que chez les femmes. De plus, les hommes qui reçoivent un diagnostic de cancer colorectal ont un pronostic plus sombre et un taux de mortalité d'environ 40 % plus élevée que chez les femmes [117]. En revanche, les femmes sont plus susceptibles de développer un cancer du côlon droit, qui est souvent diagnostiqué à un stade plus avancé et qui semble plus agressif que les tumeurs du côté gauche [121,122].

On pense que les personnes ayant un statut socio-économique (SSE) faible ont généralement un risque plus élevé de développer un cancer que celles ayant un SSE élevé. Cela peut s'expliquer en partie par un accès limité aux services de santé et aux ressources de traitement de qualité, ainsi que par des habitudes alimentaires malsaines, par un mode de vie sédentaire et par le fléau du tabagisme dans les populations à faible statut socio-économique [116,118,123].

1.5 La classification du cancer colorectal

1.5.1 La classification traditionnelle TNM du cancer colorectal

Après un diagnostic du CCR, la stadification clinique et pathologique devient nécessaire pour déterminer l'étendue locale et distante de la maladie, ce qui fournit à son tour un cadre pour déterminer le pronostic et le traitement. Le système de stadification des métastases ganglionnaires tumorales (TNM) AJCC-UICC (8^{ème} édition, 2017) (**Tableau 1**) reste la référence en matière de pronostic du CCR nouvellement diagnostiqué. La classification TNM est basée sur trois critères : la taille de la tumeur, la croissance des ganglions lymphatiques et les métastases à distance dans les organes et/ou les tissus (**Figure 15**) ([124,125]).

Tableau 1 : Les stades du cancer colorectal selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8^{ème} édition [124].

T	Tumeur primitive
Tis	Carcinome <i>in situ</i> , tumeur intra-muqueuse envahissant la <i>lamina propria</i> (chorion) sans extension à travers la musculaire muqueuse à la sous-muqueuse
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-coliques et péri-rectaux non péritonisés
	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral
T4	T4a : tumeur perforant le péritoine viscéral *
	T4b : tumeur envahissant directement des autres organes ou structures de voisinage **
N	Adénopathies régionales
Nx	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
	Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux ***
	N1a : métastase dans 1 ganglion lymphatique régional
N1	N1b : métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux
	N1c : nodule(s) (ou) dépôt(s) tumoral(aux) « satellites » dans la sous-séreuse, ou dans les tissus coliques ou péri-rectaux non péritonisés, sans ganglion métastatique régional ****
	Métastases = 4 ganglions lymphatiques régionaux
N2	N2a : métastases dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
	N2b : métastases dans = 7 ganglions lymphatiques régionaux
M	Métastases à distance
M0	Pas de métastase(s) à distance
	Métastase(s) à distance
	M1a : métastase(s) localisée(s) à un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régionaux) sans métastase péritonéale
M1	M1b : métastases atteignant plusieurs organes sans métastase péritonéale
	M1c : métastase(s) péritonéale(s) avec ou sans métastases d'autres organes

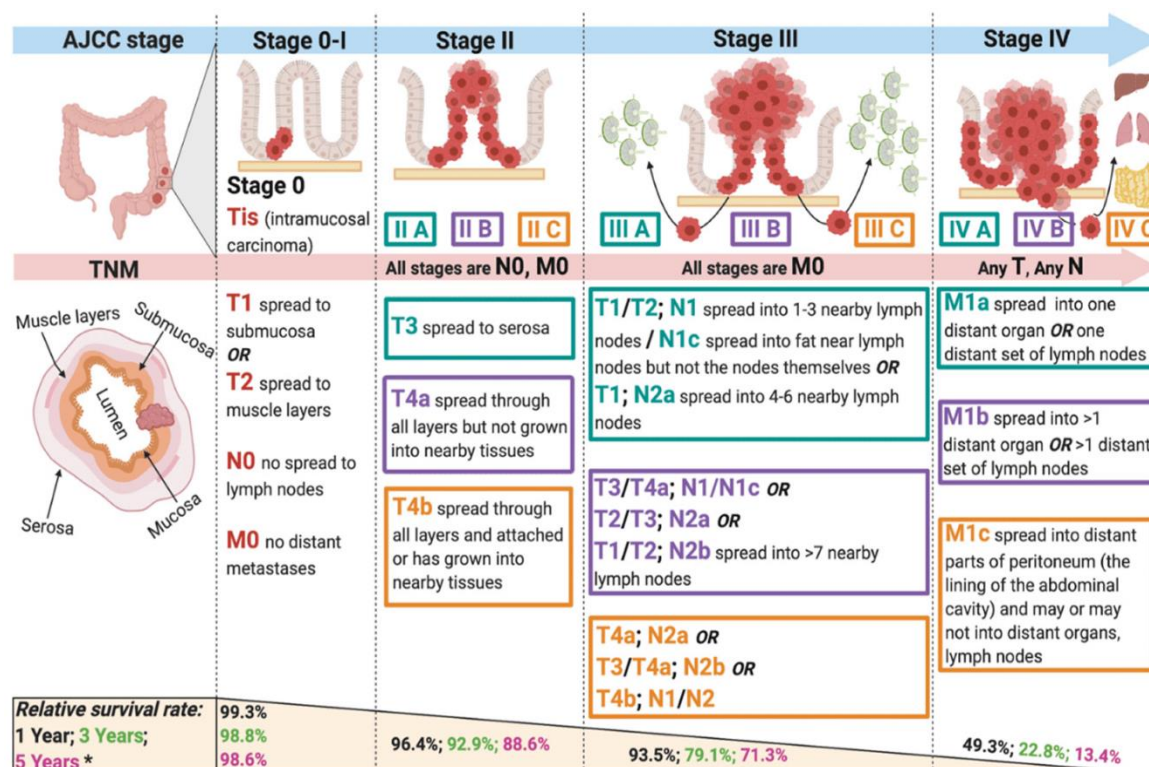


Figure 15. Les stades du cancer colorectal selon l'American Joint Committee on Cancer (AJCC), 8^{ème} édition [124,125].

1.5.2 La nouvelle classification consensuelle des sous-types moléculaires

Le CCR est traditionnellement classé selon ses caractéristiques cliniques et morphologiques en stades TNM (American Joint Committee on Cancer). Cependant, la diversité phénotypique de cette maladie et son comportement clinique ne sont pas suffisamment expliqués par la simple classification histologique des grades et moins encore par les facteurs cliniques actuellement utilisés. Les différences dans le comportement tumoral et la réponse au traitement dans les cas de CCR au même stade ont accru le besoin d'études sur l'expression génique et la création d'une classification moléculaire qui faciliterait une thérapie ciblée [126,127,128]. À cet égard, quatre sous-types de consensus moléculaires (CMS 1-4) (**Figure 16**) ont été introduits en 2015, sur la base de multiples caractéristiques moléculaires et en examinant la présence ou de l'absence de transition épithéliale-mésenchymateuse (EMT) [129].

Les tumeurs CMS1, identifiées chez 14 % des patients atteints de CCR sont associées à une instabilité des microsatellites (MSI-H), à un phénotype hyperméthylateur élevé (CIMP-High), à des tumeurs BRAF-muté et à une infiltration immunitaire importante. Le groupe CMS1 est également connu sous le nom de MSI immunisé du fait que la carcinogenèse semble être pilotée via les voies de signalisation JAK-STAT et PD-1 [129].

Le sous-type CMS2, identifié chez 37 % des patients de CCR est ce qu'on appelle le sous-type canonique. Ces tumeurs sont souvent associées à une instabilité chromosomique (CIN), marquées par des mutations somatiques fréquentes (SCNA high) et une activation de la voie WNT/MYC.

Le sous-type CMS3, identifié chez 13 % des patients de CCR présente des dérégulations métaboliques et des mutations KRAS fréquentes, ce sous-type comprend deux tiers des cas de tumeurs MSI-H et un tiers des cas de tumeurs (MSS) [129,131,132].

Enfin, le sous-type CMS4, identifié chez 23 % des patients de CCR est caractérisé par une signature épithéliale à mésenchymateuse (EMT) de même qu'il comprend les CCRs avec une infiltration stromale, angiogenèse et activation du facteur de croissance transformant β (TGF- β) [129,130,131,132,129].

Des différences dans l'expression des gènes ont également été notées parmi les tumeurs du côté « gauche », ainsi au sein des tumeurs transversales et les tumeurs du côté droit. L'analyse de 608 tumeurs a révélé une corrélation entre le CMS et le site tumoral. Plus précisément, le CMS 1 était associé à des tumeurs du côté droit, dont l'incidence augmentait de 29 % au cæcum à 41 % au côlon ascendant pour atteindre 52 % à l'angle hépatique. Alors que les tumeurs CMS 1 étaient moins fréquentes en dehors du côlon droit, les tumeurs CMS 2 étaient plus courantes dans la région sigmoïde et rectosigmoïde [130,131].

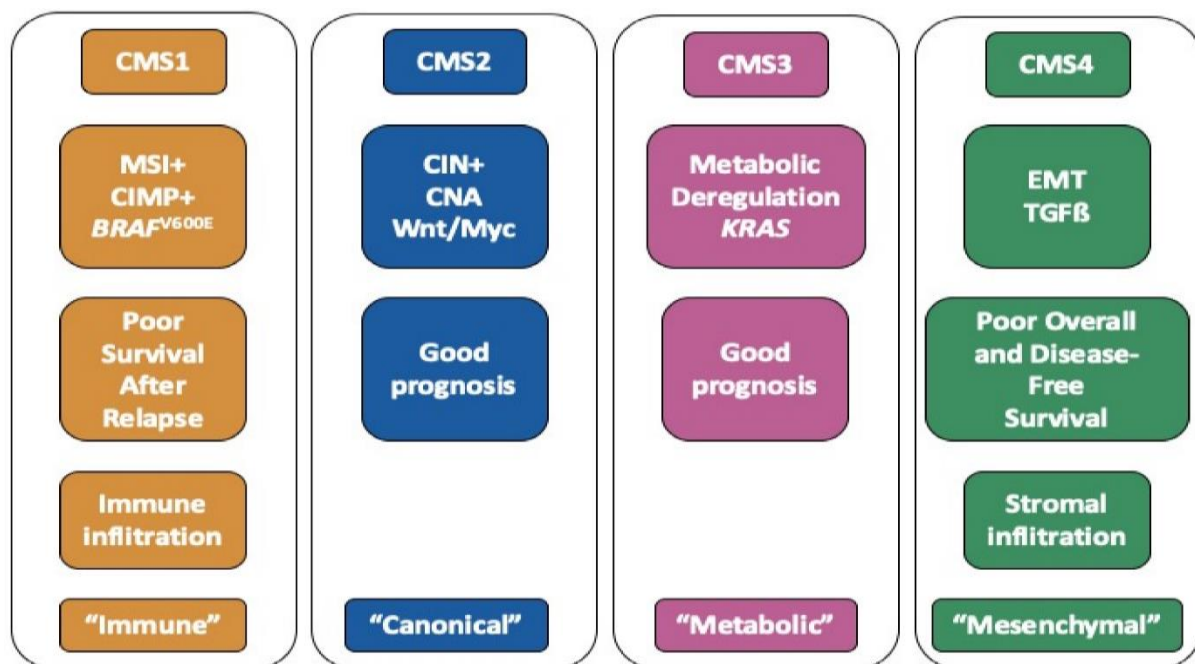


Figure 16. Résumé des caractéristiques de chaque sous-groupe de sous-types de consensus moléculaires (CMS) [129,132].

1.6 Traitement du cancer colorectal métastatique

Le nombre croissant de traitements possibles du CCRm, ainsi que l'utilisation de certains médicaments dans plusieurs lignes ou comme un traitement adjuvant, peuvent donner l'impression que le paysage thérapeutique est complexe.

Le choix du traitement est influencé par un nombre de variables, notamment les caractéristiques moléculaires de la tumeur, la cible du traitement, l'état de santé général du patient, la charge tumorale et l'évolution clinique.

1.6.1 La chirurgie

La seule option potentiellement curative du CCRm est la chirurgie radicale, qui doit être pratiquée lorsqu'elle est possible [123]. La chirurgie constitue peut-être une mesure d'éliminer complètement quelques foyers métastatiques du CCRm, souvent situés dans le foie ou dans les poumons. Lorsque la tumeur principale et toutes les métastases peuvent être réséquées d'une manière complète par la chirurgie, le CCRm est dit résécable. Cependant, l'infiltration ganglionnaire et la propagation micrométastatique secrète sont fréquentes chez ces individus, moins de 20 % des personnes atteintes de CCRm qui subissent une résection guérissent d'une manière définitive. Les oncologues des branches chirurgicale et médicale travaillent ensemble pour développer des stratégies de traitement lorsque le CCRm peut être résécable [30].

Les traitements ablatifs locorégionaux, tels que la radiothérapie, l'ablation thermique et la chimioembolisation, peuvent être associés à la chirurgie. Cependant, de 55 à 80 % des patients connaîtront une rechute après une résection métastatique [123,124,133].

Bien que la résection chirurgicale complète de la tumeur et de ses sites métastatiques améliore la survie globale (SG) des patients atteints de CCR, environ 25 % des CCR sont diagnostiqués à un stade avancé avec des métastases dans des organes distants, difficiles à gérer chirurgicalement [134]. Le CCR avancé non résécable est traité par chimiothérapie accompagnée d'une thérapie ciblée et/ou d'une radiothérapie pour réduire la taille de la tumeur et prolonger la survie du patient [135].

La chirurgie seule ou associée à la radiothérapie et à la chimiothérapie en traitement adjuvant, a permis d'améliorer la survie des patients atteints de CCR et le taux de survie à 5 ans pour le CCR est de 65 %. Cependant, comme ce taux diminue à 15 % pour le CCR métastatique (CCRm), le développement de nouvelles approches thérapeutiques du CCRm est critique [31,136,137].

1.6.2 La radiothérapie

Si la tumeur principale se situe dans le rectum, des radio-oncologues doivent être consultés en raison de la possibilité de recourir à un traitement adapté [30].

1.6.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie est le pilier du traitement systémique du CCRm. Les schémas de chimiothérapie consisteront généralement en une fluoropyrimidine (5-FU ou capécitabine) associée à un schéma thérapeutique à deux médicaments (doublet) avec l'irinotécan ou l'oxaliplatine. Les schémas thérapeutiques peuvent être à base de 5-FU ou de capécitabine et peuvent être à base d'oxaliplatine (FOLFOX ou CAPEOX) ou d'irinotécan (FOLFIRI ou CAPIRI) sans différence de survie [138,139,140]. Avec une efficacité similaire entre les combinaisons, les profils de toxicité peuvent distinguer le schéma thérapeutique optimal pour chaque patient [141].

De plus, l'évolution de la thérapie systémique a amélioré la survie du CCRm ou a permis la conversion du CCRm non résécable en résécable [142]. Lorsqu'une chimiothérapie est utilisée, le médecin doit donner au patient autant d'informations que possible sur les effets secondaires, car leur gravité dépend de divers facteurs, tels que le type de médicaments cytotoxiques utilisés et la durée du traitement [143]. Par conséquent, la gestion active des effets secondaires est cruciale afin que le patient puisse poursuivre le traitement chimiothérapeutique [141].

1.6.4 La thérapie ciblée

Plusieurs médicaments ciblés ont été développés et étudiés. Ces médicaments ciblent les molécules impliquées dans la carcinogenèse et leurs voies de signalisation associées dans les cellules cancéreuses qui les différencient des cellules normales [144]. De plus, le microenvironnement tumoral, y compris les vaisseaux sanguins dans les tissus entourant la tumeur et les cellules immunitaires, est également affecté par ces médicaments ciblés pour entraver la croissance tumorale et améliorer la surveillance et l'attaque immunitaires antitumorales [145]. Les principaux types de médicaments ciblés sont les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de petites molécules. Ces médicaments sont avantageux car, contrairement à la chimiothérapie, ils peuvent être choisis en fonction des caractéristiques moléculaires du type de la tumeur [146].

1.6.4.1 Les anti-EGFRS

1.6.4.1.1 Mécanisme moléculaire de la signalisation EGFR

L'EGFR est membre de la famille des récepteurs ErbB, une sous-famille de quatre récepteurs tyrosine kinases, dont l'EGFR (ErbB-1), HER2 (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) et HER4 (ErbB-4). Il se compose de domaines extracellulaires, transmembranaires et intracellulaires et régule la prolifération, la survie, la différenciation et la migration des cellules. La liaison des ligands au domaine extracellulaire de l'EGFR favorise la dimérisation du récepteur, activant les voies de signalisation en aval, telles que RAS/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt, JAK/STAT et PLC- γ /PKC, conduisant à l'activation de la transcription génique et jouant un rôle clé dans l'initiation et le développement et la progression du cancer [147]. Plusieurs tumeurs, y compris les CCRm, surexpriment l'EGFR et la signalisation aberrante de l'EGFR est associée à un mauvais pronostic, ainsi, ce récepteur est une cible prometteuse pour le traitement CCRm [148].

1.6.4.1.2 Cétuximab et Panitumumab

Le cétuximab, anticorps monoclonal chimérique souris-humain de la sous-classe IgG 1 et le panitumumab, anticorps monoclonal IgG 2 entièrement humain, sont des agents approuvés par la FDA ciblant l'EGFR. Ce sont tous deux des anticorps monoclonaux distincts et sont utilisés en monothérapie ou en association avec une chimiothérapie pour traiter les patients atteints de CCRm de type RAS sauvage [149]. Plusieurs rapports ont démontré que les réponses au cétuximab ou au panitumumab se produisent exclusivement chez les patients atteints de CCRm dépourvus de mutations de KRAS et de NRAS (les codons 12 et 13 de l'exon 2, les codons 59 et 61 de l'exon 3 et les codons 117 et 146 de l'exon 4) [150].

En particulier, même si environ 50 % des patients atteints de CCR présentent des mutations RAS [151], les patients présentant des mutations KRAS ne sont pas tous résistants au traitement ciblé anti-EGFR [152]. Il existe des rapports contradictoires concernant la mutation G13D du codon KRAS, plusieurs études rétrospectives ont démontré que le cétuximab confère des avantages cliniques aux patients atteints de CCRm muté par le codon G13D de KRAS par rapport aux patients porteurs d'autres mutations KRAS [153,154].

Il est important de noter que le côté tumoral a été identifié comme un facteur pronostique important et a été trouvé dans plusieurs études cliniques. Les patients atteints de KRAS/RAS de type sauvage ayant des tumeurs du côté droit sont associés à une mauvaise réponse au traitement anti-EGFR par rapport aux tumeurs du côté gauche, quel que soit le traitement de première ligne administré [155,156].

1.6.4.2 Les anti-VEGFR

L'angiogenèse est le processus par lequel de nouveaux vaisseaux sont formés ou reformés à partir de vaisseaux existants, et l'angiogenèse tumorale joue un rôle important dans la croissance tumorale. La voie de signalisation VEGF/VEGFR est reconnue comme l'un des facteurs les plus prédominants contribuant à l'angiogenèse tumorale, qui participe aux multiples processus de progression tumorale en activant les cellules endothéliales vasculaires de l'hôte [157].

Bien qu'une stratégie ciblée VEGF/VEGFR ait été utilisée chez les patients atteints de CCR avec ou sans mutations RAS, les patients atteints de CCRm gauche et de CCRm droit avec des mutations KRAS/NRAS/BRAF doivent faire l'objet d'une stratégie ciblant les voies de signalisation VEGF/VEGFR.

1.6.4.2.1 Mécanisme moléculaire de la signalisation VEGF/VEGFR

Les protéines de la famille VEGF et VEGFR sont des facteurs clés de la croissance tumorale et des métastases qui régulent l'angiogenèse tumorale normale et pathologique, conduisant à l'activation de plusieurs voies de signalisation. La famille VEGF se compose de cinq membres (VEGF-A, B, C, D et facteur de croissance du placenta [PlGF]) qui se lient aux cellules endothéliales via les VEGFR, notamment VEGFR-1, VEGFR-2 et VEGFR-3 [158]. Les VEGF provoquent la dimérisation du VEGFR, qui active la tyrosine kinase intrinsèque, conduisant à l'activation de voies de signalisation, telles que RAS/Raf/MEK/ERK, PI3K/Akt et PLC- γ /PKC, pour améliorer l'angiogenèse et la prolifération tumorale. Parmi eux, VEGFR-1 et VEGFR-2, qui sont des récepteurs courants du VEGF-A, sont considérés comme des cibles prometteuses contre le cancer en milieu clinique [159].

1.6.4.2.2 Bévacizumab

Le bevacizumab est un anticorps monoclonal humanisé (IgG1) anti-VEGF-A qui inhibe la liaison du VEGF-A au VEGFR-1 et au VEGFR-2, et il est approuvé par la FDA pour traiter le CCRm [160]. Bien que certains essais cliniques utilisant le bevacizumab avec une chimiothérapie aient montré une amélioration partielle de la survie globale ou de la survie sans progression, le bevacizumab associé à la chimiothérapie est aussi efficace chez les patients atteints de CCRm de type KRAS sauvage que ceux atteints de KRAS mutant [161].

1.6.4.2.3 Ramucirumab

Le ramucirumab est un anticorps monoclonal (IgG1) anti-VEGF-A entièrement humain qui inhibe en aval le VEGFR-2 et ses voies d'angiogenèse. Il a été approuvé par la FDA pour une utilisation de deuxième ligne en association avec FOLFIRI pour les patients atteints de CCRm

qui ont progressé pendant ou après un traitement par bevacizumab, oxaliplatine et fluoropyrimidine [105,141,162].

1.6.5 Immunothérapie

Le but de l'immunothérapie est d'utiliser le système immunitaire pour lutter contre le cancer. Pour les patients atteints de CCRm déficient en réparation des mésappariements (dMMR) ou MSI-H (dMMR/MSI-H), les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires (ICI) se sont révélés être un traitement très efficace. Le MSI peut être utilisé comme un facteur prédictif de l'efficacité du traitement Anti-PD1 (mort programmée 1 (PD-1)) chez les patients atteints d'un cancer colorectal métastatique. Les ICI modifient l'interaction des cellules T, des cellules présentatrices d'antigène et des cellules tumorales pour aider à déclencher des réponses immunosuppressives. La FDA a approuvé le pembrolizumab et le nivolumab (avec ou sans Ipilimumab) pour le traitement de ces patients en raison de leurs réponses efficaces, stables et durables [30].

Le récepteur de mort programmée 1 est une molécule immunosuppressive importante qui se trouve à la surface des cellules T. Le ligand (PD-L1) de la surface des cellules tumorales se lie au PD-1 de la surface des cellules T pour inhiber leur croissance. L'immunité affaiblit la destruction des cellules tumorales par les lymphocytes T, et le traitement anti-PD-1 peut avoir un effet antitumoral (**figure 17**) [163].

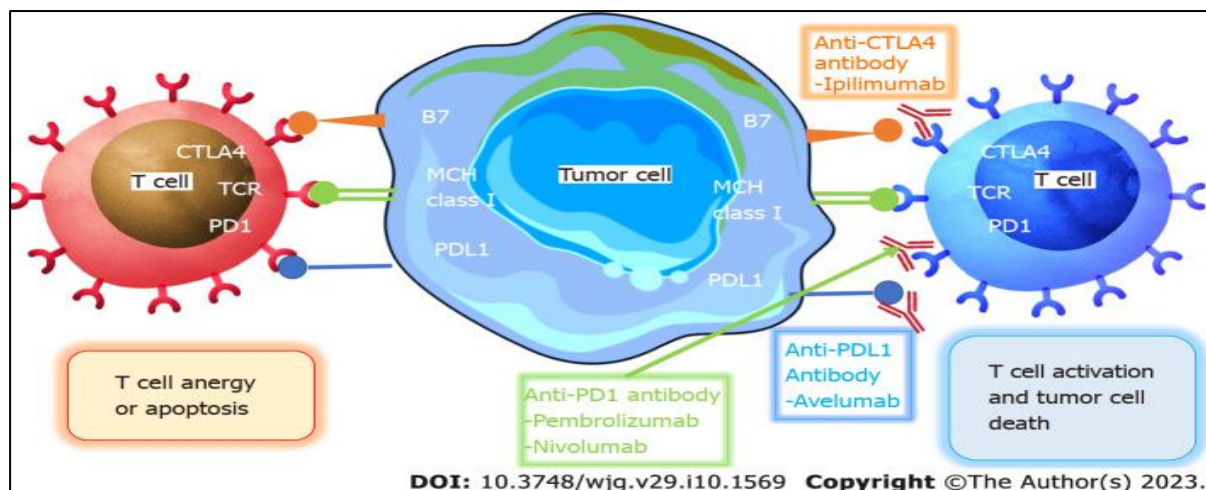


Figure 17. Traitement par les inhibiteurs de points de contrôle immunitaires pour le cancer colorectal métastatique [30].

CTLA4 : protéine 4 associée aux lymphocytes T cytotoxiques ; MHC : Complexe majeur d'histocompatibilité ; PD-1 : protéine de mort cellulaire programmée 1 ; PD-L1 : ligand mortel programmé ; TCR : Récepteur des lymphocytes T.

1.6.6 Les facteurs prédictifs de l'efficacité des agents anti-EGFR

1.6.6.1 Les mutations KRAS et NRAS

Les mutations activatrices de KRAS et NRAS sont prédictives de la résistance aux agents anti-EGFR chez les patients atteints de CCR [164], le KRAS est muté dans 40 à 50 % des CCR et le NRAS dans 4 à 8 % [165]. Les recommandations pour les tests de mutation RAS incluent les exons de KRAS 2, 3 et 4 (codons 12, 13, 59, 61, 117 et 146) et les exons de NRAS 2, 3 et 4 (codons 12, 13, 59, 61 et 117) [154,150]. Les patients atteints de type sauvage KRAS / NRAS (WT) sont éligibles aux traitements ciblant l'EGFR.

1.6.6.2 La mutation PIK3CA et PTEN

L'activation constitutionnelle de la voie PI3K/Akt/mTOR via la mutation PIK3CA de l'exon 20 ou l'inactivation de PTEN, pourrait participer à la résistance aux anticorps monoclonaux (mAbs) [166,167].

1.6.6.3 Les mutations activatrices HER2, HER3 ou MET et HER2

De plus, les mutations activatrices HER2, HER3 ou MET et HER2 semblent être associées à la résistance au traitement anti-EGFR (**Figure 18**) [168,169].

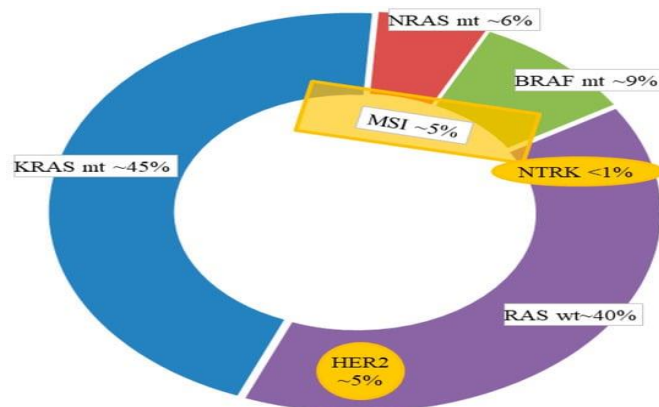


Figure 18. Cibles moléculaires dans le cancer colorectal métastatique [175].

1.7 Considérations générales sur le traitement basé sur des biomarqueurs moléculaires prédictifs et pronostiques

En cas de maladie métastatique, le profil moléculaire du CCR est devenu un prérequis pour une prise de décision thérapeutique optimale et repose sur un niveau de preuve élevé.

Les altérations moléculaires les plus affectées et qui devraient être explorées sont les mutations du sarcome du rat Kirsten (KRAS) et du sarcome du rat Neuroblastoma (NRAS) survenant dans environ 45 % des cas de CCR, les mutations de BRAF dans 9 % des cas, l'amplification de

HER2 dans 4 % des cas et le déficit de réparation des mésappariements (MMRd)/instabilité des microsatellites (MSI-H) dans environ 5 % des cas, ainsi que de nombreuses autres formes qui se produisent à une fréquence inférieure à 5 %. Les tests initiaux sont largement établis pour les mutations des gènes RAS et BRAF ainsi que MMRd/MSI-H en raison de leur valeur prédictive et/ou pronostique élevée [154].

1.7.1 RAS

Les mutations RAS sont des biomarqueurs prédictifs cruciaux pour le choix thérapeutique du traitement par anticorps EGFR dans le CCRm. Les résultats de plusieurs essais randomisés contrôlés ont montré que les patients atteints de CCRm avec RAS de type sauvage présentent une réponse au traitement significativement améliorée lorsqu'ils sont traités par chimiothérapie en association avec un traitement par anticorps monoclonaux ciblant l'EGFR, par rapport à ceux qui hébergeaient des mutations RAS [170,171]. Il est important de noter que les mutations BRAF du codon V600E et les mutations RAS s'excluent mutuellement [87,88].

1.7.2 BRAF

Les mutations BRAF, principalement la mutation BRAF V600E, ont un impact pronostique négatif élevé [172]. Par rapport à d'autres mutations BRAF plus rares des codons D594 et G596, les mutations BRAF V600E ont été détectées plus fréquemment dans les tumeurs primitives du côté droit avec des métastases péritonéales [173].

De plus, bien que le BRAF n'est pas associé à des mutations germinales MMR, le CCRm avec des mutations BRAF V600 est fréquemment présent avec des MSI [174].

1.7.3 MMRd/MSI-H

Le statut MMRd/MSI-H est associé à un fardeau mutationnel tumoral élevé et, par conséquent, pertinent en tant que prédicteur positif de l'inhibition du point de contrôle immunitaire (ICI) dans le traitement de première et de deuxième intention du CCR [175].

En cas de maladie réfractaire, d'autres marqueurs moléculaires, notamment HER-2 et PIK3CA, peuvent être explorés pour identifier des approches ciblées, supplémentaires [176,177].

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Matériel

Notre recherche a porté sur une série prospective de 946 cas de cancers colorectaux diagnostiqués au sein du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques et de Pathologie Moléculaire du CHU Mustapha (Alger) entre 2017 et 2021. L'objectif principal était d'analyser les caractéristiques clinicopathologiques et moléculaires des patients atteints de CCR au stade métastatique.

• Critères d'inclusion

- ✓ **Population étudiée** : Les échantillons ont été collectés à partir de biopsies ou de pièces opératoires de résection colique et/ou rectale à des stades avancés et présentant des grades variés de différenciation tumorale.
- ✓ **Caractéristiques analysées** :
 - Âge et sexe des patients.
 - Site tumoral primaire (côlon droit, gauche, ou rectum).
 - Type histologique (adénocarcinomes et sous-types associés).
 - Taille tumorale.
 - Stade selon la classification TNM.

• Critères d'exclusion

Prélèvement avec une faible cellularité tumorale ou présentant une faible quantité d'ADN exploitable.

- Toutes les coupes de tissus fixés au formol et inclus dans la paraffine (FFPE) ont été testées dans des zones représentatives de la tumeur contenant au moins 10% de cellules tumorales, sans nécrose ni inflammation significative, sélectionnées par des pathologistes au laboratoire. Au total 946 cas ont été inclus pour la détection génétique de KRAS, 595 de NRAS, 556 de BRAF et 110 de MSI respectivement. Les variations dans les effectifs sont liées à la stratégie thérapeutique et à la disponibilité des kits spécifiques:

- ✓ L'étude histopathologique a concerné tous les cas.
- ✓ L'analyse immunohistochimique avait pour objectif de détecter l'expression des protéines du système de réparation de mésappariement MMR (MLH1, MLH2, MSH3 et PMS2).

- ✓ L'étude de biologie moléculaire consistait à identifier les mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF.

2.2 Méthodes

Nous avons adopté trois principales techniques :

2.2.1 Histopathologie

L'histopathologie consiste à examiner des prélèvements de tissus issus d'une biopsie ou d'une dissection d'une pièce opératoire après chirurgie. L'examen anatomopathologique repose sur l'étude de l'aspect macroscopique d'une lésion, et l'examen morphologique des cellules et des différents tissus par plusieurs méthodes en se basant particulièrement sur l'analyse morphologique. Dans le contexte de l'étude, il est préférable de préciser que l'objectif de cette technique est de préciser le type histologique, le grade et le degré d'invasion [178]. Des biopsies et des pièces opératoires du cancer colorectal issues du service de chirurgie ont été accueillies au sein du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique et Pathologie Moléculaire du CHU Mustapha. Les caractéristiques cliniques de chaque cas de CCR ont été identifiées et enregistrées sur une fiche de renseignements précisant : le numéro d'enregistrement, l'âge, le sexe et le site tumoral.

2.2.1.1 La macroscopie

Une fois les prélèvements décrits et mesurés et éventuellement, schématisés, le pathologiste procède à la mesure de la taille de la tumeur et à l'identification des ganglions atteints. Chaque prélèvement réalisé est systématiquement enregistré et conservé dans une cassette en plastique identifiée.

2.2.1.2 Les étapes de l'examen microscopique

a) Fixation

La fixation adéquate des échantillons de tissus est essentielle pour réaliser une interprétation microscopique réussie. Chaque prélèvement effectué est plongé dans une solution à base de formol tamponné à 10%. Il s'agit d'un agent fixateur communément utilisé dans le monde en raison de sa disponibilité, de sa facilité de manipulation, de son faible coût et de son efficacité de préservation des tissus par le fait qu'il assure une perturbation cellulaire minimale. La fixation du tissu avant traitement et coloration est cruciale pour maintenir la morphologie et la composition cellulaires et conserver les déterminants antigéniques. Le mode opératoire de la fixation exige que nous veillions à assurer :

- ✓ Une quantité suffisante de l'agent fixateur pour émerger suffisamment l'échantillon (qui soit 10 x le volume du prélèvement).
- ✓ Un temps minimal de fixation qui assure une bonne pénétration de l'agent fixateur dans les tissus du prélèvement, ce temps varie entre 24 heures pour les biopsies jusqu'à 48 heures pour les pièces.

b) Traitement de tissus (voir Annexe I)

Traitement de tissus consiste à faire séjourner les prélèvements dans une série de liquides en utilisant un automate spécifique pendant 24 heures. L'objectif de cette technique est de rendre le tissu rigide afin qu'il reste intact pendant les manipulations. Ce procédé passe par trois étapes :

b.1) Déshydratation

La fixation dans un agent fixateur rend le prélèvement mou car cet agent contient de l'eau. Pour une bonne inclusion dans la paraffine, on doit donc déshydrater ce prélèvement. Pour cela, nous faisons remplacer l'eau par l'alcool en utilisant trois bains d'alcool de degré croissant : 70°, 95°, 100°, le prélèvement est immergé deux heures de temps dans chacun des trois bains.

b.2) Eclaircissement

C'est l'étape qui suit la déshydratation, il s'agit de remplacer l'éthanol par un solvant miscible avec la paraffine pour obtenir un tissu plus transparent. La technique est d'immerger le tissu dans trois bains successifs de xylène durant deux heures dans chaque bain.

b.3) Imprégnation

L'imprégnation des échantillons consiste à substituer le solvant par la paraffine. La paraffine pénètre dans les tissus en utilisant 3 bains (de 2 heures chacun) pour obtenir des fragments de tissus durs.

c) Enrobage et inclusion (Annexe I)

L'inclusion a pour but d'enrober l'échantillon dans la paraffine afin de pouvoir confectionner des coupes fines et régulières (d'une épaisseur de 2 à 5 μm). L'enrobage correspond à l'inclusion d'un tissu imprégné dans un bloc de paraffine. Après une journée, les prélèvements sont inclus dans des blocs comme suit :

- ✓ On a commencé par préchauffer les moules dans une console thermique à 60°C ;
- ✓ On a placé chaque fragment du tissu à la bonne orientation dans un moule de paraffine ;

- ✓ On a placé les cassettes sur les fragments tissulaires, ensuite nous avons remplis les moules déjà placés sur une plaque froide par la paraffine. Après, décollage des blocs, on les a placés au congélateur à 4°C. Cette manipulation conserve les blocs et les refroidit pour nous permettre la confection des coupes.

d) Confection des coupes (voir Annexe I)

La confection des coupes fines est réalisée à l'aide d'un microtome. Une fois obtenues, les coupes sont plongées dans un bain Marie à 37°C avant de les étaler sur les lames. Afin d'éliminer la paraffine du prélèvement et d'augmenter l'adhérence des coupes, on procède à un étuvage des lames à 65° C.

2.2.1.3 La coloration à l'hématoxyline – Eosine (HE)

• Principe

La coloration des coupes histologiques a pour but de visualiser les principaux composants morphologiques du tissu au microscope. Nous avons utilisé la coloration hématoxyline-éosine Harris qui est une coloration courante, qui permet de révéler les différentes répartitions, architectures et structures cellulaires. La coloration bi chromique à l'hématoxyline-éosine (H&E) est utilisée par les pathologistes depuis plus de cent ans. L'hématoxyline de Harris est un colorant basique qui colore les noyaux cellulaires en bleu, tandis que l'éosine colore le cytoplasme et le tissu conjonctif en rose grâce à l'éosine (colorant acide). Il s'agit là d'identifier les noyaux cellulaires, du cytoplasme [179].

• Les étapes de la coloration

-Avant la coloration, les coupes on subit :

- ✓ Un déparaffinage qui a été réalisé à l'aide de xylène (trois bains) afin d'éliminer la paraffine.
- ✓ Une réhydratation des tissus qui a été réalisée en utilisant 4 bains d'éthanol de degrés décroissants, suivie d'une déshydratation ultérieure en utilisant des bains successifs d'éthanol de degrés croissants.

-Une coloration à l'hématoxyline de Harris, qui a teinté les noyaux en bleu.

- ✓ Une coloration à l'éosine, qui a teinté le cytoplasme en rose.
- ✓ Une déshydratation : par l'utilisation des bains d'éthanol de degrés croissants pour déshydrater, suivie d'une étape pour réaliser l'éclaircissement des tissus.

- ✓ Réalisation du montage entre lame et lamelle en déposant une goutte de milieu de montage (Eukitt).

2.2.2 Immunohistochimie

• Principe de l'analyse immunohistochimique

La technique immunohistochimique est une méthode immunoenzymatique qui vise à détecter et localiser des antigènes (protéines membranaires, cytoplasmiques ou nucléaires) dans des coupes tissulaires (FFPE) au moyen d'anticorps spécifiques dirigés et révélés grâce à une réaction colorimétrique enzymatique. Cette technique qui est très sensible et d'usage spécifique, lorsqu'elle est maîtrisée elle permet de détecter une grande variété d'antigènes chez les espèces animales. Cette technique est très utile pour étudier la fonction cellulaire dans les tissus normaux et pathologiques.

Dans notre recherche, il s'agit de détecter l'expression intacte ou la perte des protéines du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) pour établir le statut tumoral MSS ou MSI du système de réparation des mésappariements. Pour cela, 110 échantillons de tissus de CCR ont été évalués.

• Révélation

Pour la visualisation, nous avons utilisé le système de révélation + polymère couplé à l'HRP (En Vision, Dako). Pour cela, nous avons rajouté une peroxydase de Raifort (HRP), enzyme couplée à l'anticorps secondaire puis comme chromogène nous avons utilisé le DAB (3,3'-di-Aminobenzidine) qui est largement utilisé. La présence de DAB est détectée par une tache brune due au fait qu'en présence du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), le DAB s'oxyde par la peroxydase (Figure 19).

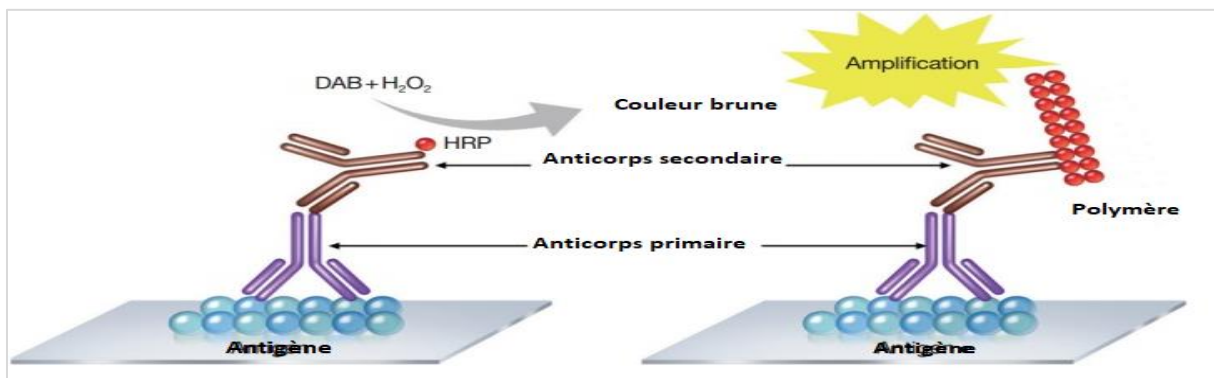


Figure 19. Représentation schématique de l'immunohistochimie.

(<https://journal-decoder.fr/2024/07/04/lactivation-du-recepteur-aux-cannabinoïdes-de-type-2-favorise-la-production-de-spermatozoïdes-in-vitro/>).

La figure 19 : montre que l'antigène est spécifiquement reconnu par l'anticorps primaire. Après la liaison de l'anticorps secondaire, l'activité peroxydase conduit à une précipitation du DAB (marron) à côté de l'antigène (Système de révélation EnVision).

2.2.2.1 Procédure de l'immun-détection de MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2

L'étude IHC a été évaluée sur des coupes du tissu tumoral non coloré fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) de 4 à 5 μm d'épaisseur à l'aide d'un microtome. Afin que le tissu ne soit pas décollé, nous avons étalé les coupes sur des lames silanisées.

• **Incubation** : Pour faire adhérer les tissus sur les lames, nous avons effectué une incubation des tissus à 37°C pendant 24h.

• **Déparaffinage et réhydratation**

- ✓ Pour éliminer la paraffine, nous avons procédé à un déparaffinage réalisé dans trois bains de xylène (5 min chacun).
- ✓ La réhydratation été réalisée par 3 bains d'éthanol de degrés décroissants : 100°, 95°, 70° (5 min chacun).
- ✓ Le rinçage des lames a été fait à l'eau distillée.

• **Restauration antigénique**

Les échantillons ont été tout d'abord mis dans la solution tampon TRS à PH 7,0. L'antigène a été démasqué par préchauffage dans un bain-marie à une température entre 97°C à 100°C, les échantillons sont refroidis à la température ambiante pendant 20 min et lavés à l'eau distillée.

• **Action du blocage de la peroxydase**

- ✓ Pour délimiter la zone choisie, on a utilisé un stylo hydrophobe de la marque le DAKO.
- ✓ Un blocage des sites antigéniques non spécifiques a été réalisé par l'action du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) à la température ambiante pendant 20 minutes.
- ✓ Un rinçage des lames à l'eau distillée puis au PBS a été effectué pendant 5 minutes.

• **Adjonction de l'anticorps primaire**

- ✓ Les anticorps monoclonaux primaires anti-MMR de souris utilisés pour l'identification du statut MMR sont : anti-MLH1 ((G168-728), Cell marque), anti-MSH2 ((G219-1129), Cell Marque), anti-MSH6 (SP93 lapin, Cell Marque), anti-PMS2 (EPR3947 lapin, Cell Marque) et de Leica.
- ✓ Les lames ont ensuite été incubées avec des anticorps primaires à la température ambiante pendant (55 min) dans une chambre humide et obscure.

- ✓ Puis un rinçage des lames avec du tampon phosphate salin (PBS) pendant 5min (deux fois).

- **Adjonction de polymères couplés aux anticorps secondaires et l'HRP**

Les polymères couplés aux anticorps secondaires et l'HRP ont été rajoutés sur les lames à la température ambiante pendant (20 min) puis rincés au PBS pendant 5min à deux reprises.

- **Révélation et contre coloration**

La réaction enzymatique a été révélée avec le substrat chromogénique DAB (kit DAB Envision, DAKO) pendant 5 à 10 min, rincées, immergées dans une solution de l'hématoxyline de Mayer, puis rincées à l'eau courante.

- **Montage** : (Eukitt) est le milieu de montage déposé pour coller en transparence des tissus la lamelle sur la lame.

- **Observation des lames** : elle est effectuée en utilisant un microscope optique.

- L'expression immunohistochimique des protéines du système MMR est considérée comme positive lorsqu'elle est située dans les noyaux des cellules (nucléaire).

2.2.3 Le test moléculaire

La présente étude a porté sur 946 patients, diagnostiqués, avec un cancer colorectal métastatique (CCRm). L'analyse moléculaire des mutations (KRAS, NRAS et BRAF) a été réalisée par PCR en temps réel (Idylla et Sacace) au sein du service d'Anatomie et Cytologie Pathologique et Pathologie Moléculaire du CHU Mustapha (Alger). A noter que parmi les cas échantillons collectés, l'analyse moléculaire de 130 cas ont été effectués à Londres par un séquençage de nouvelle génération (NGS) et haut-débit du PGM Ion Torrent (Londres).

2.2.3.1 Recherche de mutations par Idylla

Le test de mutation Idylla™ KRAS et NRAS (Biocartis, Malines, Belgique), porte le marquage CE-IVD et permet la caractérisation de 23 de points chauds de mutation RAS dans les exons 2, 3 et 4, à savoir G12D, G12A, G12C, G13D, G12D, G12S, G12S, G12 V et G12R, A59T / E / G, Q61H, Q61K, Q61R / L, K117N et A146P / T / V. En plus, Le test de mutation Idylla™ BRAF utilise des réactions multiples de PCR et permet l'amplification de l'exon 600 de l'oncogène BRAF. Ce test Idylla ne nécessite ni déparaffinage, ni de quantification de l'ADN ni d'isolement de l'ADN génomique, car les actions de déparaffinage, d'extraction d'ADN et de PCR sont entièrement automatisées et réalisées dans une cartouche à usage unique.

- a) **Évaluation du contenu en cellules tumorales** : Réalisations des lames HE. Tous les échantillons, avaient (au moins 10%) de cellules tumorales.
- b) **Réalisation des coupes de tissu FFPE** : de 5 à 10 μm d'épaisseur et les placer directement dans la cartouche Idylla TM.
- c) **Résultats** :
 - ✓ Les résultats de mutations KRAS sont affichés en 2H 10mn.
 - ✓ Les résultats de mutations NRAS-BRAF sont obtenus en 1H 49 mn.

2.2.3.2 Recherche de mutation par RT-PCR (Sacace)

Concernant la recherche des mutations (KRAS, NRAS et BRAF) par RT-PCR de routine, l'ADN génomique a été extrait et purifié depuis les coupes de tissus FFPE en utilisant le kit « SaMag FFPE DNA Extraction, Sacace Biotechnologies, Italy » conformément aux instructions du fabricant. L'ADN a été amplifié dans le système de Sa-Cycler 96 Real Time PCR de l'appareil « Sacace, Biotechnologies, COMO, Italy ». Les réactions ont été réalisées dans 30 μl du kit « Entrogen's colorectal Cancer Mutation Detection Panel » (**Figure 20**), contenant tous les réactifs et les sondes Taq Man spécifiques indispensables à l'amplification. Les mélanges réactionnels ont été chauffés à 95°C pendant 12 min, suivis de 40 cycles pendant 15 secondes. Au final, les réactions ont été prolongées pendant 40 secondes à 60°C.

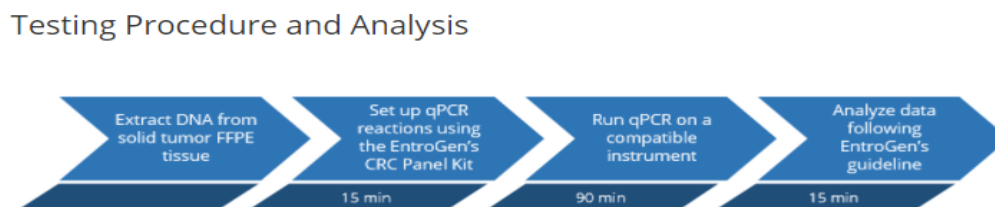


Figure 20. Le processus de PCR.

a) Extraction d'ADN

- i. **Évaluation du contenu en cellules tumorales** : le contenu en cellules tumorales a été déterminé sur une nouvelle coloration à l'hématoxyline-éosine des lames. Les blocs avaient au moins 10% de cellules tumorales.
- ii. **Réalisation de coupes de tissu FFPE** : de 5 à 10 μm d'épaisseur.
- iii. **Prétraitement (Préparation des échantillons)** : l'ADN issu des échantillons FFPEs est souvent fragmenté, ce qui pose des problèmes lors du dosage

moléculaire. Le maintien de l'intégrité de l'ADN est essentiel dans toute procédure.

1-Transférer des sections	Transférer les sections de tissus FFPE dans les tubes de micro-centrifugation (1.5/2ml).
2-Le déparaffinage	Ajouter 200 µl du buffer DP dans le tube de micro-centrifugation et réaliser le vortex vigoureusement pendant 10 secondes.
3-Incubation I	Incuber à 56 °C pendant 3 minutes puis laisser refroidir à température ambiante.
4-Ajouter le buffer BL4	Ajouter 220 µl du buffer BL4 puis mélanger par le vortex.
5-Ajouter la protéinase K	Ajouter 20 µl de protéinase K en bas, directement à la phase colorée en bleu, puis mélanger doucement.
6-Incubation II	Incuber à 56 °C pendant 2 heures (ou jusqu'à la lyse complète des échantillons).
6-Incubation III	Incuber à 90 °C pendant 1 heure.
7-Transférer vers la colonne	Transférer 200 µl du culot, la phase bleue vers le filtre de la colonne placée dans le tube de collecte, puis centrifuger à 6000 xg (1 min).
8-Transférer et commencer	Transférer 200 µl de l'échantillon dans le tube et commencer extraction par l'extracteur SaMag.

- iv. **Protocole d'extraction :** le système d'extraction automatique d'acides nucléiques qui utilise la technologie des billes magnétiques pour purifier l'ADN (Sacace Technologie) et le Kit d'extraction : « SaMag FFPE DNA Extraction Kit » a été utilisé .

- Ce protocole a été réalisé en 03 étapes (Figure 21) :

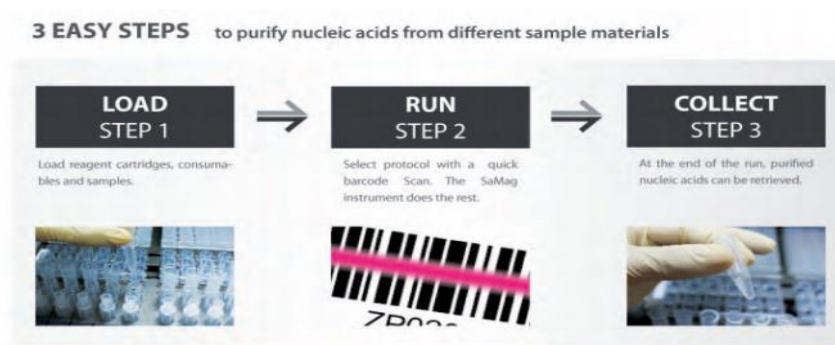


Figure 21. Les étapes de la lyse cellulaire.

(<https://www.medicaexpo.com/prod/sacace-biotechnologies-srl/product-93521-944408.html>).

- Le processus d'extraction comprend (**Figure 22**) :
 - ✓ **Lyse cellulaire** : libérant ainsi l'acide nucléique en phase liquide ;
 - ✓ **Binding ou liaison** : l'acide nucléique se liera spécifiquement à des billes magnétiques spécifiques alors que les protéines, les polysaccharides et les lipides restent en phase liquide et sont éliminées comme surnageant ;
 - ✓ **Elution** : les acides nucléiques purifiés adsorbés sur les billes magnétiques sont obtenus par élution.

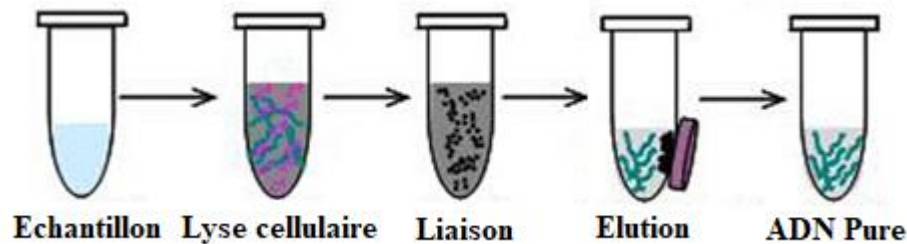


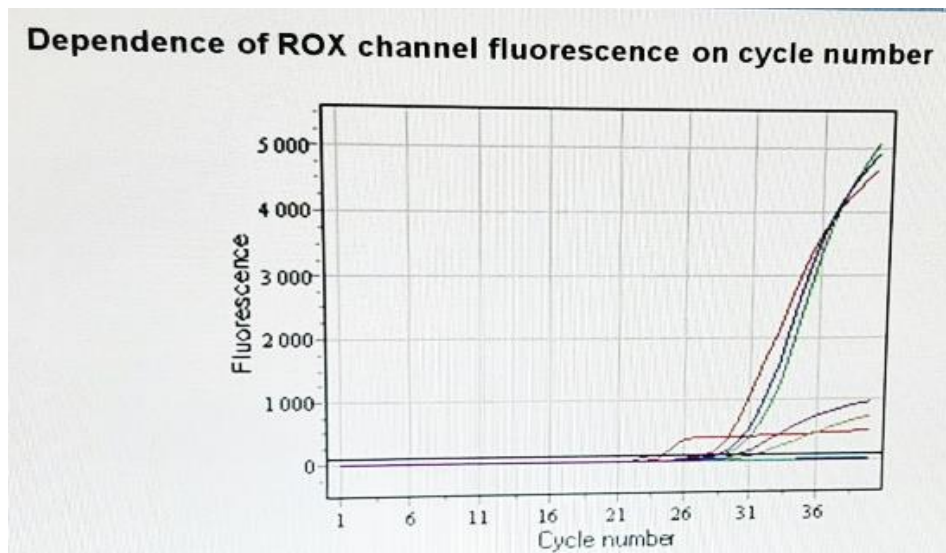
Figure 22. Le processus de l'extraction.

- b) **La concentration d'ADN n'a pas pu être déterminée par le nanodrop** : des amorces pour amplifier le gène contrôle $\beta 2$ microglobuline ont été incluses pour vérifier la quantité totale de l'ADN suffisante pour assurer l'amplification. La détection de ce gène repose sur l'hydrolyse de sondes $\beta 2$ microglobuline marqué par le fluorophore HEX. On devrait voir le signal HEX dans tous les échantillons.
- c) **PCR ciblée en temps réel** : le kit (EntroGen's Colorectal Cancer Mutation detection panel) a été utilisé. Le kit contient le master mix, le contrôle positif, et les sondes TaqMan spécifiques d'allèles indispensables à l'amplification et à la détection de mutations spécifiques à tester, à savoir :
 - **KRAS** : codons 12 et 13 de l'exon 2 : G12D, G12V, G12C, G12A et G13D, le codon 61 de l'exon 3 : Q61H, Q61L et Q61R et le codon 146 de l'exon 4 : A146T et A146V.
 - **NRAS** : codons 12 et 13 de l'exon 2 : G12D, G12C, G12S, G13R et G13V, le codon 61 de l'exon 3 : Q61H, Q61L, Q61K et Q61R et le codon 146 de l'exon 4 : A146T.
 - **BRAF** : codon 600 de l'exon 15 V600.
- i. **Préparation de réactifs** : Le volume total nécessaire à la réalisation de réactions PCR est 30 μ l par échantillon. Nous avons pré-mélangé les mélanges réactionnels de différents échantillons (aussi des échantillons contrôles) dans une solution mère contenant un surplus de 5%, car les erreurs de pipetages doivent être couvertes.

Ces réactions sont établies pour l'échantillon de chaque patient. Une plaque PCR à 96 puits peut recevoir jusqu'à 14 prélèvements par échantillon pour un contrôle positif par réaction et un contrôle sans matrice NTC.

Les étapes de préparation de la PCR sont :

- ✓ Décongeler une quantité nécessaire du mix sonde/master mix. Mix contrôle positif et mix de réaction.
- ✓ Opérer un vortex puis une centrifugation pendant 5 secondes à température ambiante.
- ✓ Préparer une solution mère pour chaque échantillon (**Annexe 3**).
 - ii. Distribuer 24 µl de solution mère par puits dans la moitié d'une rangée.
 - iii. Ajouter 06 µl de sondes dans son puits correspondant.
- II. Mélanger les échantillons en utilisant la pipette par plusieurs cycles d'aspiration et refoulement.
- III. Bien couvrir la plaque de PCR en utilisant le film optique adhésif.
- IV. Mettre la plaque à 96 puits dans le thermo cycleur après son réglage.
- V. Durée de l'amplification : 1H20.
- VI. **Interprétation des résultats :** La sonde fluorescente (TaqMan) est une sonde d'hydrolyse très populaire, conçue pour se fixer à une séquence spécifique de l'ADN cible. Après l'amplification, la détection de séquences mutées est basée sur l'hydrolyse de cette sonde. Le mécanisme de son action dépend de l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase, qui hydrolyse la sonde attachée tout au long de l'amplification PCR. La sonde TaqMan possède un fluorophore (FAM, ROX ou CY 5) lié à son extrémité 5' et une colorant extincteur à son extrémité 3'. Pendant la PCR, lorsque l'ADN polymérase réplique une séquence d'ADN sur laquelle est liée une sonde TaqMan, l'activité exonucléase 5' de la polymérase hydrolyse la sonde qui génère une fluorescence. L'intensité de fluorescence augmente à chaque cycle proportionnellement au taux de clivage de la sonde. Par contre, Tant que la sonde est intacte, le rapporteur et l'extincteur restent à la proximité immédiate et l'énergie d'excitation est éteinte, interdisant l'émission de toute fluorescence. Les sondes KRAS, NRAS et BRAF sont marquées avec **FAM, ROX, CY 5**. Ces derniers devraient être détectés uniquement pour les échantillons mutés de KRAS, NRAS ou BRAF (**Figure 23**).



→ Si CT < 36, l'échantillon était considéré positif.

Figure 23. Le nombre des cycles de PCR

2.2.4 Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel XLSTAT (version 2016.02.28451). Les variables qualitatives ont été comparées par le test du Chi carré ou le test exact de Fisher. Le test du chi carré a été utilisé pour observer les associations de gènes mutés (KRAS/NRAS et BRAF) avec des variables clinico-pathologiques (âge, sexe, site tumoral, localisation spécifique de la tumeur dans le côlon, phénotype MSI). Toutes les valeurs $p \leq 0,05$ ont été considérées comme statistiquement significatives.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Histopathologie et caractéristiques des patients

Notre étude a porté sur 946 patients porteurs d'adénocarcinome colo-rectal (CCR), ayant subi une résection chirurgicale du côlon et/ou rectale ou autre résection d'un autre organe du site métastatique (poumon, ovaire, foie...), entre janvier 2017 et décembre 2021, l'âge médian au moment du diagnostic de ces patients était de 57,9 ans dans un intervalle d'âge compris entre 15 et 93 ans.

Les caractéristiques clinicopathologiques enregistrées et analysées comprenaient le sexe, l'âge, le site tumoral primaire, le type histologique, la taille tumorale et le stade.

3.1.1 Répartition des cas de CCR selon le sexe

Sur le total de 946 patients inclus dans l'étude, 515 cas étaient des hommes et 431 cas étaient des femmes (**Figure 24**). On retrouve dans la population étudiée un **sex-ratio** hommes/femmes de **1,19**.

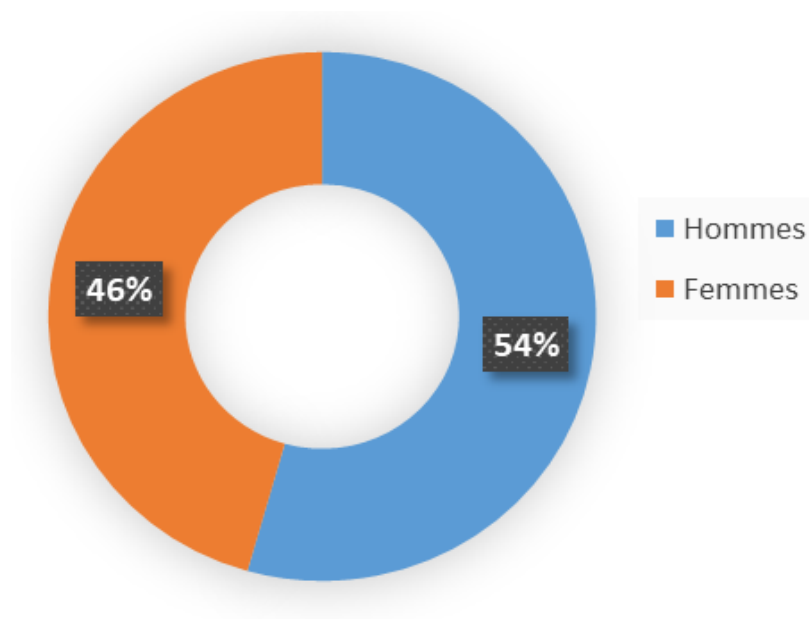


Figure 24. Répartition des cas de CCR selon le sexe.

3.1.2 Répartition des patients selon l'âge

L'âge médian des patients est de 57,9 ans (15-93ans) chez les patients atteints du cancer colorectal. La distribution globale des patients selon leur âge au moment du diagnostic (**Figure 25**) met en évidence un pic au niveau l'intervalle d'âge ≥ 50 ans ($n= 710$). On remarque par contre une part importante de patients jeunes : 236 sont âgés de moins de 50 ans au diagnostic (soit 24,9 % de la cohorte).

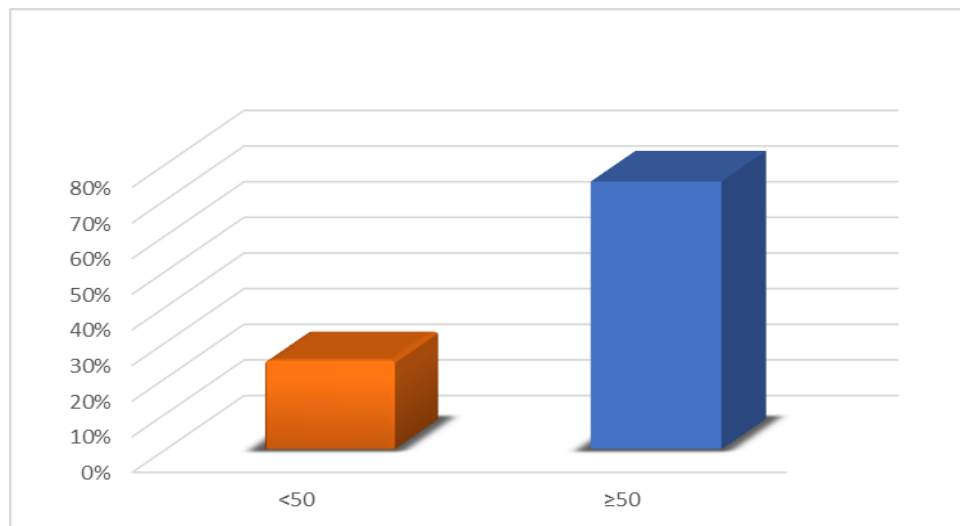


Figure 25. Répartition des patients selon l'âge.

3.1.3 Répartitions des cas de CCR en fonction de la localisation tumorale

La localisation tumorale des patients atteints de CCR (**Figure 26**) se présente comme suit :

- ✓ La localisation colite droite est présente chez 188 cas, ce qui représente 19,90%.
- ✓ La localisation colite gauche est présente chez 450 cas, ce qui représente 47,60%.
- ✓ La localisation rectale est présente chez 246 cas, ce qui représente 26%.
- ✓ 62 cas présentent des métastases qui proviennent de différents sites tumoraux et organes tels que le grêle, l'estomac, le foie, l'ovaire, l'utérus, le poumon, l'abdomen, le péritoine etc..., ce qui représente 6,50%.

En observant cette répartition des adénocarcinomes selon la localisation tumorale, on note que la localisation **colique gauche est le siège le plus fréquent avec 47,60%**. Il convient de noter que les tumeurs localisées dans le cæcum, le côlon ascendant et le côlon transverse sont classées comme des tumeurs du côté droit, tandis que les tumeurs localisées dans le côlon descendant, le côlon sigmoïde sont considérées comme des tumeurs du côté gauche.

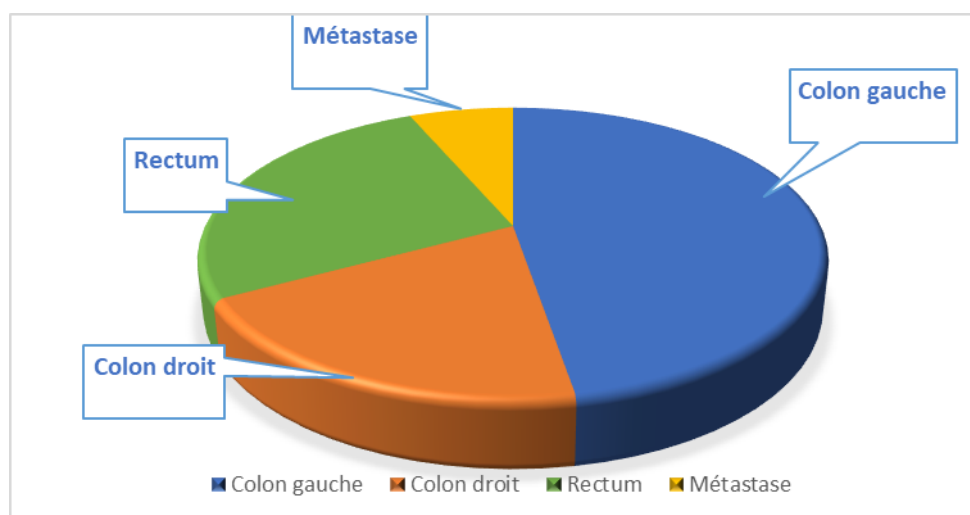


Figure 26. Répartition des cas de CCR en fonction du site tumoral.

3.1.4 Répartition des cas de CCR en fonction du grade de différenciation

Le sous-type histologique et le degré de différenciation des tumeurs ont été attribués selon la classification de l'OMS. L'analyse anatomo-pathologique a permis de reconnaître un grand nombre (**543 cas**) de lésions tumorales à type d'adénocarcinome bien différencié (**ABD = 57,40%**). En ce qui concerne les autres sous-types histologiques (**Figure 27**), le CCR peut être divisé en :

- ✓ 264 cas de CCR de type d'adénocarcinome moyennement différencié (**AMD= 27,90%**).
- ✓ 70 cas de CCR de type de carcinome peu différencié (**APD = 7.40 %**).
- ✓ 69 cas de CCR de type de carcinome mucineux (**CM = 69**).

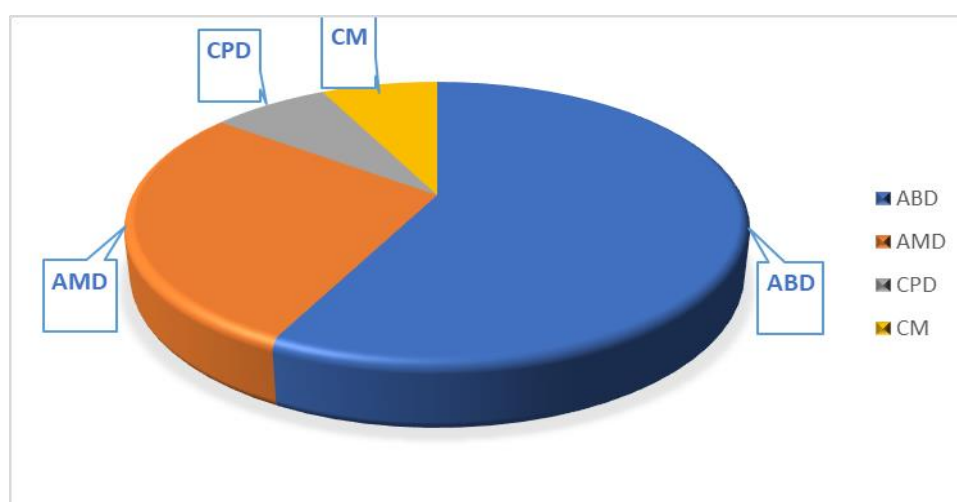


Figure 27. Répartition des cas de CCR en fonction du grade.

3.1.5 Distribution des cas de CCR selon le stade

Le système de stadification des métastases ganglionnaires tumorales (TNM) AJCC-UICC (8^{ème} édition, 2017) [124] reste la référence en matière de pronostic du CCR nouvellement diagnostiqué. Les cas de CCR ont été répartis en fonction de la profondeur de l'invasion tumorale dans la paroi intestinale (pT), comme le montre la **figure 28**. La distribution des adénocarcinomes en fonction des stades montre que la majorité des patients a été tardivement diagnostiqué au stade III (73,4%). Dans notre série, nous avons aussi identifié :

- ✓ Stade I : 3 cas (1%).
- ✓ Stade II : 16cas (5,30%).
- ✓ Stade IV : 21 cas (38,89%).

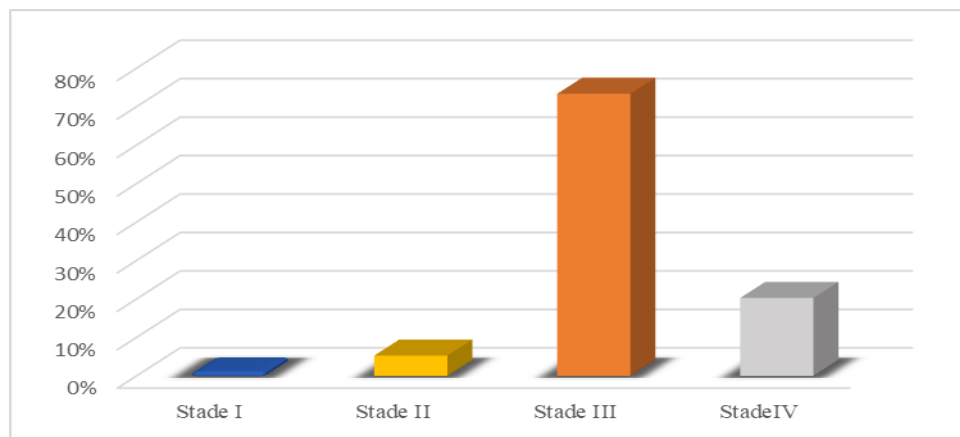


Figure 28. Distribution des cas de CCR selon le stade

3.2 Etude de l'histopathologie des tumeurs

3.2.1 Examen macroscopique

Voici une résection colique (**Figure 29**) qui montre un foyer tumoral bourgeonnant, arrondi et consistant, doté d'un centre ulcéré entouré d'une muqueuse saine et plane. Cette masse tumorale paraît dotée d'une couleur légèrement foncée, hémorragique par rapport au tissu sain avoisinant.



Figure 29. Pièce réséquée du côlon transverse, mesurée 60 cm.

3.2.2 Examen microscopique

La paroi du côlon est composée de cinq couches histologiques distinctes (**Figure 30**). Ces tissus ont été colorés à l'hématoxyline et à l'éosine (H&E). De l'intérieur vers l'extérieur, on trouve :

- ✓ La muqueuse ;
- ✓ La musculaire muqueuse ;
- ✓ La sous-muqueuse ;
- ✓ La musculuse ;
- ✓ La séreuse.

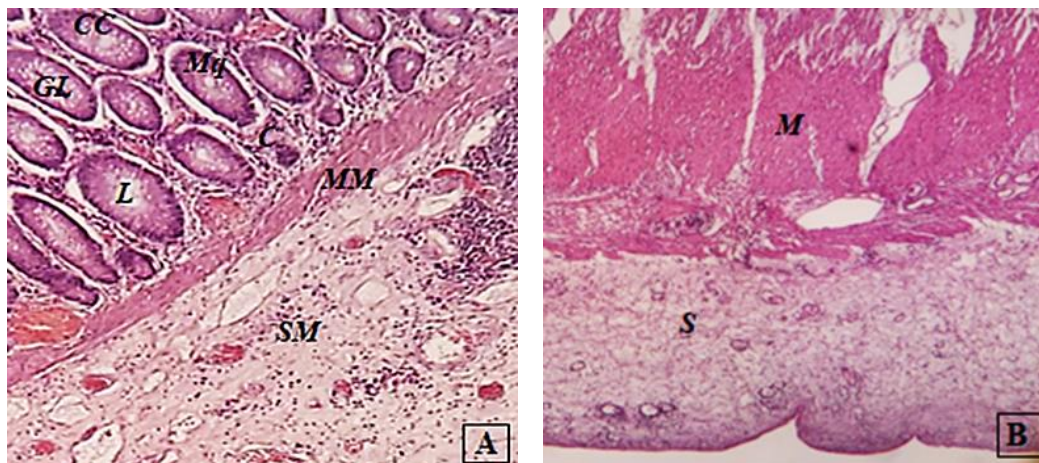


Figure 30. Coupe histologique de la paroi non tumorale du côlon (G.X10).

(A) Mq: muqueuse, MM: musculaire muqueuse, SM : sous muqueuse, GL: glande de Lieberkühn CC : cellule caliciforme, L: lumière, C :Chorion .(B) M : musculuse , S :séreuse.

3.2.2.1 Les différents sous-types histologiques du cancer colorectal

Plus de 90 % des carcinomes colorectaux sont des adénocarcinomes provenant de cellules épithéliales de la muqueuse colorectale. Concernant le type histologique des tumeurs, les adénocarcinomes bien différenciés étaient le sous-type histologique le plus fréquent dans notre série (**ABD** = 57,40%). Le grade tumoral ou le grade histologique fait référence au degré de différenciation tumorale et constitue un facteur pronostique défavorable indépendant du stade du CCR. Le degré de formation des glandes est actuellement le critère largement accepté et le plus utilisé pour classer le cancer colorectal (CCR) d'une manière cohérente. Pour classer les tumeurs du CCR, nous avons adopté la classification TNM, qui décrit les classes suivantes :

✓ Adénocarcinomes bien différenciés

Une tumeur de grade 1 est une tumeur qui présente un niveau de différenciation élevé. Dans les adénocarcinomes bien différenciés du colon, plus de 95 % de la tumeur est constituée de glandes Lieberkühn. La transformation maligne modifie la morphologie et la structure de la crypte intestinale dans la muqueuse, en la remplaçant par un tissu irrégulier. L'architecture normale des cryptes de Lieberkühn est perdue (**Figure 31**).

✓ Adénocarcinomes moyennement différenciés

Les tumeurs de grade 2 ont un niveau de différenciation moyen. L'adénocarcinome moyennement différencié présente une diminution de la fréquence de glandes de 50 à 95 % et une prolifération tumorale importante. Les cellules sont agencées en lobules creusés de différentes cavités (**Figure 32**).

✓ Carcinomes peu différenciés.

Les tumeurs de grade 3 ont un niveau de différenciation faible. L'adénocarcinome peu différencié est généralement solide présente une formation de glandes moins à 50 %. Il est caractérisé par des cellules indépendantes ou des cellules en bague à chaton (**Figure 33/A**).

✓ Carcinomes mucineux

Les néoplasmes présentant des lacs extracellulaires de mucine représentant > 50% de la zone tumorale dans laquelle les cellules tumorales peuvent être identifiées ont été considérés comme des carcinomes mucineux (**Figure 33/B**).

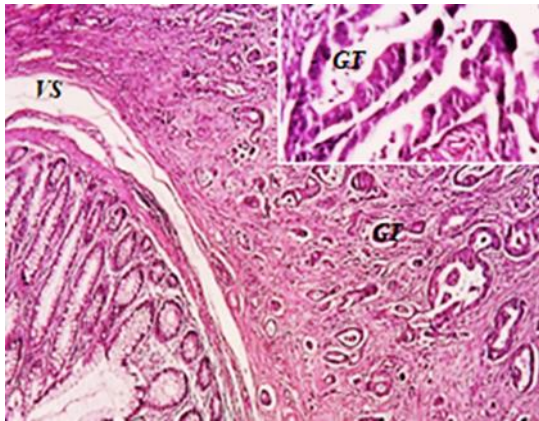


Figure 31. Aspect d'un adénocarcinome bien différencié. (G. X 10 et G.X40)
GT : glande tumorale,
Vs : vaisseau sanguin

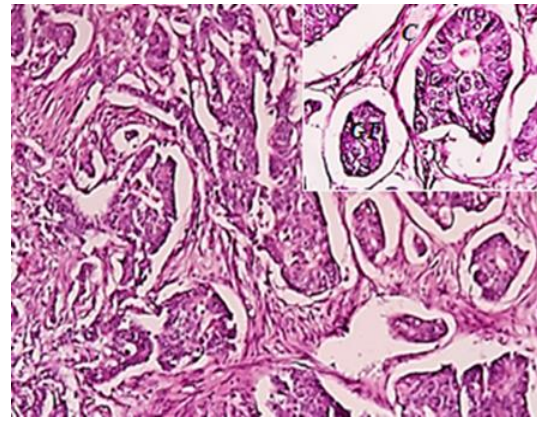


Figure 32. Aspect d'un adénocarcinome moyennement différencié. (G. X 10 et G.X200)
GT : glande tumorale,
C : Chorion.

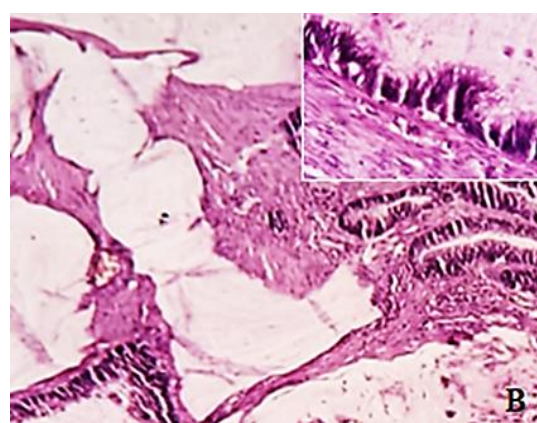
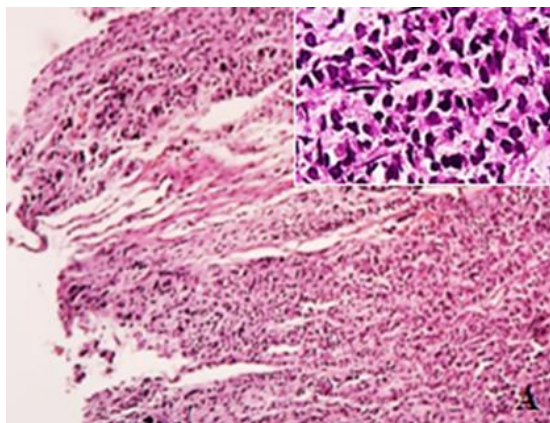


Figure 33. Aspect histologique des carcinomes de haut grade colorés à HE (G.10x et G. x 40).
(A) : carcinome peu différencié à cellules indépendantes, (B) : carcinome mucineux.

3.3 Etude immunohistochimique de MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2

L'étude immuohistochimique a été évaluée sur des coupes du tissu tumoral non coloré fixé au formol et inclus en paraffine (FFPE) de 4 μ m d'épaisseur. Les marqueurs tumoraux du système MMR (MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2) ont été analysés pour 110 cas d'adénocarcinomes colorectaux.

L'expression immunohistochimique de la protéine du système MMR est considérée comme positive lorsqu'elle est localisée dans le noyau. Dans tous les cas, nous avons procédé à un contrôle positif de carcinome colorectal stable de MMR et un contrôle positif interne (lymphocytes, cellules épithéliales des cryptes coliques). La coloration nucléaire dans tous les

types de cellules était considérée comme une coloration positive. Nous avons utilisé des lames de contrôle négatives avec un MSI et un contrôle positif interne (lymphocytes et cryptes coliques). L'expression de la protéine pMMR (MSS) est mise en évidence par une coloration nucléaire dans les cellules tumorales, lorsque les contrôles positifs internes (lymphocytes, fibroblastes ou entérocytes normaux à proximité de la tumeur) ont montré une coloration nucléaire positive. En revanche, la tumeur a été classée comme ayant un dMMR (MSI) lorsque la coloration nucléaire des cellules tumorales était absente pour une ou plusieurs protéines MMR, malgré l'immunoréactivité des contrôles positifs internes. Lorsque les contrôles internes échouent, nous excluons de l'étude des échantillons concernés.

3.3.1 Immunodétection de MLH1

Dans cette présente études, l'expression immunohistochimique de la protéine est considérée positive lorsqu'elle est située au niveau du noyaux des cellules tumorales (**Figure 35/B**). Les tissus normaux adjacents de chaque échantillon ont servi de contrôle positif (**Figure 35**). Parmi les 110 tumeurs analysées, l'évaluation immunohistochimique a révélé l'expression de la protéine MLH1 dans le **tableau 2**. L'extinction nucléaire de MLH1 était observée chez 5 cas (**Figure 34**).

Tableau 2 : Le profil immunohistochimique de MLH1 dans le cancer colorectal.

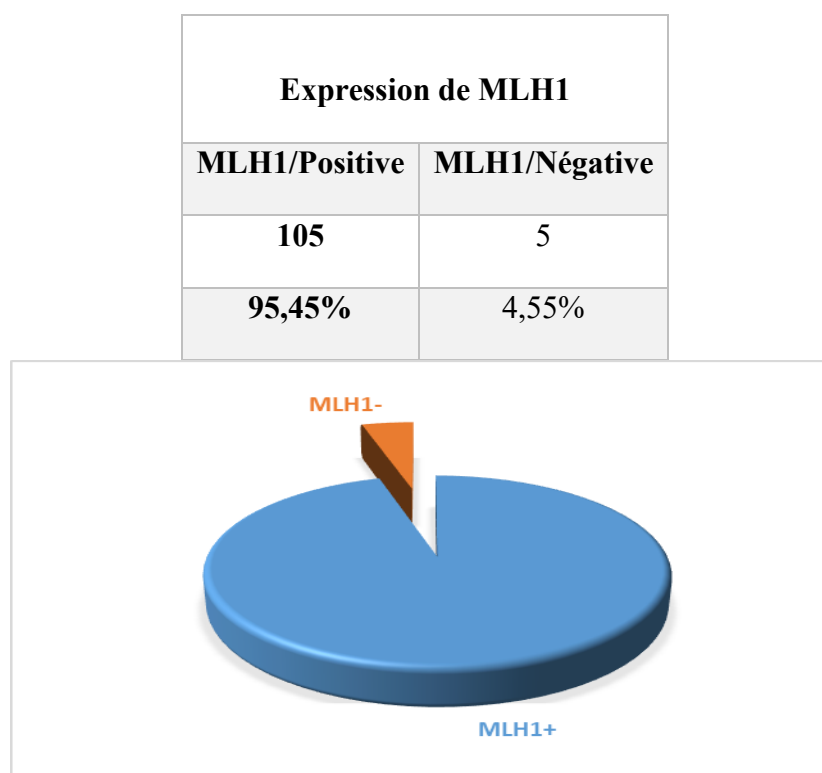


Figure 34. Fréquence de l'expression de la protéine MLH1.

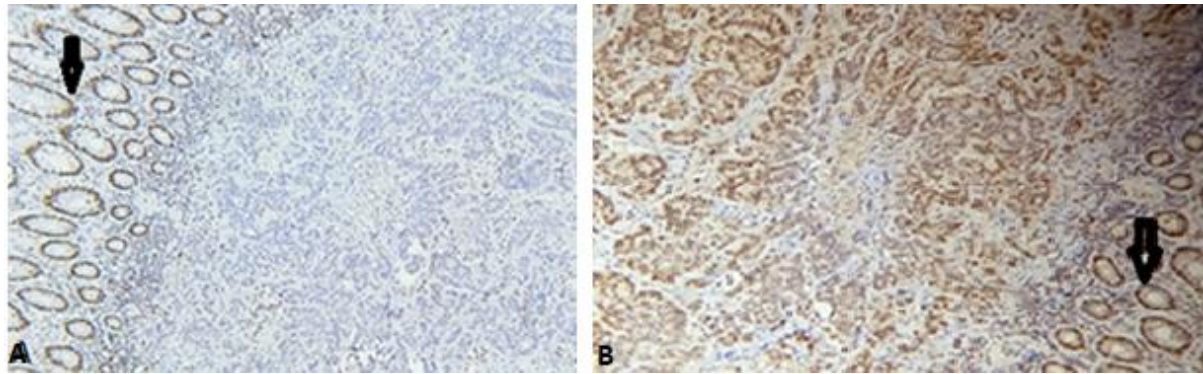


Figure 35. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MLH1 dans le cancer colorectal. (Gx10)

(A) : Extinction nucléaire de la protéine MLH1. (B) : Expression nucléaire positive de MLH1. ↓ : Expression nucléaire du contrôle positif interne.

3.3.2 Immunodétection de MSH2

L'évaluation immunohistochimique (**Tableau 3**) a révélé que l'expression nucléaire de la protéine MSH2 (**Figure 37/B**) était présente chez 106 cas. Tandis que la perte de l'expression (**Figure 37/A**) était présente chez 4 cas (**Figure 36**).

Tableau 3 : Le profil immunohistochimique de MSH2 dans le cancer colorectal.

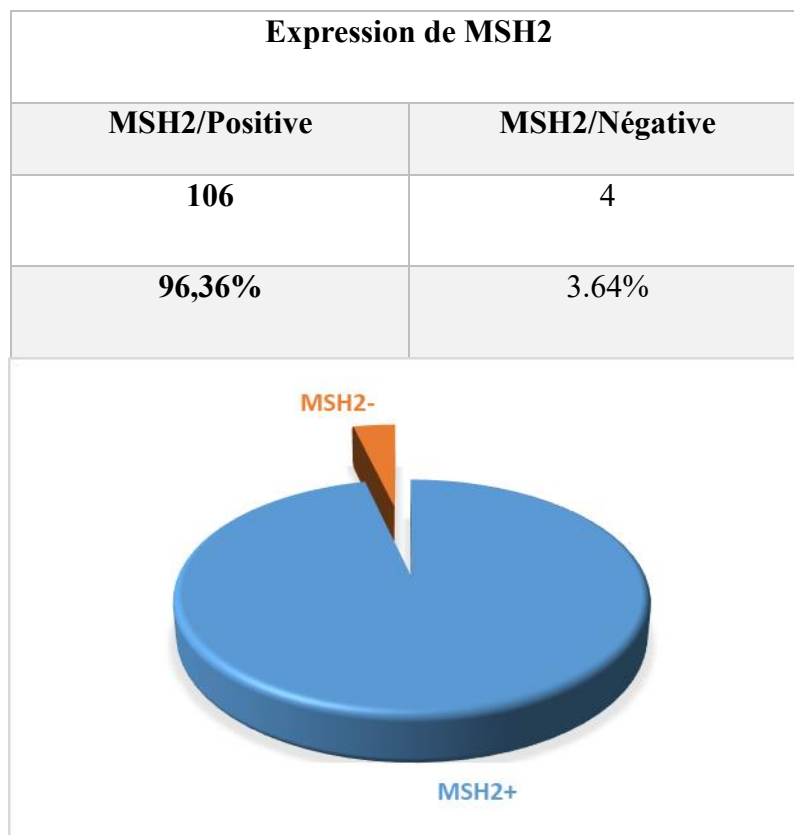


Figure 36. Fréquence de l'expression de la protéine MSH2.

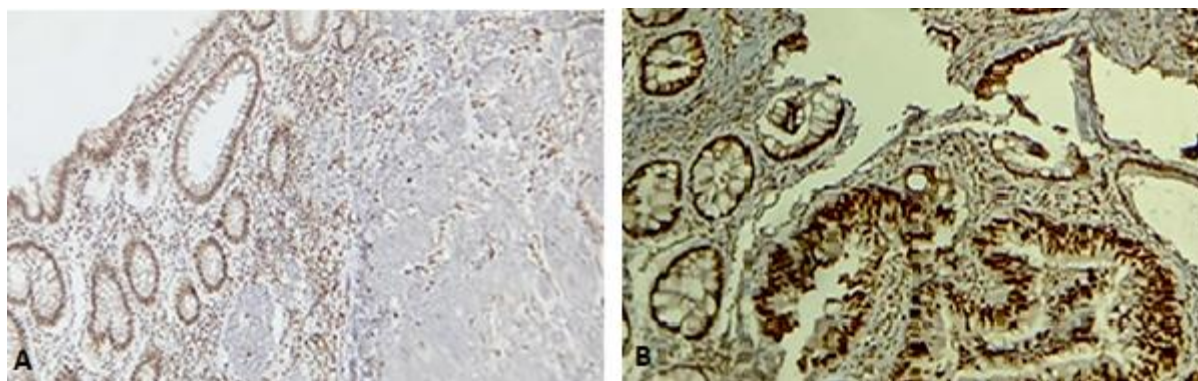


Figure 37. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MSH2 dans le cancer colorectal. (Gx10)

(A) : Extinction nucléaire de la protéine MSH2. (B) : Expression nucléaire positive de MSH2.

3.3.3 Immunodétection de MSH6

L'évaluation immunohistochimique (**Tableau 4**) a révélé que l'expression nucléaire (**Figure 39/B**) de la protéine MSH6 était présente chez 109 cas. Tandis que l'extinction (**Figure 39/A**) était présente chez un seul cas (**Figure 38**).

Tableau 4 : Le profil immunohistochimique de MSH6 dans le cancer colorectal.

Expression de MSH6	
MSH6/Positive	MSH6/Négative
109	1
99,09%	0,91%



Figure 38. Fréquence de l'expression de la protéine MSH6.

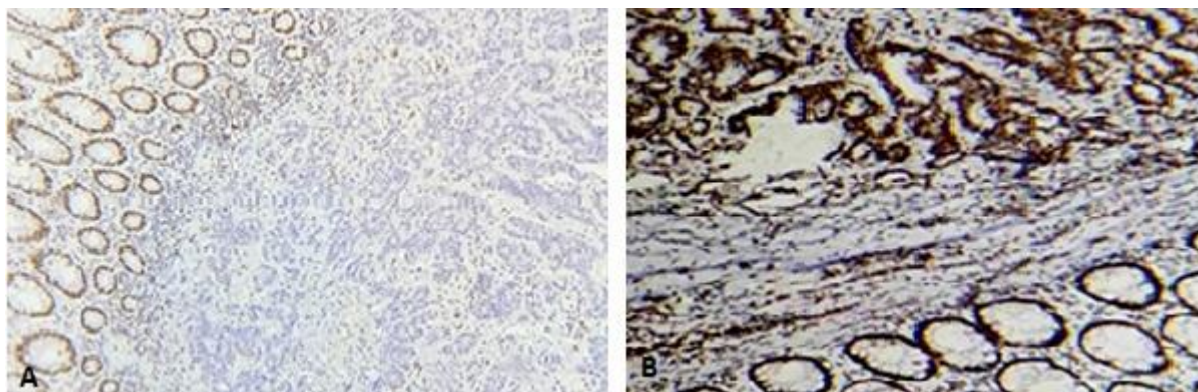


Figure 39. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine MSH6 dans le cancer colorectal. (Gx10)

(A) : Extinction nucléaire de la protéine MSH6. (B) : Expression nucléaire positive de MSH6.

3.3.4 Immunodétection de PMS2

L'évaluation immunohistochimique (**Tableau 5**) a révélé que l'expression nucléaire (**Figure 41 /B**) de la protéine PMS2 était présente chez 104 cas. En revanche l'extinction (**Figure 41/A**) était présente chez 6 cas (**Figure 40**).

Tableau 5 : Le profil immunohistochimique de PMS2 dans le cancer colorectal.

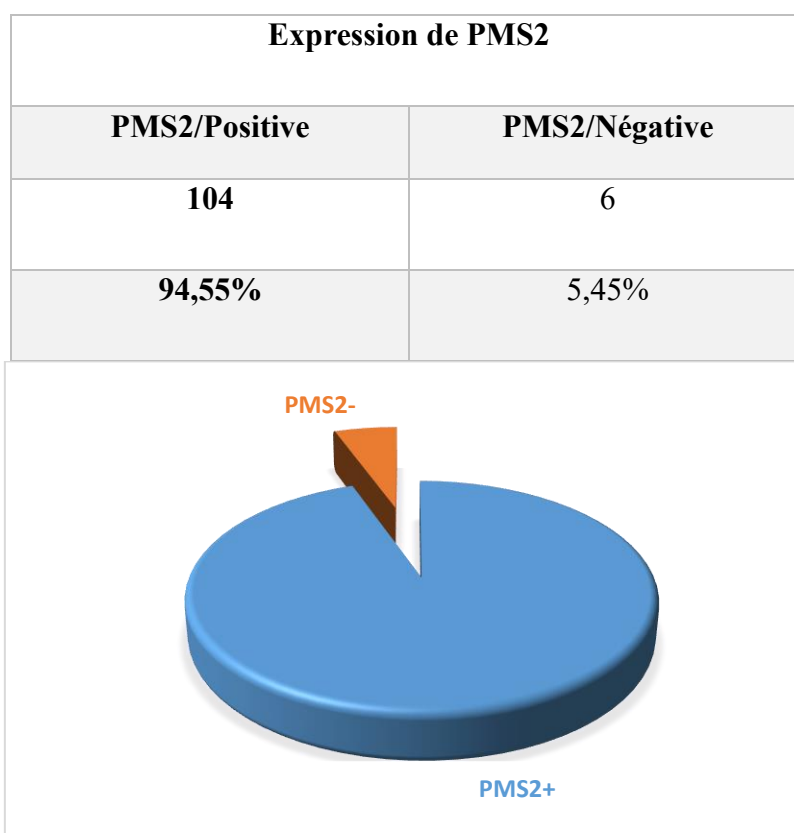


Figure 40. Fréquence de l'expression de la protéine PMS2.

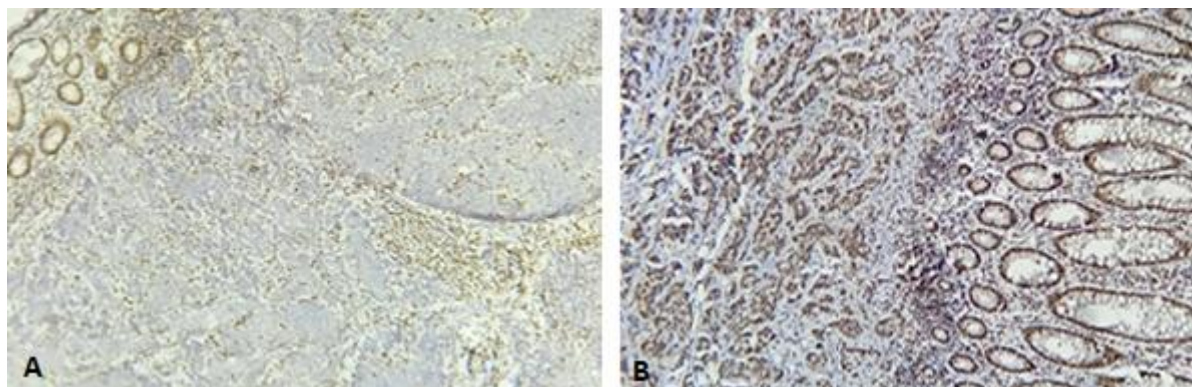


Figure 41. Le profil immunohistochimique montre l'expression de la protéine PMS2 dans le cancer colorectal. (Gx10)

(A) : Extinction nucléaire de la protéine PMS2. (B) : Expression nucléaire positive de PMS2.

3.3.5 L'analyse immunohistochimique du statut MMR

Sur un total de 110 patients atteints d'un cancer colorectal, l'analyse immunohistochimique de l'expression des quatre protéines MMR (**Tableau 6**) montre que l'instabilité des microsatellites (MSI) était présente chez 9 cas (8,18%) ; 7 cas présentaient un phénotype MSI-H et 2 cas présentaient un phénotype MSI-L. La majorité des cas étaient des microsatellites stables (MSS) (101/110) (**Figure 42**).

Il convient de noter que la détermination du statut MSI est réalisée en comparant le nombre de biomarqueurs instables. Si l'expression d'une seule protéine MMR est perdue, le phénotype est dit MSI-L (MSI-faible ou MSI-low). La tumeur est nommée MSI-H (MSI-élevé ou MSI-High), lorsque au moins deux protéines perdent leurs fonctions stables.

Tableau 6 : Expression des protéines MMR au niveau des adénocarcinomes colorectaux.

Statut MMR	Nombre de cas
MSS	101cas (91, 81%)
MSI-H	7cas (6, 36%)
MSI-L	2cas (1,81%)

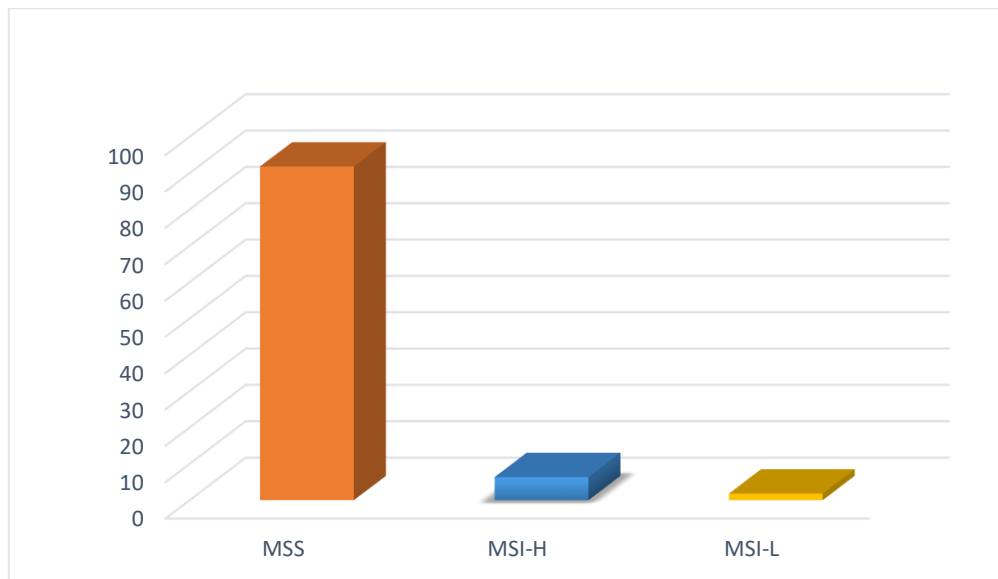


Figure 42. Evaluation du statut MMR.

3.3.6 Corrélation des protéines du système MMR avec les caractéristiques clinicopathologiques des patients et les différentes mutations

3.3.6.1 Etude de la corrélation entre les protéines du système MMR et le sexe

L'analyse statistique (**Tableau 7**) a révélé que la p-value calculée est supérieure au niveau de signification seuil $\alpha=0,05$. De ce fait, on constate que l'expression des protéines MMR et le sexe sont indépendants (**Figure 43**).

Tableau 7: Distribution des protéines du système MMR en fonction du sexe des patients.

<i>Caractéristiques</i>	<i>MSS</i>	<i>MSI-L</i>	<i>MSI-H</i>	<i>Total</i>	<i>p-value</i>
<i>Sexe</i>					
<i>Hommes</i>	60(59,40%)	1(50%)	4(57,14%)	65	0.95
<i>Femmes</i>	41(40,59%)	1(50%)	3(42,85%)	45	
<i>Total</i>	101	2	7	110	

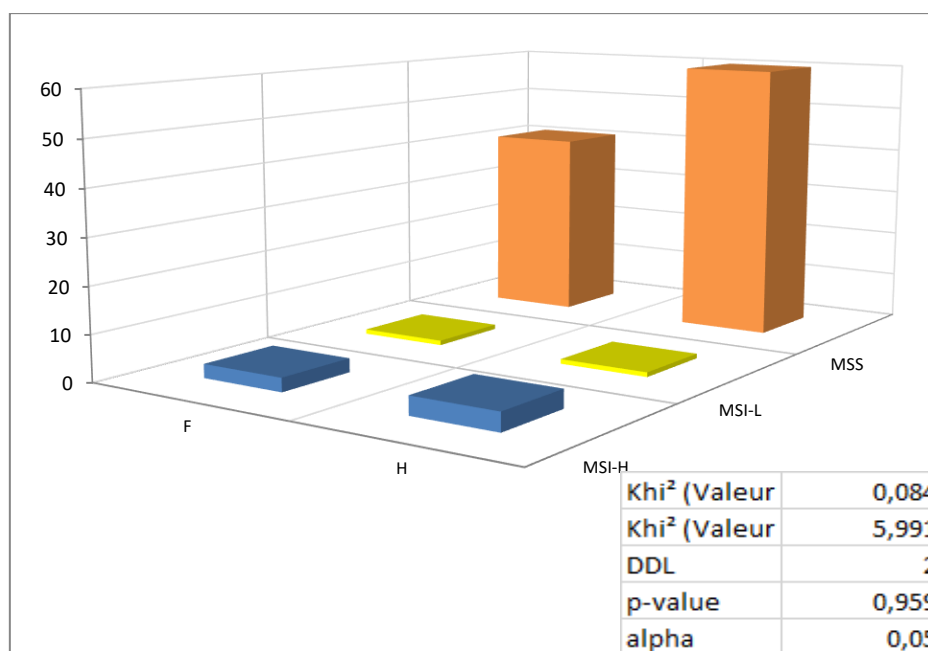


Figure 43. Expression des protéines du système MMR en fonction du sexe.

3.3.6.2 Etude de la corrélation entre l'âge et les protéines du système MMR

Pour rendre l'analyse statistique plus accessible, nous avons divisé les patients en deux groupes d'âge, des patients dont l'âge est inférieur à 50 ans et ceux dont l'âge est supérieur ou égal à 50 ans. L'étude statistique de la corrélation entre l'expression des protéines du système MMR et l'âge montre une valeur de p-value égale à 0,18 (Tableau 8), supérieure à la valeur de alpha qui est égale à (0,05) d'où, l'expression des protéines MMR n'est pas significativement corrélée avec l'âge des patients atteints de CCR. L'instabilité des microsatellites (MSI-H/MSI-L) est trouvée chez 4 patients jeunes (< 50 ans (A)). Tandis que l'extinction des protéines MMR (MSI-H/MSI-L) est trouvée chez 5 patients plus âgés (≥ 50 ans (B)) (Figure 44).

Tableau 8: Distribution des protéines du système MMR en fonction de l'âge des patients.

Caractéristiques	MSS	MSI-L	MSI-H	Total	p-value
Age					0.18
<50(A)	29(28,71%)	0(0%)	4(57,14%)	33	
≥ 50 (B)	72(71,28%)	2(100%)	3(42,86%)	77	
Total	101	2	7	110	

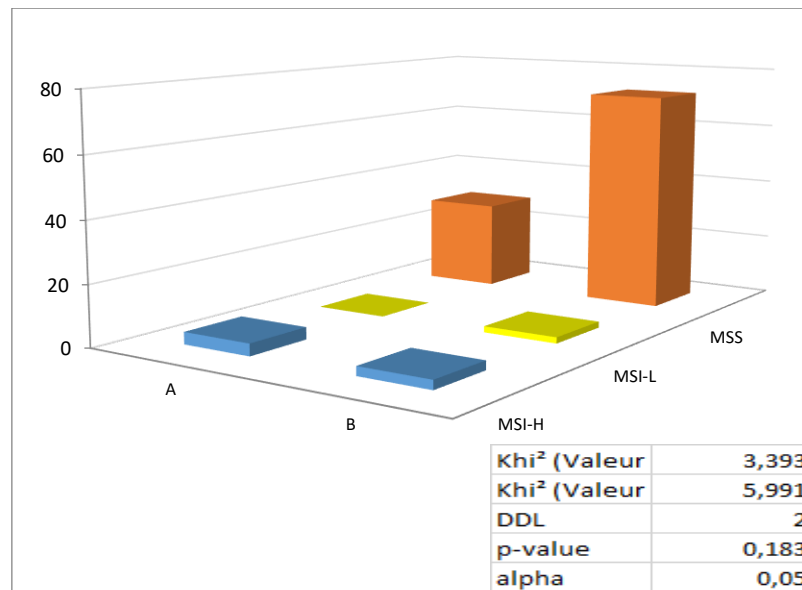


Figure 44. Evaluation du profil des protéines du système MMR en fonction de l'âge.

3.3.6.3 Etude de la corrélation entre le site tumoral et l'expression des protéines du système MMR

- ✓ L'expression des protéines du système MMR (MSS) a été révélée dans 83 cas de tumeurs coliques, alors que l'instabilité des microsatellites (MSI) a été trouvée chez 9 cas (Figure 45).
- ✓ Le phénotype MSS est observée chez les quinze patients porteurs du cancer du rectum.
- ✓ Les trois cas de métastase présentent un phénotype de microsatellite stable (MSS).
- ✓ Dans la présente étude, l'instabilité des microsatellites (MSI) n'est pas significativement associée à la localisation tumorale ($p=0,74$) (Tableau 9).

Tableau 9: Distribution des protéines du système MMR selon le site tumoral.

Caractéristiques	MSS	MSI-L	MSI-H	Total	p-value
Site tumoral					0.2
Colon droit (C.D)	30(29.70%)	1(50%)	4(57,14%)	35	
Colon gauche (C.G)	53(52,47%)	1(50%)	3(42,86%)	57	
Rectum (R)	15(14,85%)	0	0	15	
Métastase (M)	3(2,97%)	0	0	3	
Total	101	2	7	110	

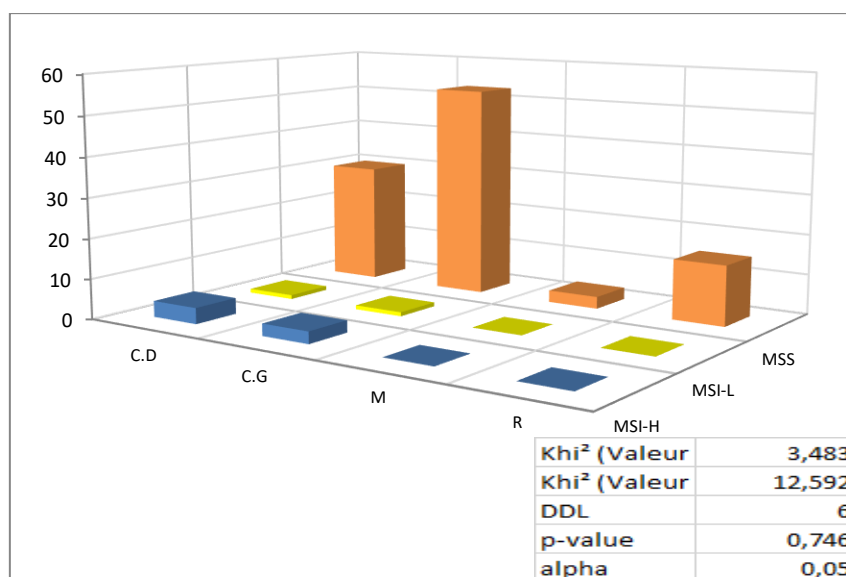


Figure 45. Expression des protéines MMR selon le site tumoral.

3.3.6.4 Etude de la corrélation entre l'expression des protéines du système MMR et le grade de différenciation

- ✓ Une faible proportion d'instabilité micro-satellitaire (MSI) (9cas) a été mise en évidence dans la population totale. Cinq cas de MSI sont trouvés chez les tumeurs bien différenciées (ABD) versus 2 cas chez les carcinomes mucineux (CM). Cependant, les carcinomes peu différenciés ne présentaient aucun phénotype micro-satellitaire instable (MSI) (**Figure 46**).
- ✓ L'expression tumorale ou l'extinction des protéines du système MMR n'est pas significativement corrélée à l'un des sous-types histologiques étudiés ($p=0,76$) (**Tableau 10**).

Tableau 10: Distribution des protéines du système MMR en fonction du grade.

Caractéristiques	MSS	MSI-L	MSI-H	Total	p-value
Type histologique					0.76
ABD	49(48,51%)	1(50%)	4(57,14%)	54	
AMD	37(36,63%)	0	2(28,57%)	39	
CPD	8(7,92%)	0	0	8	
CM	7(6,93%)	1(50%)	1(14,29%)	9	
Total	101	2	7	110	

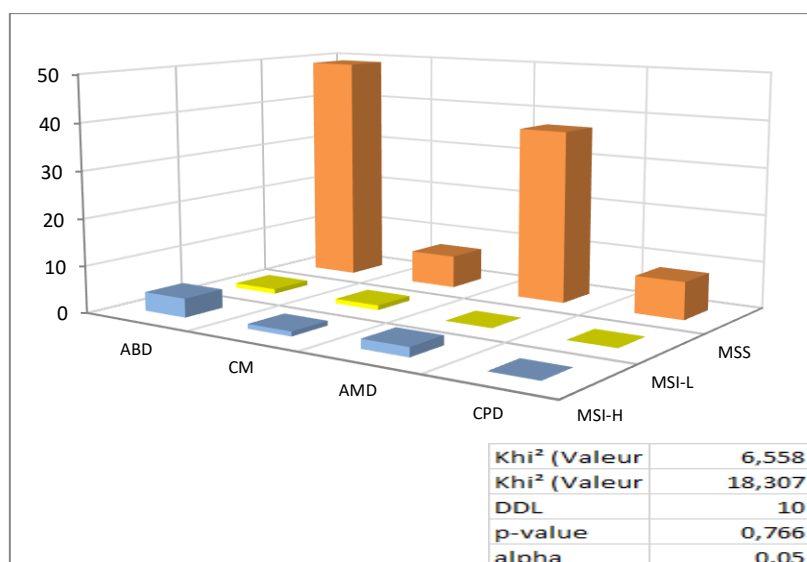


Figure 46. Expression des protéines MMR en fonction du grade.

3.3.6.5 Corrélation du stade tumoral avec le statut MSI ou MSS

- ✓ La plupart des cas de phénotype microsatellitaire stable MSS sont du stade III (74,58%).
- ✓ Tous les cas du groupe MSI-L sont du stade III. Le phénotype microsatellitaire instable (MSI-H) est présent aussi avec un pourcentage élevé (80%) chez les cas du stade III (Figure 47).
- ✓ En revanche, nos données statistiques ont également révélé qu'il n'y a pas de corrélation significative entre le statut des protéines MMR et les différents stades tumoraux ($p=0,93$) (Tableau 11).

Tableau 11 : Distribution de l'expression des protéines du système MMR en fonction du stade de la tumeur.

Caractéristiques	MSS	MSI-L	MSI-H	Total	p-value
Stade pathologique					0.9
I	1(1,69%)	0	0	1	
II	5(8,47%)	0	0	5	
III	44(74,58%)	2(100%)	4(80%)	50	
IV	9(15,25%)	0	1(20%)	10	
NI	42 (0%)	0	2(0%)	44	
Total	101	2	7	110	

NI : non identifié.

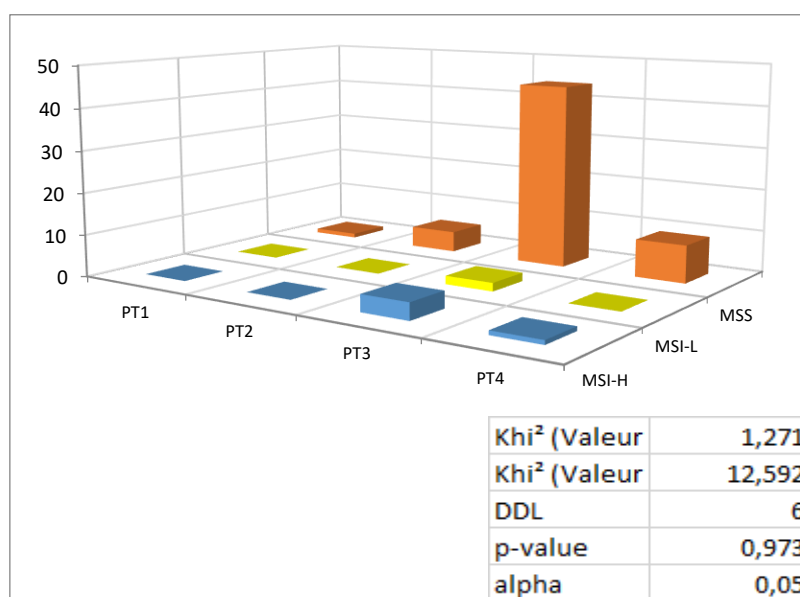


Figure 47. Expression des protéines MMR en fonction du stade.

3.4 Détection des mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF par PCR en temps réel

3.4.1 Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF

Dans notre série d'étude, on retrouve :

- ✓ Parmi les 946 échantillons de CCR testés, le gène KRAS était muté chez 461 des 946 des cas, ce qui représente 48,73%.
- ✓ Le statut de la mutation NRAS a été analysé chez 595 des 946 cas, ce qui représente 62,9% des échantillons et seulement 33/595 des patients portaient les mutations NRAS, ce qui représente 5,54%.
- ✓ Le statut de la mutation BRAF a été détecté chez 556 sur 946 des cas ce qui donne 58,7% et le résultat est que 40 sur les 556 patients présentaient cette mutation ce qui s'exprime comme 7,19% (**Tableau 12**) (**Figure 48**).

Tableau 12: Résultats des mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF.

Les mutations	KRAS Non Muté	KRAS Muté	Total	NRAS Non Muté	NRAS Muté	Total	BRAF Non Muté	BRAF Muté	Total
Nombre de cas	485 (51,27%)	461 48,73%	946	562 94,45%	33 (5,55%)	595	516 (92,81%)	40 (7,19%)	556

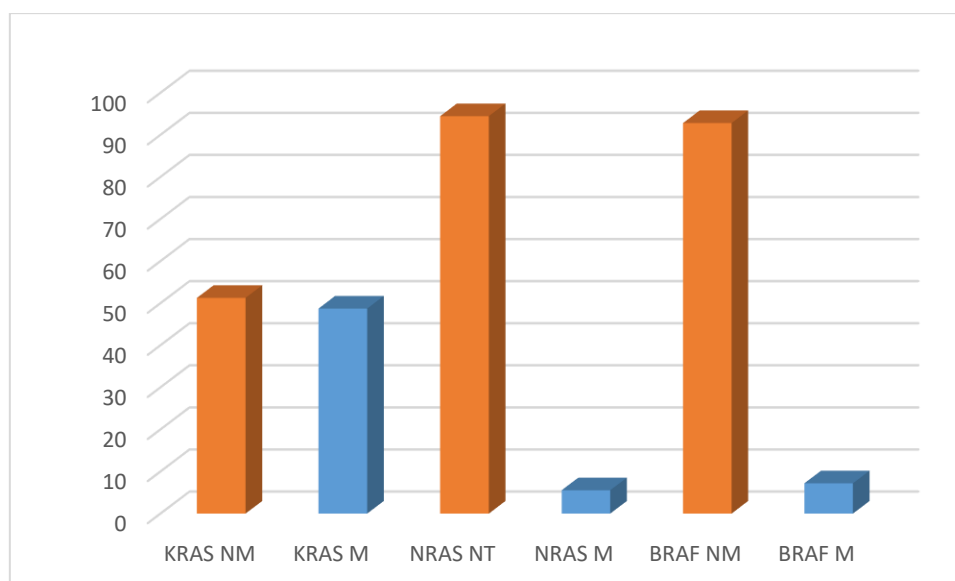


Figure 48. Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF.

Les points chauds les plus fréquents des mutations KRAS étaient dans l'exon 2(83,3%), l'exon3 (6,5%) et l'exon 4(10, 2%). Les principales mutations de KRAS étaient G12D trouvées dans 24,1% (101) des échantillons, suivies de G12V trouvées dans 19,9% (92) des cas mutés et G13D trouvées dans 13% (60) des cas mutés. La mutation de NRAS la plus fréquente était Q61R de l'exon 3, elle présente 30,3% des cas mutés. Les sous-types des mutations les plus fréquents étaient p. V600E /p. V600D de l'exon 15 trouvées chez 92,5% des cas mutés (**Tableau 13**).

Tableau 13: Fréquence et distribution des mutations KRAS, NRAS et BRAF.

Gène	Exon	Substitution nucléotidique	Substitution de codons	Substitution d'acides aminés	Nombre	%
KRAS	2	c.35G>A	GGT>AGT	p.G12D	101	24,1%
		c.35G>T	GGT>GTT	p.G12V	92	19,9%
		c.34G>T	GGT>TGT	p.G12C	35	7,6%
		c.35G>C	GGT>GCT	p.G12A	25	5,4%
		c.34G>C	GGT>CGT	p.G12R	11	2,4%
		c.34 G>A	GGT>AGC	p.G12S	10	2,2%
		c.38 G>A	GGC>GAC	p.G13D	60	13%
	3	N.I	N.I	p.G12* ou G13*	50	10,8%
		c.175G>A/c.176 C>A/ c.176C>G	GCA>ACA/GCA>GAA/ GCA> GGT	A59T/E/G	6	1,3%
		c.183A>C	CAA>GCT	p.Q61H	12	2,6%
		c.182A>G	CAA> CGT	p.Q61R	1	0,2%

NRAS		c.182A>T/ c.182A>G/ c.183A>C	CAA>CTA/ CAA>CTA	p.Q61L/R/H	10	2,2%
		N.I	N.I	p. A59*/ p.Q61*	1	0,2%
	4	c.351A>T	AAA>AAT	p.K117N	5	1,8%
		c.436G>C	GCA>ACA	p.A146T	9	1,9%
		c.436G>A/ c.436G>C/ c.437C>T	GCA>ACC/ GCA>ACA/ GCA>GTA	p.A146P/T/V	33	7,2%
	2	c.34G>T	GGT>TGT	p. G12C	2	6,1%
		c.35G>A	GGT>AGT	p. G12D	1	3%
		c.35G>T	GGT>GTT	p.G12V	1	3%
		c.35G>C	GGT>GCT	p.G12A	1	3%
		c.38 G>A	GGC>GAC	p.G13D	3	9%
		c.37G>C	GGC>CGC	p.G13R	1	3%
		N.I	N.I	p.G12*/G13*	1	3%
	3	c.182A>G	CAA>CGA	p.Q61R	10	30,3%
		c.181C>A	CAA>AAA	p.Q61K	2	6,1%
		c.182A>T	CAA>CTA	p.Q61L	2	6,1%
		c.183A>C	CAA>GCT	p.Q61H	2	6,1%
		c.182A>T/ c.182A>G/ c.183A>C	CAA>CTA/ CAA>CGA/ CAA>CTA	p.Q61L/R/H	6	18,2%
	4	c.351A>T	AAA>AAT	p.K117N	1	3%
	11	c.1396G > A	GGA>GAA GGA>CGA	p.G466E	1	2,5%
		c.1405G>A	GGA>CGA	p.G469R	1	2,5%
BRAF	15	c.1799T>A	(GTG>GAG)	p.V600E	3	7,5%
		c.1799T>A /c.1799_1800del insAT	GTG>GAG/GTG>AGT	p.V600E /p.V600D	34	85%
		N.I	N.I	p.W604C	1	2,5%

NI : non identifié.

3.4.2 Corrélation des gènes RAS et BRAF avec les caractéristiques clinicopathologiques des patients

La relation entre les statuts des mutations génétiques RAS et BRAF et les différents paramètres clinicopathologiques a été également évaluée en utilisant l'analyse statistique.

3.4.2.1 Evaluation des statuts KRAS, NRAS et BRAF en fonction du sexe

- ✓ **Chez les hommes**, les mutations de KRAS, NRAS et BRAF étaient présentes respectivement dans (55,10%), (54,55%) et (45%) des cas.
- ✓ **Chez les femmes**, les mutations de KRAS, NRAS et BRAF étaient révélées respectivement dans (44,90%), (45,45%) et (55%) des cas (**Tableau 14**).

Concernant l'analyse des caractéristiques clinicopathologiques, aucune association significative n'a été trouvée entre les statuts mutationnels de KRAS, NRAS et BRAF et le sexe (**Figure 49**).

Tableau 14: Corrélation entre les statuts KRAS, NRAS et BRAF et le sexe.

Caractéristiques	KRAS NM	KRAS M	P - value	NRAS NM	NRAS M	P- value	BRAF NM	BRAF M	P- value
Sexe			0,6			0,9			0,1
Hommes	261 (53,81%)	254 (55,10%)		310 (55,16%)	18 (54,55%)		291 (56,40%)	18(45%)	
Femmes	224 (46,19%)	207 (44,90%)		252 (44,84%)	15 (45,45%)		225 (43,60%)	22(55%)	
Total	485	461		562	33		516	40	

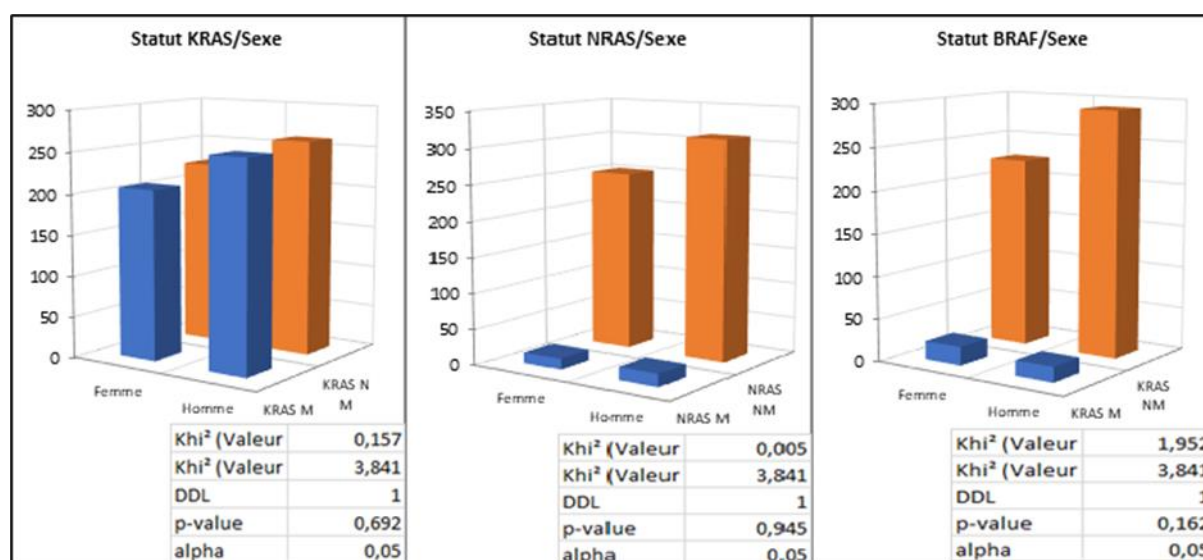


Figure 49. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le sexe.

3.4.2.2 Evaluation des statuts RAS et BRAF en fonction de l'âge

L'analyse statistique (**Tableau 15**) a révélé une fréquence de mutations KRAS plus élevée chez les sujets plus âgés (≥ 50 ans) ($p=0,004$). De même, la mutation BRAF était fréquemment apparue chez les sujets plus âgés (15% vs 85%, $p=0,004$) (**Figure 50**).

Tableau 15 : Corrélation entre l'âge et les statuts RAS et BRAF.

Caractéristiques	KRAS NM	KRAS M	P-value	NRAS NM	NRAS M	P-value	BRAF NM	BRAF M	P-value
Age			0,004			0.9			0,004
<50	140 (28,87%)	96 (20,82%)		157 (27,94%)	9 (27,27%)		153 (29,65%)	6 (15%)	
≥ 50	345 (71,13%)	365 (79,18%)		405 (72,06%)	24 (72,73%)		363 (70,35%)	34 (85%)	
Total	485	461		562	33		516	40	

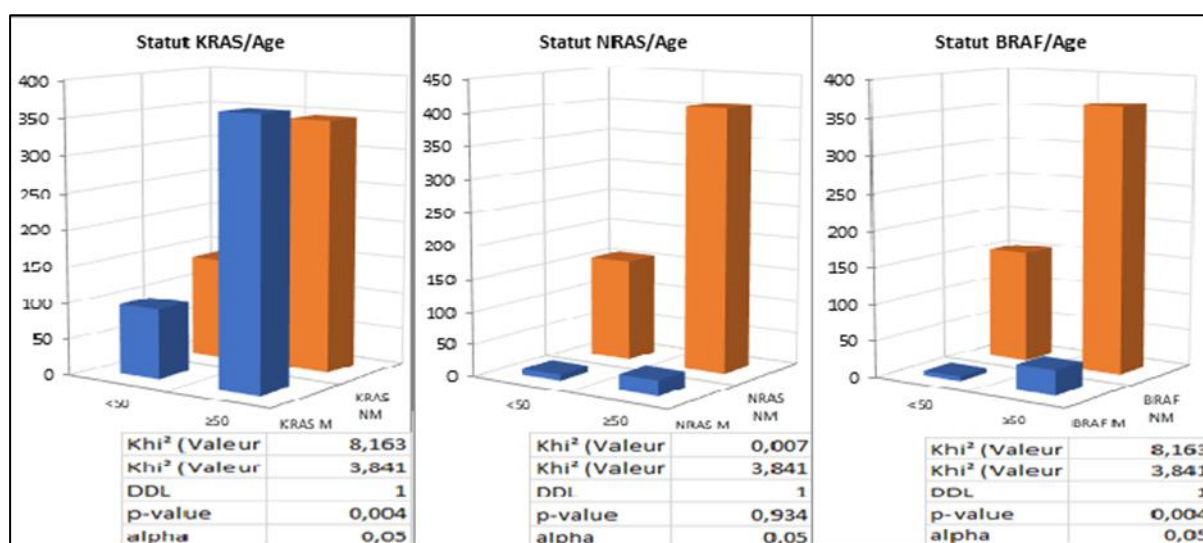


Figure 50. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec l'âge.

3.4.2.3 Etude de la relation entre le site tumoral et les statuts mutationnels KRAS, NRAS et BRAF

Dans notre cohorte, on remarque :

- ✓ **Côlon droit** : l'incidence des mutations KRAS, NRAS et BRAF étaient respectivement (22,8%), (12,1%) et **(50%)**.

- ✓ **Côlon gauche** : les mutations KRAS, NRAS et BRAF étaient présentes respectivement dans (49,0%), (54,6%) et (37,5%) des cas.
- ✓ **Rectum** : les mutations KRAS, NRAS et BRAF ont été détectées respectivement dans (23,2%), (33,3%) et (3,5%) des cas.
- ✓ **Métastase** : les mutations KRAS et BRAF ont été trouvées chez (5%) des cas (**Figure 51**).

L'analyse univariée montre que les tumeurs du groupe KRAS mutant étaient plus fréquemment retrouvées dans le côté gauche du côlon ($p=0,018$). En revanche, les tumeurs du groupe BRAS mutant étaient plus fréquemment retrouvées dans le côté droit du côlon ($p<0,001$) (**Tableau 16**).

Tableau 16: Corrélation entre le site tumoral et les statuts mutationnels KRAS, NRAS et BRAF.

Caractéris- -tiques	KRAS NM	KRAS M	P - value	NRAS NM	NRAS M	P- value	BRAF NM	BRAF M	P- value
Site tumoral			<u>0,018</u>			0.2			<u><0,001</u>
Colon droit	83 (17,11%)	105 (22,78%)		107 (19,04%)	4 (12,12%)		84 (16,28%)	20 (50%)	
Colon gauche	224 (46,19%)	226 (49,02%)		256 (45,55%)	18 (54,55%)		236 (75,74%)	15 (37,5%)	
Rectum	139 (28,66%)	107 (23,21%)		155 (27,58%)	11 (33,33%)		157 (30,43%)	3 (7,5%)	
Métastase	39 (8,04%)	23 (4,99%)		44 (7,83%)	0		39 (7,55%)	2 (5%)	
Total	485	461		562	33		516	40	

M : muté. NM : non muté

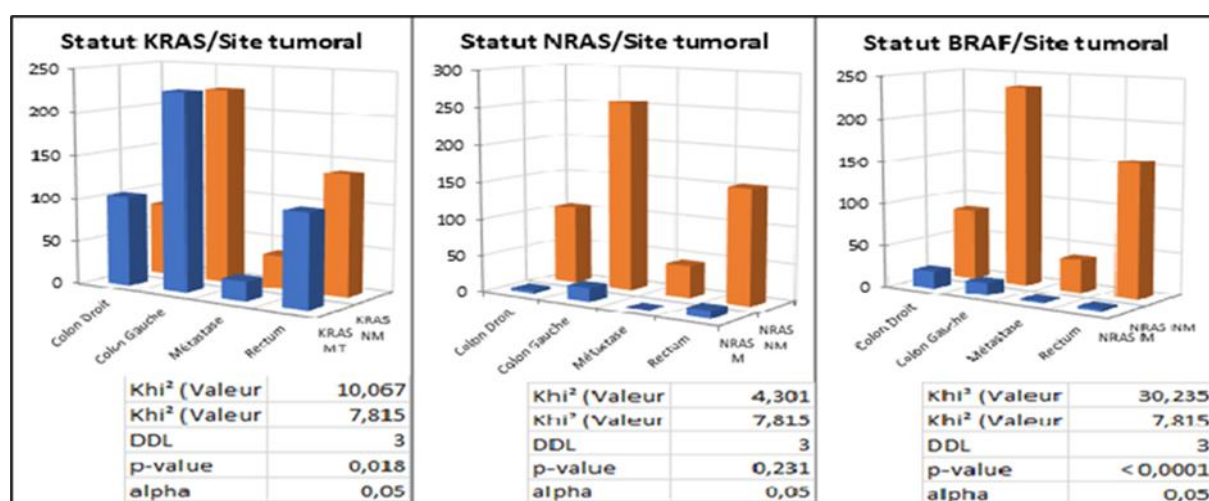


Figure 51. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le site tumoral.

3.4.2.4 Corrélation entre le type histologique et les statuts KRAS, NRAS et BRAF

Nous avons évalué la relation entre les différentes mutations étudiées et le type histologique de la tumeur (Tableau 17).

Tableau 17 : Corrélation entre le type histologique et les statuts KRAS, NRAS et BRAF.

Caractéristi- ques	KRAS NM	KRAS M	P value	- NM	NRAS NM	NRAS M	P- value	BRAF NM	BRAF M	P- value
TH			0,001				0,6			0,1
ABD	266 (54,85%)	277 (60,09%)			312 (55,52%)	17 (51,52%)		292 (56,59%)	16 (40%)	
AMD	131 (27,01%)	133 (28,85%)			154 (27,40%)	12 (36,36%)		139 (26,94%)	13 (32,5%)	
CPD	52 (10,72%)	18 (3,90%)			56 (9,96%)	3 (9,09%)		52 (10,08%)	6 (15%)	
CM	36 (7,42%)	33 (7,16%)			40 (7,12%)	1 (3,03%)		33 (6,39%)	5 (12,5%)	
Total	485	461			562	33		516	40	

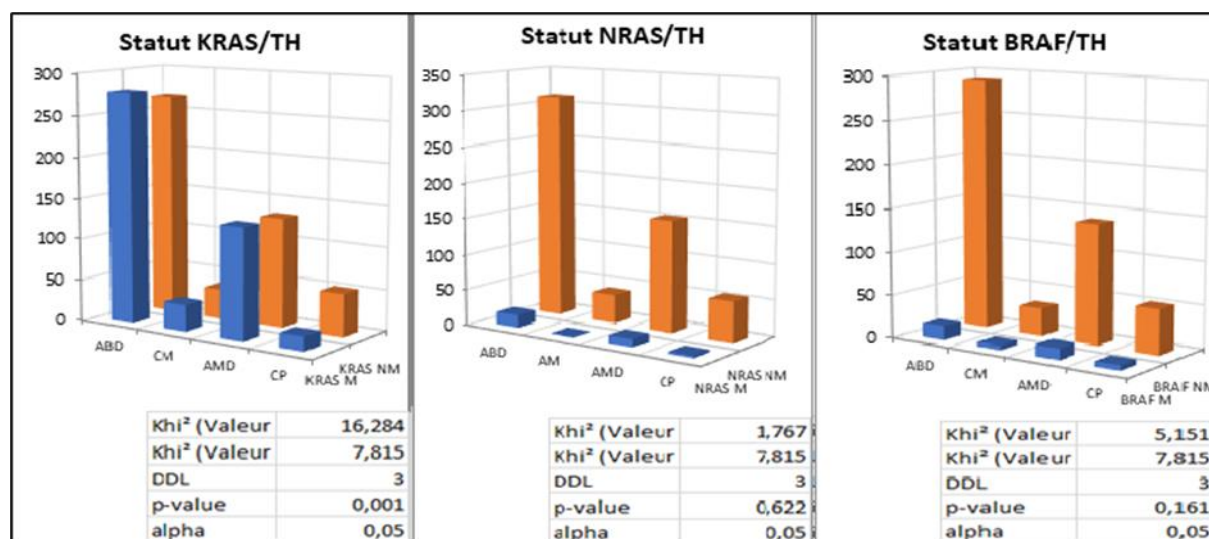


Figure 52. Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le type histologique.

Nous avons constaté dans notre étude que :

- ✓ La mutation de KRAS était identifiée dans 277 cas (**60,1%**) d'adénocarcinome bien différencié (ABD), dans 133 cas (28,8%) d'adénocarcinome moyennement différencié (AMD), dans 18 cas (3,9%) de carcinome peu différencié (CPD) et dans 33 cas (7,2%) de carcinome mucineux (CM).
- ✓ La mutation de NRAS était identifiée dans 17cas (51,5%) d'adénocarcinome bien différencié (ABD), 12cas (36,4%) d'adénocarcinome moyennement différencié (AMD), dans 3 cas (9,1%) de carcinome peu différencié (CPD) et dans 1cas (3%) de carcinome mucineux (CM).
- ✓ La mutation de NRAS est identifiée dans 16 cas (40%) d'adénocarcinome bien différencié (ABD), dans 13 cas (32,5%) d'adénocarcinome moyennement différencié (AMD), dans 6 cas (15%) de carcinome peu différencié (CPD) et dans 5 cas (12,5%) de carcinome mucineux (CM).

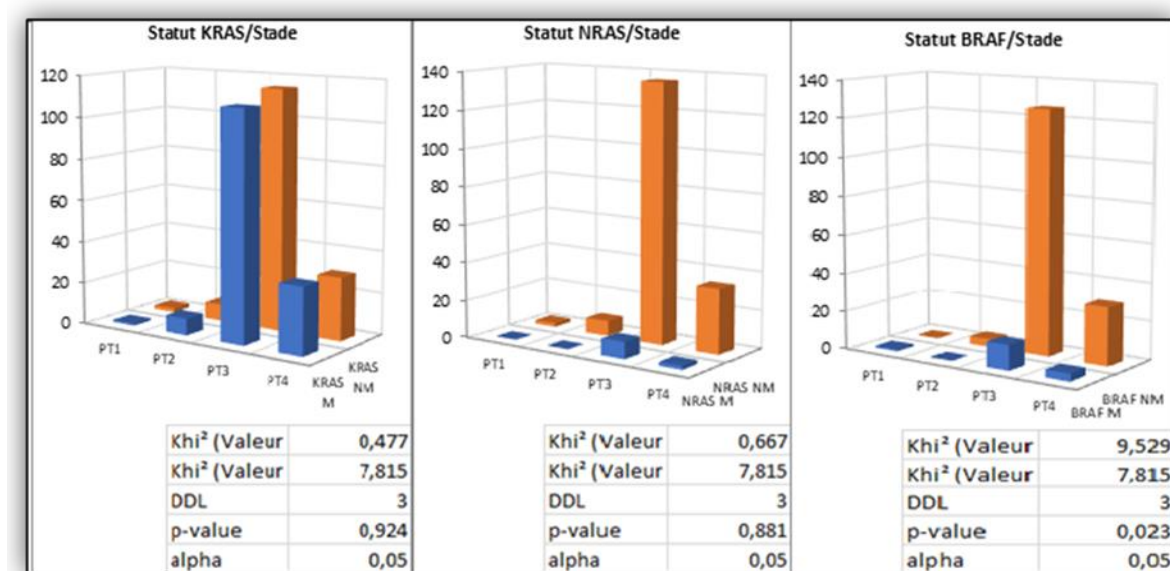
L'analyse statistique montre une association significative entre le statut KRAS, en termes de sous-types histologiques, et l'adénocarcinome bien différencié (60,1% des cas/ $p=0,001$) (**Figure 52**).

3.4.2.5 Corrélation entre le stade et les statuts KRAS, NRAS et BRAF

- ✓ Les mutations de KRAS, NRAS et BRAF étaient détectées respectivement dans (72,6%), (81,82%) et (68,75) des cas de CCR diagnostiqués au stade III (**Figure 53**).
- ✓ Il convient de mentionner que les tumeurs BRAF-mutant étaient statistiquement associées au stade III ($p=0,02$). En revanche, il n'y avait pas d'associations significatives entre les statuts KRAS et NRAS et le stade de la tumeur (**Tableau 18**).

Tableau 18: Corrélation entre le stade et les statuts KRAS, NRAS et BRAF.

Caractéristi-ques	KRAS NM	KRAS M	P - value	NRAS NM	NRAS M	P-value	BRAF NM	BRAF M	P-value
Stade T			0,9			0.8			<u>0,02</u>
I	2 (1,29%)	1 (0,67%)		2 (1,11%)	0		0	1 (6,25%)	
II	8 (5,16%)	8 (5,33%)		8 (4,44%)	0		4 (2,50%)	0	
III	115 (74,19%)	109 (72,6%)		136 (75,56%)	9 (81,82%)		126 (78,75%)	11 (68,75)	
IV	30 (19,36%)	32 (21,33%)		34 (18,89)	2 (18,18%)		30 (18,75%)	4 (25%)	
NI	330 (0%)	311 (0%)		382 (0%)	22 (0%)		356 (0%)	24 (0%)	
Total	485	461		562	33		516	40	

**Figure 53.** Association des altérations génétiques KRAS, NRAS et BRAF avec le stade.

3.4.3 Evaluation des relations entre le statut KRAS et les statuts NRAS et BRAF

- ✓ Le tableau 19 montre que les tumeurs KRAS-mutant n'étaient pas statistiquement associées aux mutations NRAS ni BRAF ($p > 0,05$) (Figure 54).

Tableau 19 : Evaluation des relations entre le statut KRAS et les statuts NRAS et BRAF.

Caractéristiques	KRAS NM	KRAS M	Total	p-value
NRAS				0,13
NRAS NM	452 (93,76%)	110 (97,34%)	562	
NRAS M	30 (6,22%)	3 (2,66%)	33	
Total	482	113	595	
BRAF				0,06
BRAF NM	417 (91.85%)	99 (97,06%)	516	
BRAF M	37 (8.15%)	3 (2.94%)	40	
Total	454	102	556	

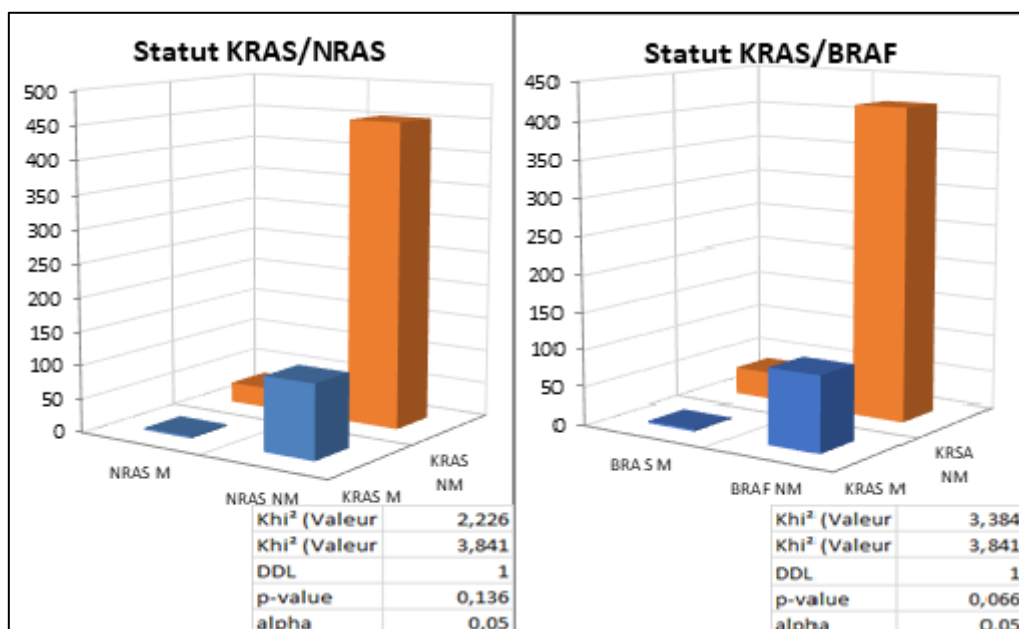


Figure 54. Association du statut mutationnel KRAS et les statuts mutationnels NRAS et BRAF.

3.4.4 Corrélation du statut NRAS avec le statut BRAF

Nous avons évalué la relation entre le statut NRAS et le statut BRAF (**Tableau 20**). L'analyse statistique a révélé que les tumeurs NRAS-mutant et BRAF-mutant sont significativement dissociées (**Figure 55**).

Tableau 20 : Etude de la relation entre le statut NRAS et le statut BRAF.

<i>Caractéristiques</i>	<i>NRAS NM</i>	<i>NRAS M</i>	<i>Total</i>	<i>p-value</i>
<i>BRAF</i>				0,06
<i>BRAF NM</i>	485 (93.38%)	31 (100%)	516	
<i>BRAF M</i>	40 (7.62%)	0	40	
<i>Total</i>	525	31	556	

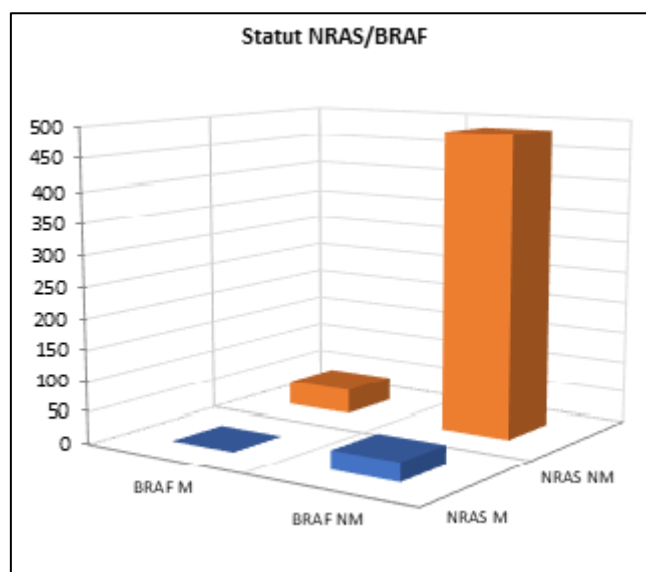


Figure 55. Association du statut mutationnel NRAS et le statut mutationnel BRAF.

Chapitre 4. Discussion

4.1 Discussion

Le cancer colorectal (CCR) reste un défi de santé publique important à l'échelle mondiale, avec des incidences et des taux de mortalité variables selon les régions mais assez conséquentes. Les taux d'incidence du CCR sont plus élevés en Europe, en Australie et en Nouvelle-Zélande, et les taux de mortalité sont plus élevés en Europe de l'Est. Les taux d'incidence du cancer du côlon et du rectum ont tendance à être faibles dans la plupart des régions d'Afrique et au sud de l'Asie centrale [13]. En Algérie, 6 526 nouveaux cas ont été enregistrés chez les deux sexes en 2020 [14]. La transition d'une économie à faible revenu à une économie à revenu plus élevé et les changements du mode de vie sont des facteurs susceptibles d'affecter la survenue du cancer colorectal (facteurs alimentaires, incidence accrue de l'obésité et diminution de l'activité physique).

L'épidémiologie du CCR a considérablement changé au cours des trois dernières décennies. De nombreuses questions se posent concernant l'étiologie, le profil moléculaire et la composante génétique de cette maladie. Notre recherche présente un aperçu des profils mutationnels des gènes KRAS, NRAS et BRAF en termes de fréquence, de distribution et de corrélations avec des facteurs clinicopathologiques et moléculaires dans une population algérienne diagnostiquée avec un CCR métastatique. Les corrélations identifiées peuvent contribuer à une meilleure compréhension des anomalies génétiques du CCRm et façonner des profils moléculaires qui pourraient être utilisés à l'avenir pour choisir de nouveaux traitements.

4.1.1 Les caractéristiques clinicopathologiques des patients

En fonction de l'âge au moment du diagnostic, le CCR peut être divisé en maladie à apparition précoce et tardive (diagnostiquée avant 50 ans ou après 50 ans, respectivement). Il est bien connu que le CCR est plus fréquent chez les patients âgés, bien que des analyses rétrospectives aient montré que l'incidence du CCR chez les patients jeunes a tendance à augmenter au cours de la dernière décennie [179]. Notre étude a révélé que l'âge moyen de la population sélectionnée au moment du diagnostic était de 57,9 ans (dans l'intervalle 15-93 ans). Nous déduisons que cet âge qui est inférieur à l'âge moyen 63 ans identifié en France [180], est assez proche de celui trouvé dans différents pays arabes et africains 55,56 ans au Maroc [181], 58 ans en Arabie saoudite [182] et 46,7 ans au Togo [183]. Nous estimons que cela est dû au fait que plus de 54 % de la population algérienne est âgée de moins de 30 ans. Les lignes directrices actuelles recommandent un dépistage dès l'âge de 45 ans dans la population générale, ce qui pourrait contribuer à réduire le nombre de cas de CCR diagnostiqués à un stade avancé.

Concernant l'incidence du CCR selon le sexe, plusieurs études préliminaires ont rapporté la prédominance masculine. Les taux d'incidence et de mortalité sont plus élevés chez les hommes que chez les femmes [181,184,185,186]. Dans notre étude, 515 cas étaient des hommes et 431 cas étaient des femmes ce qui donne un sex-ratio (hommes/femmes) de 1,19.

La plupart des tumeurs diagnostiquées étaient des adénocarcinomes bien différenciés qui étaient identifiés dans 57,39% des cas étudiés. De plus, les taux des adénocarcinomes moyennement et les carcinomes peu différenciés / mucineux étaient comparables aux données de la littérature. Ils étaient, respectivement 35,90% et 7,29% contre 27,5 % et 7,8 % [187]. Le sous-type histologique de l'adénocarcinome bien différencié pourrait présenter un bon pronostic chez les patients. Cependant, selon nos résultats, la majorité des cas de CCR a été diagnostiqué à un stade tardif : 73,44% au stade III et 20,33% au stade IV. Du même, l'étude de Joachim et *al.*(2019) a montré que 62,4 % des cas étaient diagnostiqués au stade III-IV, dont 36,6 % des patients présentaient des métastases au moment du diagnostic (stade IV) [188].

4.1.2 Profils mutationnels des gènes KRAS, NRAS et BRAF et leurs corrélations avec les facteurs clinicopathologiques des patients

4.1.2.1 Le gène KRAS

L'analyse génétique des points chauds des mutations somatiques dans les gènes KRAS, NRAS et BRAF est désormais une pratique courante pour sélectionner les patients atteints du cancer colorectal métastatique éligibles à une thérapie ciblée anti-EGFR [189]. Dans les cancers colorectaux, la fréquence de la mutation sur le gène KRS est rapportée dans 33 à 48% des cas [190,28]. L'incidence de mutations KRAS dans notre série 48,7% (461/946) est conforme aux études arabes, européennes, asiatiques et latino-américaines [191,192,193,194,195,196] dont 83,3% des cas mutés sont situés dans l'exon 2 (codons 12 et 13). Cette incidence est proche de celles rapportées dans d'autres études danoise, marocaine et chinoise qui donnent respectivement 86,1%, 88,3% et 90% [197,182,198].

Des mutations d'exons de KRAS en dehors de l'exon 2 sont survenues chez 16,7% des patients de CCR dans notre étude, dont 30 cas (6,51%) présentent des mutations dans l'exon 3 de KRAS et 47 cas (10,2%) dans l'exon 4 de KRAS. Le taux des mutations KRAS dans l'exon 4 (10,2%) est plus élevé que celui trouvé dans des recherches antérieures [198, 199, 200]. Les mutations les plus fréquentes étaient : c.35>A (G12D) ; 21,9%, c.35G>T (G12V) ; 19,95%, c.34G>T (G12C) ; 7,59% et C.38G> A (G13D) ; 13% qui correspondent à 62,44% vs 75,4% de tous les cas mutés dans une série citée dans une publication marocaine récente [19]. En concordance

avec notre résultat, les sous-types de mutations les plus répandus en Europe et en Asie, sont G12D, G12V, G13D [192,201,202]. De plus, il a été observé que les sous-types de mutations les plus répandus du codon 12 étaient les statuts des mutations G12D, G12V, G12C [197].

L'objectif de l'analyse génétique somatique et l'épidémiologie des allèles KRAS est de savoir si le choix de l'allèle KRAS influence les aspects clinicopathologiques d'un cancer donné. La valeur pronostique des mutations de KRAS a bien été étudiée dans nombreux contextes cancéreux. Par exemple, dans le cancer colorectal, la mutation KRAS-G12D, l'allèle le plus courant et la mutation KRAS-G12V ont été associées à une mauvaise survie globale par rapport aux patients atteints de cancers de type sauvage (WT) KRAS, alors que les mutations du codon 13 ne le sont pas [203,204,205,206]. Dans notre série, la prévalence de la mutation ponctuelle KRAS-G12D était de 23,9% des cas mutés.

KRAS-G^{12C} (glycine en cystéine) est devenu une cible prometteuse pour des nouvelles thérapies dirigées dans les tumeurs solides. Récemment, ASP2453, un nouvel inhibiteur de KRAS G12C, a inhibé de manière puissante et sélective la croissance tumorale induite par KRAS-G12C [207]. Le premier inhibiteur sélectif de KRAS-G12C a été signalé en 2013. KRAS est une GTPase, et les inhibiteurs sélectifs de KRAS-G12C ont initialement été conçus pour se lier au résidu Cys 12 dans la Poche de switch II, ces inhibiteurs bloquent KRAS-G12C dans un état lié au GDP inactif. L'AMG510 et MRTX849 agissent de manière similaire : tous les deux se lient dans la poche du commutateur II [208]. Dans cette étude, la prévalence de la mutation KRAS-G12C est de 7,6% des cas KRAS mutants, ce qui pourrait présenter un grand nombre de patients qui pourraient bénéficier de ces thérapies ciblées. Bien que la fréquence de la mutation KRAS-G12C vue ici soit moins élevée par rapport aux données d'une publication italienne 12% [209], elle est un peu plus élevée que la fréquence trouvée dans une étude taïwanaise 5,7% [210].

Concernant l'analyse de la corrélation des mutations KRAS et le groupe d'âge, notre étude a révélé une prévalence plus élevée de ces mutations chez les sujets plus âgés (≥ 50 , $p=0,004$) [192,211]. Par contre, une étude américaine récente suggère que les mutations KRAS surviennent fréquemment chez les sujets plus jeunes [212]. Conformément à notre résultat, Elagy et al. (2021) [181] ont constaté que le colon gauche abrite plus de mutations KRAS. En revanche, d'autres études, ont montré que les mutations KRAS étaient fréquemment localisées dans le colon droit [213,214]. Il est largement admis que le cancer du côlon droit et gauche a une carcinogenèse moléculaire distincte. Les mutations KRAS étaient significativement associées aux tumeurs bien et moyennement différenciées [181,215]. Bien que, d'autres études aient observé une corrélation entre ces mutations KRAS et le stade TNM avancé [181,216],

aucune association significative a été révélée entre le KRAS et le stade TNM dans notre série et les statuts mutationnels NRAS et BRAF [199]. De plus, les mutations KRAS et BRAF s'excluent généralement mutuellement dans les tumeurs colorectales [87,88].

4.1.2.2 Le gène NRAS

Les patients porteurs d'une mutation NRAS forment un sous-groupe distinct du CCRm d'un point de vue clinique et moléculaire, 3 à 5% des CCR présentent une mutation dans l'exon 2,3 et 4 de NRAS. Dans notre recherche, les mutations du gène NRAS ont été détectées dans 5,54% des cas. Cette incidence de mutations NRAS est conforme aux expériences précédentes [192,212], elle est relativement élevée par rapport à celle rapportée dans une autre étude chinoise 3,4% [199]. En revanche, un groupe de recherche slovaque a trouvé un taux de mutations NRAS plus élevé, 7,2 % [217]. Nos données ont également révélé qu'il n'y a pas de corrélation significative entre la mutation génétique NRAS et les caractéristiques clinicopathologiques des patients atteints de CCR. En concordance avec nos données, une étude française publiée par Rimbart et son équipe (2018) [215] montre qu'aucune association significative n'a été identifiée.

4.1.2.3 Le gène BRAF

La mutation génétique de BRAF est l'un des sous-types de mutations les plus importants dans le cancer colorectal. Depuis peu, les inhibiteurs de BRAF tels que le vemurafenib, le dabrafenib ont révolutionné le traitement du mélanome métastatique. Des études en cours s'efforcent également de reproduire ces résultats chez les patients atteints de CCRm. Le rôle prédictif de la mutation BRAF vis-à-vis de la chimiorésistance est toujours en débat. Il convient de noter que la faible prévalence de cette mutation rend son identification difficile en tant que marqueur prédictif. Des mutations de BRAF surviennent dans 8 % de toutes les tumeurs et dans 5 à 12 % des cancers colorectaux métastatiques CCRm [218,219]. Nous avons trouvé que le statut des mutations BRAF a été révélé dans 7,19 % des cas de CCRm testés, ce taux de mutations est cohérent avec celui rapporté par Hernández-Sandoval [220] chez les populations de l'Amérique latine et des Caraïbes et est inférieur au taux de 14,9% rapporté chez une population chinoise [221]. Fait intéressant, que nous avons trouvé trois mutations BRAF en dehors de l'exon 15.

Dans notre recherche, nous avons évalué les caractéristiques clinicopathologiques du CCRm BRAF muté où nous confirmons avec des études récentes que les patients porteurs d'une mutation BRAF sont susceptibles d'être plus âgés [222]. Le cancer du côlon du droit abrite plus

de mutations de BRAF que le cancer du côté gauche, ce qui pourrait entraîner une résistance à la thérapie ciblée anti-EGFR [223] et aggraver le pronostic [224]. Confirmant aux résultats de plusieurs études [215,224,225], nous avons observé que les mutations BRAF sont principalement localisées dans le colon droit, ces tumeurs BRAF-mutant sont également associées au stade avancé [226].

4.1.3 Evaluation du statut MSI

Pour augmenter l'identification des patients atteints de l'instabilité des microsatellites (MSI) dans la pratique clinique incluant ceux atteints du syndrome de Lush, il est recommandé d'analyser le statut MSI de tous les CCR réséqués. Malheureusement, il était difficile de déterminer les échantillons qui pourraient être atteints du syndrome de Lynch dans la présente recherche. De plus, le statut MSI élevé (MSI-H) est associé à un meilleur pronostic dans le CCR à un stade précoce et à un manque de bénéfice du traitement adjuvant par le 5-fluorouracile au stade II de la maladie. Environ 12 à 20 % des CCR sont expliqués par un MSI-H dû au MMR-D, avec une incidence plus élevée aux stades précoces (environ 20 % aux stades I et II, et 12 % au stade III) et une incidence plus faible aux stades précoces et aux métastases (4 à 5%) [227]. En revanche, MSI-H a été observé chez 80% des cas de stade III et 20% des cas de stade IV dans notre cohorte.

Depuis peu de temps, le phénotype tumoral MSI est devenu un biomarqueur prédictif de la sensibilité aux traitements à base de l'immunothérapie. Le succès révolutionnaire des inhibiteurs de points du contrôle dans le CCR métastatique MMR-D a ouvert un nouveau scénario thérapeutique pour les patients atteints de ces tumeurs. Les CCR-MSI-H, dans les contextes sporadiques et héréditaires, se caractérisent par des caractéristiques moléculaires et clinicopathologiques distinctives et représentent un sous-ensemble unique de CCR qui fait l'objet d'un intérêt croissant et suscite des efforts de recherche fervents [228].

Le phénotype MSI a été rapporté chez 8,18% des patients, dont 6,36% présentaient un phénotype MSI-H. Ce taux de MSI est inférieur à celui rapporté par Popescu et son équipe [12], une instabilité des microsatellites a été retrouvée chez 16,3 % des patients, dont 11,6 % avaient un MSI-H. Il convient de mentionner que les tumeurs colorectales dMMR/MSI-H ont un profil pathologique distinct comprenant des tumeurs primaires droites, mucineuses et peu différenciées ainsi qu'une occurrence accrue de mutations BRAF [229]. En revanche, nous n'avons identifié aucune association statistique entre le phénotype MSI et les différents paramètres clinicopathologiques étudiés ni avec les autres types de mutations analysés.

Conclusion

L'ensemble de nos données fournit un aperçu complet du profil moléculaire des mutations KRAS, NRAS, BRAF et leurs caractéristiques clinicopathologiques chez les patients algériens atteints de cancer colorectal métastatique. La prévalence des principales mutations motrices du CCR dans notre étude était conforme à la littérature publiée à l'échelle mondiale. Le taux des mutations d'exons de KRAS en dehors de l'exon 2 semble plus élevé par rapport à celui rapporté dans différents résultats de la littérature. Conformément à plusieurs études, il a été observé que les sous-types de mutations KRAS les plus répandus étaient les statuts des mutations G12D, G12V et G13D. De plus, nous avons observé que les mutations KRAS étaient principalement localisées dans les tumeurs du côté gauche. Néanmoins, les tumeurs situées dans le côlon droit présentaient une fréquence de mutations BRAF plus élevée que celles du côlon gauche.

Une meilleure compréhension de l'analyse génétique du cancer colorectal permettrait de définir les biomarqueurs prédictifs et pronostiques qui aideraient les oncologues à sélectionner les thérapies ciblées les plus appropriées aux patients. Fait intéressant, de souligner que le colon gauche s'est révélé plus sensible aux thérapies anti-EGFR que le cancer du côlon droit. La présence des mutations KRAS (exons 2, 3 et 4), NRAS (exons 2, 3 et 4) et BRAF (exons 11 et 15) sont associées à une résistance aux anticorps monoclonaux anti-récepteur du facteur de croissance épidermique. KRAS - G12C est devenu une cible prometteuse pour de nouveaux traitements ciblés des tumeurs solides.

Notre recherche montre que le test immunohistochimique des protéines du système MMR au niveau du Service d'Anatomie-Cytologie Pathologiques et Pathologie Moléculaire du CHU Mustapha dispose de performances diagnostiques fiables pour mettre en évidence les instabilités des microsatellites (MSI) chez les patients porteurs de cancer colorectal métastatique. Nos données soutiennent l'utilisation des anticorps MSI en immunohistochimie (IHC) pour obtenir une détection sensible des tumeurs présentant un déficit de réparation des mésappariements d'ADN. Ce test est nécessaire pour orienter le traitement adjuvant et immunologique. Les patients porteurs de cancer colorectal métastatique MSI-H pourraient potentiellement bénéficier d'une immunothérapie en Algérie. Cela permettrait également de diagnostiquer le syndrome de Lynch pour une surveillance et une prise en charge optimale des patients.

Malheureusement, les données de la survie ne sont pas disponibles, car nos échantillons viennent de différents centres Anti-Cancer du pays. En effet, l'implication clinique de l'épidémiologie moléculaire serait éclairée par les données de la survie et pourrait être un outil

puissant pour orienter et informer les oncologues en vue de décrypter les différents résultats du traitement. Les tests RAS étaient initialement limités aux mutations des points chauds des exons 2 et 3 de KRAS , et ont été complétés par une analyse RAS dite « étendue » (des substitutions de points chauds dans l'exon 4 de KRAS et les exons 2, 3 et 4 de NRAS) il y a seulement quelques années .En revanche, cette étude est la première étude qui porte sur l'analyse de la fréquence des sous-types de mutations des gènes KRAS, NRAS et BRAF dans une large série en Algérie grâce à l'utilisation des techniques performantes de PCR.

Le CCR est une maladie complexe en raison de sa grande hétérogénéité ; ainsi, un traitement efficace pourrait être amélioré par la mise en œuvre d'une approche de médecine personnalisée. Malgré l'amélioration constante des méthodes diagnostiques et thérapeutiques individualisées, le CCR reste l'un des plus grands problèmes de la médecine contemporaine.

Comprendre les mécanismes impliqués dans la physiopathologie et l'évolution du carcinome colorectal, ainsi que les éventuelles spécificités pouvant influencer la présentation clinique et les résultats des patients, va permettre sans doute de développer des traitements plus efficaces. Dans ce contexte, l'identification de sous-types moléculaires (consensus) et l'élaboration de stratégies visant chacun d'eux permettraient d'obtenir de meilleurs résultats. La classification des sous-types CMS dans le CCR pourrait être utile dans la conception de nouveaux essais pour identifier des biomarqueurs fiables où les patients doivent être stratifiés dans le bon contexte clinique (stade précoce versus stade IV).

La large disponibilité de nouvelles technologies pour sa surveillance, son diagnostic précoce et ses thérapies continuera à soutenir la lutte contre le CCR. Les différentes analyses de la biopsie liquide (exosomes et ADNct) pourraient jouer un rôle important en tant qu'un outil diagnostique, pronostique et prédictif pour guider le choix du traitement le plus approprié dans le domaine de l'oncologie de précision pour les patients atteints de CCRm. La nouvelle frontière de la biopsie liquide dans le CCRm serait la détection de biomarqueurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées (RAS/BRAF/HER2...) et à l'immunothérapie(MSI). Il sera fondamental pour introduire son application dans la pratique clinique où il a déjà fait des preuves, comme dans le cas de la réexposition à des anti- EGFR ; cela pourrait également favoriser une standardisation progressive du prélèvement d'échantillons et des techniques de détection ultérieures. L'identification des MSI ainsi que des mutations motrices les plus courantes fournissent une meilleure image du contexte moléculaire de la forte incidence du CCR dans la population algérienne, encourageant ainsi fortement des recherches prospectives.

Annexes

Annexe I



Un automate de circulation



Un enrobage des tissus par la paraffine



Un remplissage des moules sur la plaque froide



Des blocs de paraffine enrobant le prélèvement



Une confection des coupes de 3 microns au microtome



Etalement du ruban



Automate de coloration



Lame de HE montée

Annexe 2

Les appareillages utilisés



Microtome



Etuve



Bain marie



Micro-centrifugeuse



Thermocycleur en temps réel Sa Cyclor -

96



La plateforme de PCR Idylla

Annexe 3

Préparation de la solution mère

▪ Réaction 1 et 6

Réactifs	Concentration finale	Volume par échant
Réaction master mix	1X	33.6 µl
Contrôle Positif mix ADN/ eau/ ou échantillon ADN à 2ng /µl	10 ng	10.5 µl
Eau sans nucléase	X	6.3 µl

▪ Réaction 2 et 3

Réactifs	Concentration finale	Volume par échantillon
Réaction master mix	1X	37.8 µl
Positif contrôle mix ADN, eau, ou échantillon ADN à 2ng /µl	10 ng	10.5 µl
Eau sans nucléase	X	2. 1µl

▪ Réaction 4 et 5

Réactifs	Concentration finale	Volume par échantillon
2X réaction master mix	1X	35.7 µl
Contrôle positif mix ADN, eau, ou échantillon ADN à 2ng /µl	10 ng	10.5 µl
Eau sans nucléase	X	4. 2µl

Références bibliographiques

- [1]. Xie Y.H., Chen Y.X., Fang J.Y. Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal Transduct Target Ther.* 2020; 5(1):22.
- [2]. Van der Stok E.P., Spaander M.C.W., Grunhagen D.J., Verhoef C., Kuipers E.J. Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; 14:297–315.
- [3]. Van Cutsem E., Cervantes A., Nordlinger B., Arnold D. Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol.* 2014;25 Suppl 3:iii1–iii9.
- [4]. Sforza V., Martinelli E., Ciardiello F., Gambardella V., Napolitano S., Martini G. et al. Mechanisms of resistance to anti-epidermal growth factor receptor inhibitors in metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol.* 2016;22(28):6345–61.
- [5]. Douillard J.Y., Oliner K.S., Siena S., Tabernero J., Burkes R., Barugel M. et al. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;369:1023–1034.
- [6]. Van Cutsem E., Lenz H.J., Kohne C.H., Heinemann V., Tejpar S., Melezinek I. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015;33:692–700.
- [7]. Mizukami, T., Izawa, N., Nakajima, T.E. et al. Targeting EGFR and RAS/RAF Signaling in the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer: From Current Treatment Strategies to Future Perspectives. *Drugs* .2019 ; 79 :633–645.
- [8]. Siena S., Sartore-Bianchi A., Di Nicolantonio F., Balfour J., Bardelli A. Biomarkers predicting clinical outcome of epidermal growth factor receptor-targeted therapy in metastatic colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(19):1308–24.
- [9]. Zenonos K., Kyprianou K. RAS signaling pathways, mutations and their role in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol* .2013;5:97–101.
- [10]. Prior I.A., Lewis P.D., Mattos C. A comprehensive survey of Ras mutations in cancer. *Cancer Res.* 2012;72(10):2457–2467.
- [11]. Taieb J., Le Malicot K., Shi Q., Penault-Llorca F., Bouché O., Tabernero J. et al. Prognostic Value of BRAF and KRAS Mutations in MSI and MSS Stage III Colon Cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 109(5):djw272.
- [12]. Popescu R.C., Tocia C., Brînzan C., Cozaru G.C., Deacu M., Dumitru A. et al. Molecular profiling of the colon cancer in South-Eastern Romania: Results from the MERCUR study. *Medicine (Baltimore)*. 2021;100(1):e24062.
- [13]. Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A. et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* .2021; 71:209–249.
- [14]. World health Organisation (WHO). Algeria: The Global cancer Observatory. Globocan:2020. Accessed MARTH 3,2020. <https://gco.iarc.fr › data › 12-algeria-fact-sheets>.
- [15]. Yue Xi, Pengfei Xu. Global colorectal cancer burden in 2020 and projections to 2040, *Translational Oncology*.2021; 14(10).

- [16].Sulaiman S., Marciani L. MRI of the Colon in the Pharmaceutical Field: The Future before us. *Pharmaceutics*. 2019; 11 (4):146.
- [17].Petras R.E., Frankel W.L. Large Intestine (Colon). *Modern Surgical Pathology*. 2009; 755–836.
- [18].Ponz de Leon M., Di Gregorio C.Pathology of colorectal cancer.*Dig Liver Dis*.2001; 33(4):372-88.
- [19].Väyrynen S. Histological and molecular features of serrated colorectal adenocarcinoma and its precursor lesions. Academic dissertation in health and bioscience. University of Oulu, Finland.2016.
- [20].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.
- [21].Radtke F., Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. *Science*. 2005; 307(5717):1904-9.
- [22].Barrasa J.I., Olmo N., Lizarbe M.A., Turnay J. Bile acids in the colon, from healthy to cytotoxic molecules. *Toxicol In Vitro*. 2013; 27(2):964-77.
- [23].Bogaert J., Prenen H. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann. Gastroenterol*. 2014; 27, 9–14.
- [24].Katherine W., Xie G. Updates on the Molecular Genetics of Colorectal Cancer. *Colorec Cancer*.2017; 3:1.
- [25]. Kuipers E.J., Rösch T., Bretthauer M. Colorectal cancer screening--optimizing current strategies and new directions. *Nat. Rev. Clin. Oncol*. 2013; 10, 130–142.
- [26].Bardhan K., Liu K. Epigenetics and colorectal cancer pathogenesis. *Cancers*. 2013; 5, 676–713.
- [27].Grady W.M., Carethers J.M. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008;135(4):1079-99.
- [28].Pancione M., Remo A., Colantuoni V. Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression. *Patholog Res Int*. 2012; 2012:509348.
- [29].De Palma F.D.E., D'Argenio V., Pol J., Kroemer G., Maiuri M.C., Salvatore F. The Molecular Hallmarks of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer. *Cancers* .2019; 11, 1017.
- [30].Leowattana W., Leowattana P., Leowattana T. Systemic treatment for metastatic colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2023; 29(10):1569-1588.
- [31]. Kuipers E.J., Grady W.M., Lieberman D., Seufferlein T., Sung J.J., Boelens P.G.et al. Colorectal cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer*. 2015; 1, 15065.
- [32]. 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, 525–532.
- [33].Fearon E.R., Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* .1990; 61, 759–767.
- [34].Cho K.R., Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* .1992; 70, 1727–1731.

- [35]. Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., Mills G. Genetic Alterations in Colorectal Cancer. *GCR*. 2012; 5, 19–27.
- [36]. Krimpenfort P., Song J.-Y., Proost N., Zevenhoven J., Jonkers J., and Berns A. Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours. *Nature*. 2012; 482, 538–541.
- [37]. Jass J.R. Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*. 2007; 50, 113–130.
- [38]. Issa J.-P. Colon cancer: it's CIN or CIMP. *Clin. Cancer Res*. 2008; 14(19):5939–5940.
- [39]. Pino M.S., Chung D.C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138, 2059–2072.
- [40]. Kinzler K.W., Vogelstein B. Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. *Nature*. 1997; 386, 761, 763.
- [41]. Tariq K., Ghias K. Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol Med*. 2016; 13(1):120–35.
- [42]. Pino M.S., Chung D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138(6):2059–72.
- [43]. Koulouridi A., Karagianni M., Messaritakis I., Sfakianaki M., Voutsina A., Trypaki M. et al. Prognostic Value of *KRAS* Mutations in Colorectal Cancer Patients. *Cancers (Basel)*. 2022; 14(14):3320.
- [44]. Al-Joufi F.A., Setia A., Salem-Bekhit M.M., Sahu R.K., Alqahtani F.Y., Widyowati R. et al. Molecular Pathogenesis of Colorectal Cancer with an Emphasis on Recent Advances in Biomarkers, as Well as Nanotechnology-Based Diagnostic and Therapeutic Approaches. *Nanomaterials*. 2022; 12(1):169.
- [45]. Hankey W., Frankel W.L., Groden J. Functions of the APC tumor suppressor protein dependent and independent of canonical WNT signaling: implications for therapeutic targeting. *Cancer Metastasis Rev*. 2018; 37(1):159–172.
- [46]. Plawski A., Banasiewicz T., Borun P., Kubaszewski L., Krokowicz P., Skrzypczak-Zielinska M. et al. Familial adenomatous polyposis of the colon. *Hered Cancer Clin Pract*. 2013; 11(1):15.
- [47]. Ditonno I., Novielli D., Celiberto F., Rizzi S., Rendina M., Ierardi E. et al. Molecular Pathways of Carcinogenesis in Familial Adenomatous Polyposis. *Int J Mol Sci*. 2023; 24(6):5687.
- [48]. Fennell L.J., Kane A., Liu C., McKeone D., Fernando W., Su C. et al. APC Mutation Marks an Aggressive Subtype of *BRAF* Mutant Colorectal Cancers. *Cancers (Basel)*. 2020; 12(5):1171.
- [49]. Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell*. 2006; 127, 469–480.
- [50]. Phelps R.A., Chidester S., Dehghanizadeh S., Phelps J., Sandoval I.T., Rai K. et al. A Two-Step Model for Colon Adenoma Initiation and Progression Caused by APC Loss. *Cell*. 2009; 137, 623–634.

- [51].Chii S., Horii A., Nakatsuru S., Furuyama J., Utsunomiya J., Nakamura Y. Inactivation of both APC alleles in an early stage of colon adenomas in a patient with familial adenomatous polyposis (FAP). *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1, 387–390.
- [52].Mori Y., Nagse H., Ando H., Horii A., Ichii S., Nakatsuru S. *et al.* Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: Mutation cluster region in the APC gene. *Hum. Mol. Genet.* 1992; 1, 229–233.
- [53]. Konishi M., Kikuchi-Yanoshita R., Tanaka K., Muraoka M., Onda A., Okumura Y. *et al.* Molecular nature of colon tumors in hereditary nonpolyposis colon cancer, familial polyposis, and sporadic colon cancer. *Gastroenterology* .1996; 111, 307–317.
- [54]. Sin S.H., Yoon J.H., Kim S.W., Park W.S., Chae H.S. A Case of Sporadic Multiple Colonic Polyps in a Young Woman. *Curr. Oncol.* 2023; 30, 1293-1299.
- [55].Levine A.J. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.*1997; 88, 323–331.
- [56]. Smith G., Carey F.A., Beattie J., Wilkie M.J.V., Lightfoot T.J. Coxhead J. *et al.* Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53—Alternative genetic pathways to colorectal cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002, 99, 9433.
- [57].Malki A., ElRuz R.A., Gupta I., Allouch A., Vranic S., Al Moustafa A.-E. Molecular Mechanisms of Colon Cancer Progression and Metastasis: Recent Insights and Advancements. *Int. J. Mol. Sci.* 2021; 22, 130.
- [58]. Pino M.S., Chung D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology* .2010; 138, 2059–2072.
- [59].Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature.*2012; 487, 330–337.
- [60]. Liu J., Zhang C., Hu W., Feng Z. Tumor suppressor p53 and its mutants in cancer metabolism. *Cancer Lett.* 2015; 356, 197–203.
- [61]. Inamura K. Colorectal Cancers: An Update on Their Molecular Pathology. *Cancers.*2018; 10, 26.
- [62]. Yan H.H.N., Lai J.C.W., Ho S.L., Leung W.K., Law W.L., Lee J.F.Y. *et al.* RNF43 germline and somatic mutation in serrated neoplasia pathway and its association with BRAF mutation. *Gut.*2017; 66, 1645–1656.
- [63]. Corcoran R.B., Atreya C.E., Falchook G.S., Kwak E.L., Ryan D.P. *et al.* Combined BRAF and MEK Inhibition with dabrafenib and trametinib in BRAF V600-mutant colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33, 4023–4031.
- [64]. Larkin J., Ascierto P.A., Dreno B., Atkinson V., Liskay G., Maio M. *et al.* Combined vemurafenib and cobimetinib in BRAF-mutated melanoma. *N. Engl. J. Med.* 2014; 371, 1867–1876.
- [65].Xu Y., Pasche B. TGF-beta signaling alterations and susceptibility to colorectal cancer. *Hum. Mol. Genet.* 2007; 16, 14–20.
- [66]. Zhu G., Pei L., Xia H., Tang Q., Bi F. Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Mol. Cancer.* 2021; 20, 143.
- [67].Hancock J.F., Parton R.G. Ras plasma membrane signalling platforms. *Biochem. J.* 2005; 389, 1–11.

- [68].Mao Z., Xiao H., Shen P.,Yang Y.,Xue, J.,Yang Y.*etal.* KRAS(G12D) can be targeted by potent inhibitors via formation of salt bridge. *Cell Discov.* 2022; 8, 5.
- [69]. Vögler O., Barceló J.M., Ribas C., Escribá P. V.Membrane interactions of G proteins and other related proteins. *Biochim. Biophys. Acta-Biomembr.* 2008; 1778, 1640–1652.
- [70].Cercek A., Braghiroli M.I., Chou J.F.,Hechtman J.F., Kemeny N., Saltz L.*et al.* Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. *Clin. Cancer Res.* 2017; 23, 4753–4760.
- [71]. Haigis K.M. KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends Cancer.*2017; 3, 686–697.
- [72].Hammond D.E., Mageean C.J., Rusilowicz E.V., Wickenden J.A.,Clague M.J.,Prior I.A. Differential reprogramming of isogenic colorectal cancer cells by distinct activating KRAS mutations. *J. Proteome Res.* 2015; 14, 1535–1546.
- [73].Fan G., Lou L., Song Z., Zhang X., Xiong X.F. Targeting mutated GTPase KRAS in tumor therapies. *Eur. J. Med. Chem.* 2021; 226, 113816.
- [74].Huang L., Guo Z., Wang F.,Fu L. KRAS mutation: From undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduct. Target. Ther.* 2021; 6, 386.
- [75].Nuevo-Tapióles C., Philips M.R. The role of KRAS splice variants in cancer biology. *Front. Cell Dev. Biol.* 2022;10, 1033348.
- [76].Bteich F., Mohammadi M., Li T., Bhat M.A., Sofianidi A., Wei N. *et al.* Targeting KRAS in Colorectal Cancer: A Bench to Bedside Review. *Int. J. Mol. Sci.* 2023;24, 12030.
- [77].Hunter J.C., Manandhar A., Carrasco M.A., GurbaniD., Gondi S., Westover K.D. Biochemical and structural analysis of common cancer-associated KRAS mutations. *Mol. Cancer Res.* 2015;13, 1325–1335.
- [78].Cox A.D., Fesik S.W., Kimmelman A.C., Luo J., Der C.J. Drugging the undruggable RAS: Mission Possible? *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014; 13, 828–851.
- [79].Pino M.S., Chung D.C. The chromosomal instability pathway in colon cancer. *Gastroenterology.* 2010; 138(6):2059-72.
- [80]. Luo Q., Chen D., Fan X., Fu X., Ma T., Chen D. KRAS and PIK3CA bi-mutations predict a poor prognosis in colorectal cancer patients: A single-site report. *Transl. Oncol.* 2020 ; 13(12):100874
- [81]. Korzeniecki C., Priefer R. Targeting KRAS mutant cancers by preventing signaling transduction in the MAPK pathway. *Eur. J. Med. Chem.* 2020;211: 113006.
- [82].László L., Kurilla A., Takács T., Kudlik G., Koprivanacz K., Buday L.*et al.* Recent Updates on the Significance of KRAS Mutations in Colorectal Cancer Biology. *Cells.* 2021; 10(3):667.
- [83]. Armaghany T., Wilson J.D., Chu Q., Mills G. Genetic alterations in colorectal cancer. *Gastrointest Cancer Res.* 2012; 5(1):19-27.
- [84]. Yin Y., Shen W.H. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.*2008;27(41):5443–5453.
- [85]. Caputo F., Santini C., Bardasi C., Cerma K., Casadei-Gardini A., Spallanzani A.*etal.* BRAF-Mutated Colorectal Cancer: Clinical and Molecular Insights. *Int J Mol Sci.* 2019; 20(21):5369.

- [86].Rajagopalan H., Bardelli A., Lengauer C., Kinzler K.W., Vogelstein B., Velculescu V.E. Tumorigenesis: RAF/RAS oncogenes and mismatch-repair status. *Nature*. 2002;418(6901):934.
- [87].Davies H., Bignell G.R., Cox C., Stephens P., Edkins S., Clegg S. et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*. 2002; 417(6892):949-54.
- [88].Fransén K., Klintenäs M., Osterström A., Dimberg J., Monstein H.J., Söderkvist P. Mutation analysis of the BRAF, ARAF and RAF-1 genes in human colorectal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*. 2004; 25(4):527-33.
- [89].Clarke C.N., Kopetz E.S. BRAF mutant colorectal cancer as a distinct subset of colorectal cancer: clinical characteristics, clinical behavior, and response to targeted therapies. *J GastrointestOncol*. 2015 ; 6(6):660-7.
- [90].Lièvre A., De la Fouchardière C., Samalin E., Benoist S., Phelip J.M., André T.etal. Cancers colorectaux avec mutation V600E de BRAF : où en sommes-nous ? *Bull Cancer*. 2020;107(9):881-895.
- [91]. Ros J., Baraibar I., Saoudi N., Rodriguez M., Salvà F., Tabernero J. et al . Immunotherapy for Colorectal Cancer with High Microsatellite Instability: The Ongoing Search for Biomarkers. *Cancers*. 2023; 15(17):4245.
- [92]. Nojadeh J.N., Behrouz Sharif S., Sakhinia E. Microsatellite instability in colorectal cancer. *EXCLI J*. 2018; 17:159-168.
- [93].Li K., Luo H., Huang L., Luo H., Zhu X. Microsatellite instability: A review of what the oncologist should know. *Cancer Cell Int*. 2020 ;20, 16.
- [94] . Jiricny J. The multifaceted mismatch-repair system. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2006; 7(5):335-46.
- [95]. Kunkel TA., Erie D.A. Eukaryotic Mismatch Repair in Relation to DNA Replication. *Annu Rev Genet*. 2015; 49:291-313.
- [96].Hawkins N., Norrie M., Cheong K., Mokany E., Ku S.-L., Meagher A. et al. Ward R. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology*. 2002;122(5):1376-87.
- [97]. Ortega J., Lee G.-S., Gu L., Yang W., Li G.-M. Mismatch-bound human MutS-MutL complex triggers DNA incisions and activates mismatch repair. *Cell Res*. 2021;31(5):542-553.
- [98].Li G.-M. Mechanisms and functions of DNA mismatch repair. *Cell Res*. 2008;18(1):85-98.
- [99].Ciszyk AL., Nugent Z., Wightman RH., Singh H., McManus KJ. Characterizing Microsatellite Instability and Chromosome Instability in Interval Colorectal Cancers. *Neoplasia*. 2018 ;20 (9):943-950.
- [100]. Goel A., Nagasaka T., Hamelin R., Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS One*. 2010;5(2):e9393.
- [101]. Bettington M., Walker N., Clouston A., Brown I., Leggett B., Whitehall V. The serrated pathway to colorectal carcinoma: Current concepts and challenges. *Histopathology* 2013;62, 367–386.

- [102]. Pai R.K., Bettington M., Srivastava A., Rosty C. An update on the morphology and molecular pathology of serrated colorectal polyps and associated carcinomas. *Mod. Pathol.* 2019; 1.
- [103]. Mojarad E.N., Kuppen P.J., Aghdaei H.A., Zali M.R. The CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer. *Gastroenterol. Hepatol. Bed Bench.* 2013; 6, 120–128.
- [104]. Bosman F.T., Carneiro F., Hruban R.H., Theise N.D. WHO Classification of Tumours of the Digestive System, 4th ed.; World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (IARC): Lyon, France, 2010.
- [105]. Patai Á.V., Molnár B., Tulassay Z., Sipos F. Serrated pathway: Alternative route to colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2013;19, 607–615.
- [106]. East J.E., Atkin W.S., Bateman A.C., Clark S.K., Dolwani S., Ket S.N. et al. British Society of Gastroenterology position statement on serrated polyps in the colon and rectum. *Gut.* 2017; 66, 1181–1196.
- [107]. Levin B., Lieberman D.A., McFarland B., Smith R.A., Brooks D., Andrews K.S. et al. Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: A joint guideline from the American cancer society, the US multi-society task force on colorectal cancer, and the American college of radiology. *CA Cancer J. Clin.* 2008; 58, 130–160.
- [108]. Mármol I., Sánchez-de-Diego C., PradillaDieste A., Cerrada E., Rodriguez Yoldi MJ. Colorectal Carcinoma: A General Overview and Future Perspectives in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2017; 18(1):197.
- [109]. Amersi F., Agustin M., Ko C.Y. Colorectal cancer: Epidemiology, risk factors, and health services. *Clin. Colon. Rectal. Surg.* 2005;18:133–140.
- [110]. Thélin C., Sikka S. Epidemiology of Colorectal Cancer—Incidence, Lifetime Risk Factors Statistics and Temporal Trends. *Intech*; London, UK: 2015.
- [111]. Valle L., Vilar E., Tavtigian S.V., Stoffel E.M. Genetic predisposition to colorectal cancer: Syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J. Pathol.* 2019; 247:574–588.
- [112]. Ma Y., Yang W., Song M., Smith-Warner S.A., Yang J., Li Y. et al. Type 2 diabetes and risk of colorectal cancer in two large U.S. prospective cohorts. *Br. J. Cancer.* 2018; 119:1436–1442.
- [113]. Pang Y., Kartsonaki C., Guo Y., Chen Y., Yang L., Bian Z. et al. Diabetes, plasma glucose and incidence of colorectal cancer in Chinese adults: A prospective study of 0.5 million people. *J. Epidemiol. Community Health.* 2018;72(10):919-925.
- [114]. Peeters P.J., Bazelier M.T., Leufkens H.G., de Vries F., De Bruin M.L. The risk of colorectal cancer in patients with type 2 diabetes: Associations with treatment stage and obesity. *Diabetes Care.* 2015; 38:495–502.
- [115]. Rawla P., Sunkara T., Barsouk A. Epidemiology of colorectal cancer: Incidence, mortality, survival, and risk factors. *Gastroenterol. Rev.* 2019 ;14:89–103.
- [116]. Venugopal A., Carethers J.M. Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI J.* 2022; 21:162-182.

-
- [117].Pöschl G., Seitz H.K. Alcohol and cancer. *Alcohol Alcoholism*.2004; 39, 155–165.
- [118].Low E.E., Demb J., Liu L., Earles A., Bustamante R., Williams C.D. et al. Risk Factors for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*.2020; 159, 492–501.e7.
- [119].Venugopal A., Carethers J.M. Epidemiology and biology of early onset colorectal cancer. *EXCLI J*. 2022 ; 21, 162.
- [120].Medici B., Riccò B., Caffari E., Zaniboni S., Salati M., Spallanzani A.etal. Early Onset Metastatic Colorectal Cancer: Current Insights and Clinical Management of a Rising Condition. *Cancers*. 2023; 15(13):3509.
- [121].Kim S.E., Paik H.Y., Yoon H., Lee J.E., Kim N., Sung M.K. Sex- and gender-specific disparities in colorectal cancer risk. *World J. Gastroenterol*. 2015; 21:5167–5175.
- [122].Schmuck R., Gerken M., Teegen E.M., Krebs I., Klinkhammer-Schalke M., Aigner F. et al. Gender comparison of clinical, histopathological, therapeutic and outcome factors in 185,967 colon cancer patients. *Langenbecks Arch. Surg*. 2020; 405:71–80.
- [123].Carethers J.M., Doubeni C.A. Causes of Socioeconomic Disparities in Colorectal Cancer and Intervention Framework and Strategies. *Gastroenterology*. 2020; 158:354–367.
- [124].Amin M.B., Greene F.L., Edge SB., Compton C.C., Gershenwald J.E., Brookland R.K. et al.The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99.
- [125].Shek D., Akhuba L., Carlino M.S., Nagrial A., Moujaber T., Read SA. et al. Immune-Checkpoint Inhibitors for Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review of Clinical Outcomes. *Cancers*. 2021; 13(17):4345.
- [126].Guinney J., Dienstmann R., Wang X., de Reyniès A., Schlicker A., Soneson C. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nat. Med*. 2015, 21, 1350–1356.
- [127].García-Alfonso P., García-Carbonero R., García-Foncillas J., Pérez-Segura P., Salazar R., Vera R. et al. Update of the recommendations for the determination of bi-omarkers in colorectal carcinoma: National Consensus of the Spanish Society of Medical Oncology and the Spanish Society of Pathology. *Clin. Transl. Oncol*. 2020; 22, 1976–1991.
- [128]. Martini G., Dienstmann R., Ros J., Baraibar I., Cuadra-Urteaga J.L., Salva F. et al. Molecular subtypes and the evolution of treatment management in metastatic colorectal cancer. *Ther. Adv. Med. Oncol*. 2020; 12.
- [129]. Baniás L., Jung I., Chiciudean R., Gurzu S. From Dukes-MAC Staging System to Molecular Classification: Evolving Concepts in Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2022; 23(16):9455.
- [130].Loree J.M., Pereira A.A.L., Lam M., Willauer A.N., Raghav K., Dasari A. et al. Classifying Colorectal Cancer by Tumor Location Rather than Sidedness Highlights a Continuum in Mutation Profiles and Consensus Molecular Subtypes. *Clin. Cancer Res*. 2018; 24:1062–1072.
- [131].Ruff SM, Shannon AH, Pawlik TM. The Role of Targeted Therapy in the Multi-Disciplinary Approach to Colorectal Liver Metastasis. *Cancers*. 2023; 15(13):3513.
- [132].Mouillet-Richard S., Laurent-Puig P. YAP/TAZ Signalling in Colorectal Cancer: Lessons from Consensus Molecular Subtypes. *Cancers*, 2020; 12, 3160.

- [133].Cervantes A., Adam R.,Roselló S., Arnold D., Normanno N., Taïeb J.et *al.* Metastatic colorectal cancer: ESMO Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 2023; 34, 10–32.
- [134].Van der Stok E.P., Spaander M.C.W., Grunhagen D.J., Verhoef C., Kuipers E.J. Surveillance after curative treatment for colorectal cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 2017; 14, 297–315.
- [135].Graham D.M., Coyle V.M., Kennedy R.D., Wilson R.H. Molecular Subtypes and Personalized Therapy in Metastatic Colorectal Cancer. *Curr. Color. Cancer Rep.* 2016, 12, 141–150.
- [136].Siegel R.L., Miller K.D., Fuchs H.E., Jemal A. Cancer statistics, 2022. *CA Cancer J. Clin.* 2022; 72, 7–33.
- [137]. Ohishi T., Kaneko MK., Yoshida Y., Takashima A., Kato Y., Kawada M. Current Targeted Therapy for Metastatic Colorectal Cancer. *International Journal of Molecular Sciences.* 2023; 24(2):1702.
- [138].Guo Y., Xiong B.-H., Zhang T., Cheng Y., Ma L. XELOX vs. FOLFOX in metastatic colorectal cancer: An updated meta-analysis. *Cancer Investig.* 2016; 34, 94–104.
- [139].Tournigand C., André T., Achille E., Lledo G., Flesh M., Mery-Mignard D. et *al.* FOLFIRI Followed by FOLFOX6 or the Reverse Sequence in Advanced Colorectal Cancer: A Randomized GERCOR Study. *J. Clin. Oncol.* 2004; 22, 229–237.
- [140]. Guo Y., Shi M., Shen X., Yang C., Yang L., Zhang J. Capecitabine Plus Irinotecan Versus 5-FU/Leucovorin Plus Irinotecan in the Treatment of Colorectal Cancer: A Meta-analysis. *Clin. Color. Cancer.*2013; 13, 110–118.
- [141].Hernandez Dominguez O., Yilmaz S., Steele SR. Stage IV Colorectal Cancer Management and Treatment. *Journal of Clinical Medicine.* 2023; 12(5):2072.
- [142].Jawed I., Wilkerson J., Prasad V., Duffy A.G., Fojo T. Colorectal Cancer Survival Gains and Novel Treatment Regimens: A Systematic Review and Analysis. *JAMA Oncol.* 2015; 1, 787–795.
- [143].Miyo M., Kato T., Yoshino T.,Yamanaka T., Bando H., Satake H. et *al.* Protocol of the QUATTRO-II study: A multicenter randomized phase II study comparing CAPOXIRI plus bevacizumab with FOLFOXIRI plus bevacizumab as a first-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *BMC Cancer.*2020;20, 687.
- [144].DeStefanis R.A., Kratz J.D., Emmerich P.B., Deming D.A. Targeted Therapy in Metastatic Colorectal Cancer: Current Standards and Novel Agents in Review. *Curr. Color. Cancer Rep.* 2019; 15, 61–69.
- [145].Nappi A.,Berretta M., Romano C., Tafuto S., Cassata A., Casaretti R.et *al.* Metastatic Colorectal Cancer: Role of Target Therapies and Future Perspectives. *Curr. Cancer Drug Targets* .2018 ; 18, 421–429.
- [146].Baraibar I., Ros J., Mulet N., Salva F., Argiles G., Martini G.et *al.* Incorporating traditional and emerging biomarkers in the clinical management of metastatic colorectal cancer: An update. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2020; 20, 653–664.
- [147].Wang S.C., Hung M.C. Nuclear translocation of the epidermal growth factor receptor family membrane tyrosine kinase receptors. *Clin. Cancer Res.* 2009; 15, 6484–6489.

-
- [148].Jeong W.J., Cha P.H., Choi K.Y. Strategies to overcome resistance to epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy in metastatic colorectal cancer. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20, 9862–9871.
- [149].Van Cutsem E., Cervantes A., Adam R., Sobrero A., Van Krieken J.H., Aderka D. et al. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2016;27, 1386–1422.
- [150].Allegra C.J., Rumble R.B., Hamilton S.R., Mangu P.B., Roach N., Hantel A. et al. Extended RAS Gene Mutation Testing in Metastatic Colorectal Carcinoma to Predict Response to Anti-Epidermal Growth Factor Receptor Monoclonal Antibody Therapy: American Society of Clinical Oncology Provisional Clinical Opinion Update 2015. *J. Clin. Oncol.* 2016; 34, 179–185.
- [151].Wilson C.Y., Tolias P. Recent advances in cancer drug discovery targeting RAS. *Drug Discov.* 2016; 21, 1915–1919.
- [152].Misale S., Di Nicolantonio F., Sartore-Bianchi A., Siena S., Bardelli A. Resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer: From heterogeneity to convergent evolution. *Cancer Discov.* 2014; 4, 1269–1280.
- [153].Tejpar S., Celik I., Schlichting M., Sartorius U., Bokemeyer C., Van Cutsem E. Association of KRAS G13D tumor mutations with outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J. Clin. Oncol.* 2012; 30, 3570–3577.
- [154].Mao C., Huang Y.F., Yang Z.Y., Zheng D.Y., Chen, J.Z., Tang J.L. KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: A systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2013 ; 119, 714–721.
- [155].Loupakis F., Yang D., Yau L., Feng S., Cremolini C., Zhang W. et al. Primary tumor location as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 2015; 107, 427.
- [156].Jiang W., Yu Q., Ning R., Zhao W., Wei C. Efficacy of bevacizumab versus epidermal growth factor receptor inhibitors for wild-type RAS metastatic colorectal cancer: A meta-analysis. *OncoTargets Ther.* 2018; 11, 4271–4281.
- [157]. Carmeliet P., Jain R.K. Principles and mechanisms of vessel normalization for cancer and other angiogenic diseases. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2011; 10, 417–427.
- [158]. Mariotti V., Fiorotto R., Cadamuro M., Fabris L., Strazzabosco M. New insights on the role of vascular endothelial growth factor in biliary pathophysiology. *JHEP Rep.* 2021; 3, 100251.
- [159].Wada S., Tsunoda T., Baba T., Primus F.J., Kuwano H., Shibuya M. et al. Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res.* 2005; 65, 4939–4946.
- [160].Wang Y., Fei D., Vanderlaan M., Song A. Biological activity of bevacizumab, a humanized anti-VEGF antibody in vitro. *Angiogenesis* .2004; 7, 335–345.
- [161].Sun D.C., Shi Y., Wang Y.R., Lv Y., Yan H., Mao H. et al. KRAS mutation and primary tumor location do not affect efficacy of bevacizumab-containing chemotherapy in stage IV colorectal cancer patients. *Sci. Rep.* 2017; 7, 14368.

- [162].Debeuckelaere C., Murgioni S., Lonardi S., Girardi N., Alberti G., Fano C. et al. Ramucirumab: The long and winding road toward being an option for mCRC treatment. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2019; 19, 399–409.
- [163].Cao Y., Wang X. Effects of molecular markers on the treatment decision and prognosis of colorectal cancer: a narrative review. *J GastrointestOncol.* 2021;12(3):1191-1196.
- [164].Lièvre A., Bachet J.-B., Le Corre D., Boige V., Landi B., Emile J.-F. et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006; 66, 3992–3995.
- [165].Cercek A., Braghiroli M.I., Chou J.F., Hechtman J.F., Kemeny N., Saltz L. et al. Clinical features and outcomes of patients with colorectal cancers harboring NRAS mutations. *Clin. Cancer Res.* 2017, 23, 4753–4760.
- [166].Karapetis C.S., Jonker D., Daneshmand M., Hanson J.E., O’Callaghan C.J., Marginean C. et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer—Results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin. Cancer Res.* 2014; 20, 744–753.
- [167].Jhawer M., Goel S., Wilson A.J., Montagna C., Ling Y.-H., Byun D.-S. et al. PIK3CA mutation/PTEN expression status predicts response of colon cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor cetuximab. *Cancer Res.* 2008; 68, 1953–1961.
- [168].Cremolini C., Morano F., Moretto R., Berenato R., Tamborini E., Perrone F. et al. Negative hyper-selection of metastatic colorectal cancer patients for anti-EGFR monoclonal antibodies: The PRESSING case-control study. *Ann. Oncol.* 2017; 28, 3009–3014.
- [169].Cohen R., Pudlzarz T., Delattre J.-F., Colle R., André T. Molecular Targets for the Treatment of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancers.* 2020; 12(9):2350.
- [170]. Douillard J.Y., Siena S., Cassidy J., Tabernero J., Burkes R., Barugel M. et al. Final results from PRIME: Randomized phase III study of panitumumab with FOLFOX4 for first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *Ann. Oncol.* 2014; 25, 1346–1355.
- [171]. Van Cutsem E., Lenz H.J., Kohne C.H., Heinemann V., Tejpar S., Melezinek I. et al. Fluorouracil, leucovorin, and irinotecan plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2015; 33, 692–700.
- [172].Sorich M.J., Wiese M.D., Rowland A., Kichenadasse G., McKinnon R.A., Karapetis C.S. Extended RAS mutations and anti-EGFR monoclonal antibody survival benefit in metastatic colorectal cancer: A meta-analysis of randomized, controlled trials. *Ann. Oncol.* 2015; 26, 13–21.
- [173].Cremolini C., Di Bartolomeo M., Amatu A., Antoniotti C., Moretto R., Berenato R. et al. BRAF codons 594 and 596 mutations identify a new molecular subtype of metastatic colorectal cancer at favorable prognosis. *Ann. Oncol.* 2015; 26, 2092–2097.
- [174].Bettstetter M., Dechant S., Ruemmele P., Grabowski M., Keller G., Holinski-Feder E. et al. Distinction of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic microsatellite-unstable colorectal cancer through quantification of MLH1 methylation by real-time PCR. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13, 3221–3228.
- [175].Le D.T., Kim T.W., Van Cutsem E., Geva R., Jager D., Hara H. et al. Phase II Open-Label Study of Pembrolizumab in Treatment-Refractory, Microsatellite Instability-High/Mismatch

- Repair-Deficient Metastatic Colorectal Cancer: KEYNOTE-164. *J.Clin. Oncol.* 2020; 38, 11–19.
- [176].Sartore-Bianchi A., Trusolino L., Martino C., Bencardino K.,Lonardi S., Bergamo F.,et al. Dual-targeted therapy with trastuzumab and lapatinib in treatment-refractory, KRAS codon 12/13 wild-type, HER2-positive metastatic colorectal cancer (HERACLES): A proof-of-concept, multicentre, open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol.* 2016; 17, 738–746.
- [177].Czauderna C., Luley K., von Bubnoff N., Marquardt J.U. Tailored Systemic Therapy for Colorectal Cancer Liver Metastases. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021 ; 22(21):11780.
- [178]. Marck V. Manuel de techniques d'anatomocytopathologie.Masson. Paris. 2010 ; 183p.
- [179].Siegel R.L., Jakubowski C.D., Fedewa S.A., Davis A., Azad N.S. Colorectal Cancer in the Young: Epidemiology, Prevention, Management. *Am Soc Clin Oncol Educ Book.* 2020; 40:1-14.
- [180]. Turpin A., Genin M., Hebbar M., Occelli F., Lanier C., Vasseur F. et al. Spatial heterogeneity of KRAS mutations in colorectal cancers in northern France. *Cancer Manag Res.* 2019; 11:8337-8344.
- [181].El Agy F., El Bardai S., El Otmani I., Benbrahim Z., Karim M.H., Mazaz K. et al. Mutation status and prognostic value of KRAS and NRAS mutations in Moroccan colon cancer patients: A first report. *PLoS One.* 2021;16(3): e 0248522.
- [182].Basudan A.M., Basuwdan A.M., Abudawood M., Farzan R., Alfhili M.A. Comprehensive Retrospective Analysis of Colorectal Cancer Incidence Patterns in Saudi Arabia. *Life.* 2023; 13(11):2198.
- [183].Darré T.,Amégbor K ., Bagny A., Sewa E.,Tchangai B., Sakiye A., et al. 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.
- [184].Richter M., Sonnow L., Mehdizadeh-Shrifi A., Richter A., Koch R., Zipprich A. German oncology certification system for colorectal cancer - relative survival rates of a single certified centre vs. national and international registry data. *InnovSurgSci.* 2021 ;6(2):67-73.
- [185].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.
- [186].ArfaouiToumi A., Trabelsi M., Blel A., Aloui R., Ben HmidaM.,Hamza A ., et al.Immunohistochemical expression pattern of MMR proteins can specifically identify patients with colorectal cancer microsatellite instability. *Tumor Biol* 2014; 35:6283–6291.
- [187].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.
- [188].Joachim C., Macni J., Drame M., Pomier A., Escarmant P., Veronique-Baudin J.et al. Survie globale du cancer colorectal par stade au diagnostic : Données du Registre des Cancers de la Martinique. *Médecine (Baltimore).*2019;98(35): e16941.
- [189].Nagakubo Y., Hirotsu Y., Amemiya K., Oyama T., Mochizuki H., Omata M. Accurate detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations in metastatic colorectal cancers by bridged nucleic acid-clamp real-time PCR. *BMC Med Genomics.* 2019; 12:162.

- [190].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.
- [191].Awidi M., Ababneh N., Shomaf M., Al Fararjeh F., Owaidi L., AlKhatib M. et al. KRAS and NRAS mutational gene profile of metastatic colorectal cancer patients in Jordan. *PLoS One*. 2019;14(12): e0226473.
- [192]. Martianov A.S., Mitiushkina N.V., Ershova A.N., Martynenko D.E., Bubnov M.G., Amankwah P. et al . KRAS, NRAS, BRAF, HER2 and MSI Status in a Large Consecutive Series of Colorectal Carcinomas. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023; 24(5):4868.
- [193]. Jones R.P., Sutton P.A., Evans J.P., Clifford R., McAvoy A., Lewis J. et al. Specific mutations in KRAS codon 12 are associated with worse overall survival in patients with advanced and recurrent colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2017 ;116(7):923-929.
- [194].Loong H.H., Du N., Cheng C., Lin H., Guo J., Lin G.et al. KRAS G12C mutations in Asia: a landscape analysis of 11,951 Chinese tumor samples. *Transl Lung Cancer Res*. 2020;9(5):1759-1769.
- [195]. Zanatto R.M., Santos G., Oliveira J.C., Pracucho E.M., Nunes A.J.F., Lopes-Filho G.J.et al. IMPACT OF KRAS MUTATIONS IN CLINICAL FEATURES IN COLORECTAL CANCER. *Arq Bras CirDig*. 2020 ; 33(3): e1524.
- [196].Araujo L.H., Souza B.M., Leite L.R., Parma S.A.F., Lopes N.P., Malta F.S.V. et al. Molecular profile of KRAS G12C-mutant colorectal and non-small-cell lung cancer. *BMC Cancer*. 2021;21(1):193.
- [197].Therkildsen C., Bergmann T.K., Henrichsen-Schnack T., Ladelund S., Nilbert M. The predictive value of KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and PTEN for anti-EGFR treatment in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Acta Oncol* .2014;53:852–64.
- [198].Guo F., Gong H., Zhao H., Jing Chen J., Yiming Zhang Y., Lihua Zhang L.et al. Mutation status and prognostic values of KRAS, NRAS, BRAF and PIK3CA in 353 Chinese colorectal cancer patients. *Sci Rep*. 2018;8(1):6076.
- [199].SANCHEZ-IBARRA, Héctor E. et al. Complete Screening of Exons 2, 3, and 4 of KRAS and NRAS Genes Reveals a Higher Number of Clinically Relevant Mutations than Food and Drug Administration Quantitative Polymerase Chain Reaction-Based Commercial Kits. *Rev. invest. clín*. 2020 ;72(6),337-343.
- [200].Guo T., Wu Y., Huang D., Jin Y., Sheng W., Cai S.,et al. Prognostic Value of KRAS Exon 3 and Exon 4 Mutations in Colorectal Cancer Patients. *J Cancer* 2021; 12(17):5331-5337.
- [201].Yuan Y., Liu Y., Wu Y., Zhang J., Shen C., Zhang F. al. Clinical characteristics and prognostic value of the KRAS mutation in Chinese colorectal cancer patients. *Int J Biol Markers*. 2021; 36(2):33-39.
- [202]. Timar J, Kashofer K. Molecular epidemiology and diagnostics of KRAS mutations in human cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2020;39(4):1029-1038.
- [203].Hayama T., Hashiguchi Y., Okamoto K., Okada Y., Ono K., Shimada R.et al. G12V and G12C mutations in the gene KRAS are associated with a poorer prognosis in primary colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2019 ; 34 :1491–1496.

- [204].Fiala O., Buchler T., Mohelnikova-Duchonova B., Melichar B., Matejka V.M., Holubec L., *et al.* G12V and G12A *KRAS* mutations are associated with poor outcome in patients with metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab. *Tumor Biol.* 2016 ;37, 6823–6830.
- [205].Li W., Liu Y., Cai S., Yang C., Lin Z., Zhou L.*et al.* Not all mutations of *KRAS* predict poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol.* 2019;12(3):957-967.
- [206].Bai B., Shan L., Xie B., *et al.* Mutations in *KRAS* codon 12 predict poor survival in Chinese patients with metastatic colorectal cancer. *Oncol Lett.* 2018;15(3):3161-3166.
- [207].Nakayama A., Nagashima T., Nishizono Y., Kuramoto K., Mori K., Homboh K., *al.* Characterisation of a novel *KRAS* G12C inhibitor ASP2453 that shows potent anti-tumour activity in *KRAS* G12C-mutated preclinical models. *Br J Cancer* .2021; 7,64.
- [208]. Seton-Rogers S. *KRAS*-G12C in the crosshairs. *Nat Rev Cancer.*2020; 20, 3.
- [209].Giampieri R., Lupi A., Ziranu P., Bittoni A., Pretta A., Pecci F., Persano M., *et al.* .Retrospective Comparative Analysis of *KRAS* G12C vs. Other *KRAS* Mutations in mCRC Patients Treated with First-Line Chemotherapy Doublet + Bevacizumab. *Front. Oncol.* 2021 ;11 :736104.
- [210].Chuang S.C., Huang C.W., Chen Y.T., Ma C.J., Tsai H.L., Chang T.K. *et al.* Effect of *KRAS* and *NRAS* mutations on the prognosis of patients with synchronous metastatic colorectal cancer presenting with liver-only and lung-only metastases. *OncolLett.* 2020 ;20(3) :2119-2130.
- [211].Yari A., Samoudi A., Afzali A., Karam Z.M., Karimaldini N.K0, Abadi M.F.S. *et al.* Mutation Status and Prognostic Value of *KRAS* and *BRAF* in Southeast Iranian Colorectal Cancer Patients: First Report from Southeast of Iran. *J Gastrointest Canc.*2021; 52, 557–568.
- [212].Serebriiskii I.G., Connelly C., Frampton G., Newberg J., Cooke M., Miller V., *et al.* Comprehensive characterization of *RAS* mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun* .2019; 10, 3722.
- [213].Bylsma L.C., Gillezeau C., Garawin T.A., Kelsh M.A., Fryzek J.P., Sangaré L., *et al.* Lowe KA. Prevalence of *RAS* and *BRAF* mutations in metastatic colorectal cancer patients by tumor sidedness: A systematic review and meta-analysis. *Cancer Med.* 2020;9(3):1044-1057.
- [214].Dai D., Wang Y., Zhu L., Jin H., Wang X. Prognostic value of *KRAS* mutation status in colorectal cancer patients: a population-based competing risk analysis. *PeerJ.* 2020;8: e9149.
- [215].Rimbert J., Tachon G., Junca A., Villalva C., Karayan-Tapon L., Tougeron D. Association between clinicopathological characteristics and *RAS* mutation in colorectal cancer. *Mod Pathol.*2018 ;31, 517–526.
- [216].Pang XL., Li QX., Ma Z.P., Shi Y., Ma Y.Q., Li X.X. *et al.* .Association between clinicopathological features and survival in patients with primary and paired metastatic colorectal cancer and *KRAS* mutation. *Onco Targets Ther.* 2017; 10:2645-2654.
- [217]. Rendek T., Saade R., Pos O., Kolnikova G., Urbanova M., Budis J. *et al.* .Determination of the Prevalence of Microsatellite Instability, *BRAF* and *KRAS/NRAS* Mutation Status in Patients with Colorectal Cancer in Slovakia. *Cancers.* 2024; 16(6):1128.
- [218].Djanani A., Eller S., Öfner D., Troppmair J., Maglione M. The Role of *BRAF* in Metastatic Colorectal Carcinoma-Past, Present, and Future. *Int J Mol Sci.* 2020;21(23):9001.

- [219].Holderfield M., Deuker M.M., McCormick F., McMahon M. Targeting RAF kinases for cancer therapy: BRAF-mutated melanoma and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2014;14(7):455-467.
- [220].Hernández-Sandoval J.A., Gutiérrez-Angulo M., Magaña-Torres M.T., Alvizo-Rodríguez C.R., Ramírez-Plascencia H.H.F., Flores-López B.A., et al. Prevalence of the *BRAF* p.v600e variant in patients with colorectal cancer from Mexico and its estimated frequency in Latin American and Caribbean populations. *J Investig Med*. 2020;68(5):985-991.
- [221].Cen S., Liu K., Zheng Y., Shan J., Jing C., Gao J. al . BRAF Mutation as a Potential Therapeutic Target for Checkpoint Inhibitors: A Comprehensive Analysis of Immune Microenvironment in BRAF Mutated Colon Cancer. *Front Cell Dev Biol*. 2021; 9:705060.
- [222].Eurboonyanun, K., Lahoud, R.M., Kordbacheh, H.,Pourvaziri A., Promsorn J., Chadbunchachai P. et al. Imaging predictors of BRAF mutation in colorectal cancer. *Abdom Radiol*.2020; 45(8):2336–2344.
- [223]. Van Brummelen E.M.J., De Boer A., Beijnen J.H., Schellens J.H.M. BRAF mutations as predictive biomarker for response to anti-EGFR monoclonal antibodies. *Oncologist*. 2017;22(7):864–872.
- [224].Salem M.E., Weinberg B.A., Xiu J., El-Deiry W.S., Hwang J.J., Gatalica Z.,et al.Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*. 2017;8(49):86356–86368.
- [225]. Afrăsânie V.A., Marinca M.V., Gafton B., Alexa-Stratulat T., Rusu A., Froicu E.M. et al. Clinical, Pathological and Molecular Insights on KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA and TP53 Mutations in Metastatic Colorectal Cancer Patients from Northeastern Romania. *International Journal of Molecular Sciences*. 2023 ; 24(16) :12679.
- [226].Wang J., Shen J., Huang C., Cao M., Shen L. Clinicopathological Significance of *BRAFV600E* Mutation in Colorectal Cancer: An Updated Meta-Analysis. *J Cancer*. 2019;10(10):2332-2341.
- [227].Tieng F.Y.F., Abu N., Lee L-H., Ab Mutalib N-S. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer Liquid Biopsy—Current Updates on Its Potential in Non-Invasive Detection, Prognosis and as a Predictive Marker. *Diagnostics*. 2021; 11(3):544.
- [228].Battaglin F., Naseem M., Lenz H.J., Salem M.E. Microsatellite instability in colorectal cancer: overview of its clinical significance and novel perspectives. *Clin Adv Hematol Oncol*. 2018;16(11):735-745.
- [229].Gelsomino F., Barbolini M., Spallanzani A., Pugliese G., Cascinu S. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. *Cancer Treat. Rev*. 2016; 51:19–26.

Site d'internet

(https://ressources.unisciel.fr/physiologie/co/grain8b_1.html).

(<https://journal-decoder.fr/2024/07/04/lactivation-du-recepteur-aux-cannabinoides-de-type-2-favorise-la-production-de-spermatozoides-in-vitro/>).

(<https://www.medicalexpo.com/prod/sacace-biotechnologies-srl/product-93521-944408.html>).