

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane Mira – Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biologie Physico – Chimique
Spécialité : Génétique fondamentale et Appliquée



Réf :

Mémoire de fin de cycle
En vue de l'obtention du diplôme de master

Thème

**Étude Epidémiologique du Cancer Colorectal
au Niveau du CHU de Béjaïa**

Présenté par :

Maya BELHOUKI

Soutenu le : 30/09/2023

Devant le jury composé de :

Mme. Ayouni Karima	MCB	Présidente
Mme. Ouahmed Hania	MCB	Encadrante
Mme. Mazouzi Chahra	MCA	Co-Encadrante
Mme. Ait Ali Eldjida	MCB	Examinatrice

2022 – 2023

Remerciements

Nos vifs remerciements au Pr. Ouahmed H. notre encadrante pour avoir été patiente à l'infini ainsi que sa confiance inébranlable en nous. Nous la remercions pour son aide précieuse pour la réalisation de ce modeste ouvrage, elle nous a dirigées, encouragées et conseillées sans relâche tout en partageant ses connaissances et son expérience à profusion.

Nos vifs remerciements au Dr. Mazouzi C., médecin chef du service d'oncologie du CHU de Bejaïa, tout d'abord d'avoir accepté que nous fassions notre stage dans son service et d'être par la même occasion notre Co-encadrante. Elle nous a permis de réaliser cet ouvrage humble comparé au laborieux travail qu'elle fait dans ce service. Elle nous a offert l'opportunité de voir et vivre un tant soit peu de ce qu'est le travail colossal dans le service d'oncologie.

Nos vifs remerciements au Dr. Bencharif C. médecin chef du service anatomie cytologie pathologie du CHU de Bejaïa pour avoir accepté de nous accueillir dans son service pour notre stage où nous avons été guidées orientées et initiées l'observation et à la pratique qui a lieu dans le service.

Nos vifs remerciements au Pr. Ait Ali E. pour nous avoir ouvert les portes du laboratoire de cancérologie moléculaire d'Aboudaou et pour tout le travail et le sérieux avec lesquels elle nous a dirigé et les renseignements précieux qu'elle nous a livré pour pouvoir mener à terme nos expériences.

Nous remercions également tout le personnel des services oncologie et anatomie cytologie pathologie ainsi que les techniciennes du laboratoire d'Aboudaou qui ont participé de manière active à l'élaboration de ce travail, résultat du stage que nous avons accompli.

Vifs remerciements à la présidente Pr. Ayouni K. et l'ensemble du jury pour avoir accepté d'évaluer notre travail, c'est un honneur pour nous devant tant de dévouement.

Nous remercions également tous les enseignants qui nous ont prodigué leur savoir et leurs connaissances durant tout notre cursus.

Table des matières

Remerciements

Table des matières

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....	1
Chapitre I	2
I- L'épidémiologie du cancer colorectal :.....	2
II- L'anatomie et la physiologie du colon :	4
III- Histologie du colon :	5
IV- Cancer colorectal:.....	7
IV.1- Définition:	7
IV.2- Classification génétique du CCR :.....	7
IV.3- Les stades tumoraux du CCR :.....	8
IV.4- Facteurs de risques du CCR :.....	8
V- Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse colorectale :	9
V.1- L'instabilité chromosomique (CIN) :.....	10
V.2- L'instabilité microsatéllitaire (MSI):.....	11
V.3- L'instabilité épigénétiques (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype) :.....	12
VI- Les principales voies de signalisation impliquées dans le CCR:.....	14
VI.1- La voie Wnt/APC/ β caténine :.....	14
VI.2 La voie TGF- β / SMAD :.....	15
VI.3 La voie PI3K/AKT/PTEN :.....	16
VI.4 La voie TP53 :.....	17
VI.5 La Voie KRAS/ MAPK :	18
VII- Dépistage et traitement :	21
VII.1- Dépistage :	21
VII.2- Traitement :	22
VII.2.1. La chirurgie :.....	22
VII.2.2 La radiothérapie et la chimiothérapie :.....	22
VII.2.3- La thérapie ciblée :.....	22
Chapitre II	28
I- Etude épidémiologique :	28
I.1- Population étudiée :.....	29

I.2 Recueil des données :	29
II- Etude anatomopathologique :	29
II.1- Matériels :	29
II.2- Les prélèvements opératoires :	29
II.3- Examens macroscopiques :	29
II.4- Etude histologique :	30
II.5- Etude microscopique :	31
III- Etude moléculaire :	31
III.1- Matériels et réactifs : (Annexe 8) :	31
III.2- Méthodes :	31
III.2.1- Extraction de l'ADN à partir d'un tissu colique fixé au formol et à la paraffine (FFPE) : ...	31
III.2.2- PCR (Polymerase Chain Reaction) :	34
III.2.3- Électrophorèse sur gel d'Agarose :	36
III.2.4- Visualisation des fragments amplifiés par le système Vilber Lourmat UV Pads et détection des mutations Kras :	37
Chapitre III	38
I- Etude épidémiologique :	38
II- Étude anatomopathologique :	41
II.1- Aspects histologiques du CCR :	42
II.1.1- Adénocarcinome bien différencié :	42
II.1.2- Adénocarcinome moyennement différencié :	42
II.1.3- Adénocarcinome peu différencié :	43
II.2- Emboles vasculaires:	44
II.3- Engainements péri-nerveux :	44
II.4- Les ganglions lymphatiques :	44
III- Etude moléculaire :	46
III.1. Extraction d'ADN à partir des tissus FFPE :	46
III.2- La PCR :	50
Conclusion.....	53
Références.....	54
Annexes.....	59

Liste des tableaux

Tableau I. Les mutations les plus fréquentes de KRAS.....	19
Tableau II. Les amorces utilisées.....	34

Liste des figures

Figure 1. Epidémiologie du cancer colorectal au niveau mondial en 2020.....	2
Figure 2. L'incidence et la mortalité du CCR par continent en 2020.....	2
Figure 3. Nombre de nouveaux cas de cancer enregistré en Algérie en 2020.....	3
Figure 4. L'incidence du cancer colorectal en Afrique du Nord.....	3
Figure 5. Anatomie du colon.....	4
Figure 6. Schéma représentant la structure de l'axe cryptal colique.....	5
Figure 7. coupe histologique du colon.....	6
Figure 8. Représentation schématique du processus adénome-carcinome-métastase. L'origine et le développement des cellules cancéreuses, depuis les cellules souches et la "muqueuse à risque" jusqu'aux métastases.....	10
Figure 9. Les différents facteurs variables de la cancérogenèse selon le type de CCR.....	11
Figure 10. Mécanisme de réparation de l'ADN et la MSI.....	12
Figure 11. Mécanisme de l'hyperméthylation des îlots CpG.....	13
Figure 12. Biomarqueurs de méthylation potentiels dans le CCR.....	13
Figure 13. Signalisation de la voie Wnt dans le CCR.....	15
Figure 14. Signalisation de la voie TGF- β dans le CCR.....	16
Figure 15. Signalisation de la voie PI3K dans le CCR.....	17
Figure 16. Signalisation de la voie TP53 dans le CCR.....	18
Figure 17. Signalisation de la voie KRAS/MAPK dans le CCR.....	20
Figure 18. Le rôle des différentes voies signalétiques dans le CCR.....	21
Figure 19. Les cibles pharmacologiques possibles de la voie PI3K.....	23
Figure 20. Inhibiteurs de la voie de signalisation TGF- β actuellement en cours de développement pour une éventuelle thérapie anticancéreuse.....	24

Figure 21. Inhibiteurs de la signalisation Wnt/ β -caténine dans les essais cliniques en cours et passés.....	25
Figure 22. Voie de signalisation du KRAS et inhibiteurs pertinents pour chaque cible.....	26
Figure 23. Pièce opératoire (A, B) de 48cm du colon transverse prélèvements mis en cassette, prélèvements de la masse tumorale (C), prélèvement de ganglions lymphatiques (D).....	30
Figure 24. (A) Incubateur, (B) Centrifugeuse.....	33
Figure 25. (A) Spectrophotomètre BioDrop (Thermo Fisher Scientific) (B) la cuvette du spectrophotomètre.....	34
Figure 26. (A) Thermocycleur SimpliAmp, (B) le bloc thermique.....	35
Figure 27. Programme de la PCR.....	36
Figure 28. Dépôt des produits amplifiés dans les puits.....	36
Figure 29. Initiation de la migration.....	37
Figure 30. (A) Le système Vilber Lourmat UV Pads, (B) le gel prêt à être passé sous rayons UV.....	37
Figure 31. Histogramme des cas recensés pour chaque sexe par an.....	38
Figure 32. Histogramme des tranches d'âge des cas recensés pour chaque sexe.....	39
Figure 33. Répartition des cas selon leur IMC.....	39
Figure 34. Répartition des localisations primaires de CCR.....	40
Figure 35. Histogramme des sièges les plus communs des métastases.....	40
Figure 36. Histogramme des différentes différenciations.....	41
Figure 37. Répartition des KRAS.....	41
Figure 38. (A) Aspect histologique d'une muqueuse colique saine (B) aspect histologique d'une musculature saine.....	42
Figure 39. Aspect histologique d'un adénocarcinome bien différencié.....	42
Figure 40. Aspect histologique d'un adénocarcinome moyennement différencié.....	43
Figure 41. Aspect histologique d'un adénocarcinome peu différencié.....	43

Figure 42. Aspect histologique d'embolie vasculaire (HE, Gx10).....	44
Figure 43. Aspect histologique d'engainement péri-nerveux (HE, Gx10).....	44
Figure 44. Aspect histologique d'un ganglion lymphatique sain (HE, Gx10), B. Aspect histologique d'un ganglion lymphatique métastatique (HE, Gx10).....	45
Figure 45. Les résultats de spectrophotométrie: - Absence de pic ; -Concentration en ADN très faible ; -Un ratio 260/280 anormalement élevé.....	46
Figure 46. Les résultats de spectrophotométrie: - Présence de pics à la longueur d'onde 260 ; -Concentrations en ADN satisfaisantes ; -Ratio 260/280 Optimal.....	49
Figure 47. Les produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 4% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. Les puits des nombres impairs sont l'ACTD quant aux puits pairs c'est le KRAS.....	50
Figure 48. Les différentes lésions de l'ADN dues au formaldéhyde retrouvées dans les tissus FFPE.....	51

Liste des abréviations

5-FU: 5 FluoroUracile.

ACTB: Actine Beta.

ADK: Adénocarcinome.

ADN: Acide désoxyribonucléique.

AKT: Protein kinase B.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

ATM: Ataxia Telangiectasia Mutated.

ATP: Adénosine TriPhosphate.

AXIN: Axis inhibition protein.

BAD: Bcl2-antagonist of cell death

BAX: Bcl2-associated X protein.

Bcl2: B-cell leukemia/lymphoma 2

BRAF: V-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B

CCR: Cancer Colorectal.

CDC2 : Cell Division Cycle 2.

CDC25 : Cell division cycle 25.

CDKN1A (p21) : Cyclin dependent kinase inhibitor.

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire.

CIMP : CpG Island Methylator Phenotype.

CIN: Chromosomal Instability.

c-Myc : Myelocytomatosis .

CpG : Séquence riche en C et G. C

ERK: Extracellular signal- Regulated Kinase

G: Grossissement.

GAP: GTPase-accelerating protein.

GDP : Guanosine Diphosphate.

Grb2: Growth factor Receptor-Bind protein 2.

GSK3: Glycogen Synthase Kinase 3.

GSK-3B : Glycogen synthase kinase 3 beta.

GTP : Guanosine Triphosphate.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

HE: Hématoxyline-Eosine.

hMLH1: Human MutL Homolog 1.

hMSH2: Human MutS Homolog 2.

HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colon Cancer.

hPMS1: Human Post-Meiotic Segregation 1.

HTA: Hypertension artérielle.

IGF-1: Insuline-like Growth Factor.

IL-6: Interleukin 6

K-RAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene.

LOH: Loss of Heterozygosity.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MEK/ MAPK: Mitogen-activated protein kinase.

MDM2: Murin Double Minute 2.

MMR: MisMatch Repair.

MSH6: MutS protein homolog 6.

MSI: Micro-Satellite Instability.

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin

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

PAF: Polypose Adénomateuse Familiale.

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

PIK3: phosphatidylinositol 3-kinase.

PMS2: Postmeiotic Segregation Increased 2.

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

pTNM: pathologic Tumor Nodes Metastasis.

RAS: Rat Sarcoma RCPG

SMAD4: Mothers against decapentaplegic homolog 4.

TGF- β : Transforming growth factor beta.

TP53: Tumor protein 53.

WHO: World Health Organisation.

WNT: Wingless-type

Introduction

De nos jours, le cancer est considéré comme l'une des principales maladies qui affectent la santé humaine. Le cancer colorectal (CCR) est considéré comme l'un des cancers des plus dévastateurs parmi toutes les tumeurs malignes, avec environ 1 849 518 nouveaux cas et 880 792 décès rien qu'en 2018, le classant ainsi comme la deuxième tumeur maligne la plus mortelle et troisième tumeur maligne la plus couramment diagnostiquée au monde (Negrichi et Taleb, 2021).

La carcinogenèse colorectale est un processus en plusieurs étapes, durant lequel, l'épithélium colique normal se transforme en adénocarcinome du côlon, et cela en raison de l'accumulation progressive d'altérations génétiques et épigénétiques, ainsi que l'influence de certains facteurs à risque liés à l'alimentation et au mode de vie. D'autres facteurs sont inévitables ou non modifiables tels que : Les antécédents familiaux du CCR, l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Tandis que l'obésité, le manque d'activité physique, le tabagisme, la consommation d'alcool et le mauvais régime alimentaire riche en graisses insaturées et en viande rouge sont des facteurs de risque modifiables de CCR (Grady, 2004; Fearon, 2011; Voronov et Apte, 2015; Keum et Giovannucci, 2019; Negrichi et Taleb, 2021).

Parmi les défauts moléculaires et génétiques impliqués dans le développement d'un cancer colorectal, nous retrouvons les altérations qui conduisent à une activation d'oncogènes tels que le K-RAS et les altérations qui conduisent à une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène TP53. Enfin, il y'a les altérations touchant les différents gènes des systèmes de réparation de l'ADN et du contrôle de la croissance cellulaire et de l'apoptose (Burt *et al.*, 1995).

Dans cette optique, nous avons réalisé un travail au niveau du service d'oncologie et d'anatomie cytopathologie du CHU Khelil Amrane, ainsi qu'au niveau du laboratoire de médecine de l'université d'ABOUDAOU dans le but de :

- Réaliser une analyse épidémiologique ainsi qu'une étude anatomopathologique du cancer colorectal au niveau du CHU de la wilaya de Béjaia.
- Mettre au point un protocole qui nous permettra d'extraire de l'ADN à partir des tissus paraffinés de CCR.
- Tenter d'établir un protocole afin d'évaluer le statut mutationnel de KRAS dans un CCR en utilisant la PCR comme technique de biologie moléculaire.

Chapitre I

Revue Bibliographique

I- L'épidémiologie du cancer colorectal :

Le cancer est un problème de santé majeur au niveau mondial. En 2020, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) a enregistré 19,3 millions de nouveaux cas de cancer et près de 10 millions de décès dus au cancer (Figure 1) (Krasteva et Georgieva, 2022).

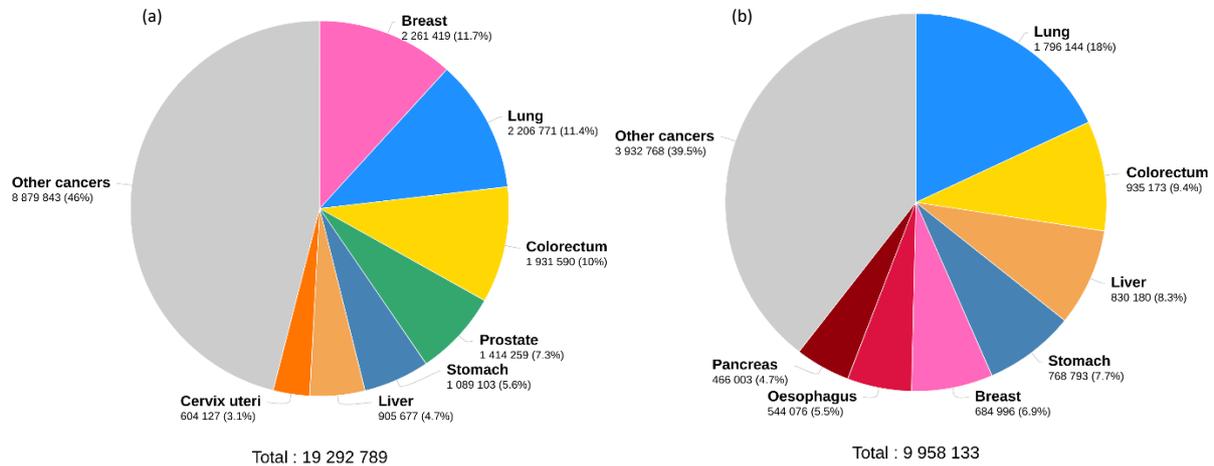


Figure 1 : Epidémiologie du cancer colorectal au niveau mondial en 2020 (a) nombre de nouveaux cas en 2020 ; (b) nombre de décès enregistré en 2020 (Globocan, 2020).

Le cancer colorectal (CCR), avec environ 1 931 590 nouveaux cas par an, soit environ 10% des cas totaux et un taux de mortalité de 935 173 de décès enregistrés rien qu'en 2020, est la deuxième tumeur maligne la plus mortelle et la troisième la plus couramment diagnostiquée au monde. En plus de ça, on s'attend à ce que son incidence augmente de 60 % au niveau mondial, ce qui se traduira par plus de 2,2 millions de nouveaux cas et 1,1 million de décès par an d'ici à 2030. Il est à noter que le continent le plus touché, où il a été recensé le plus haut taux d'incidence et de mortalité, est l'Asie avec plus de 50% (Figure 2) (Chakrabarti et al., 2020; Negrichi et Taleb, 2021).

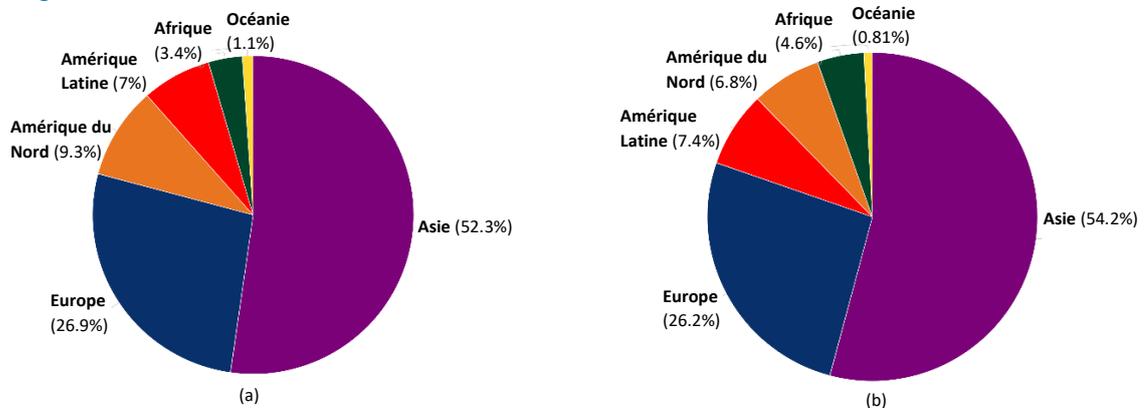


Figure 2 : (a) L'incidence du CCR par continent en 2020 (b) la mortalité du CCR par continent en 2020 (Globocan, 2020).

En Algérie, en 2020, ce cancer arrivait en deuxième position après le cancer du sein (tout sexe confondu) (Figure 3). De ce fait, l'Algérie se classerait en première position dans la région nord-africaine, avec 6526 nouveaux cas en 2020 (Figure 4) (Globocan, 2020).

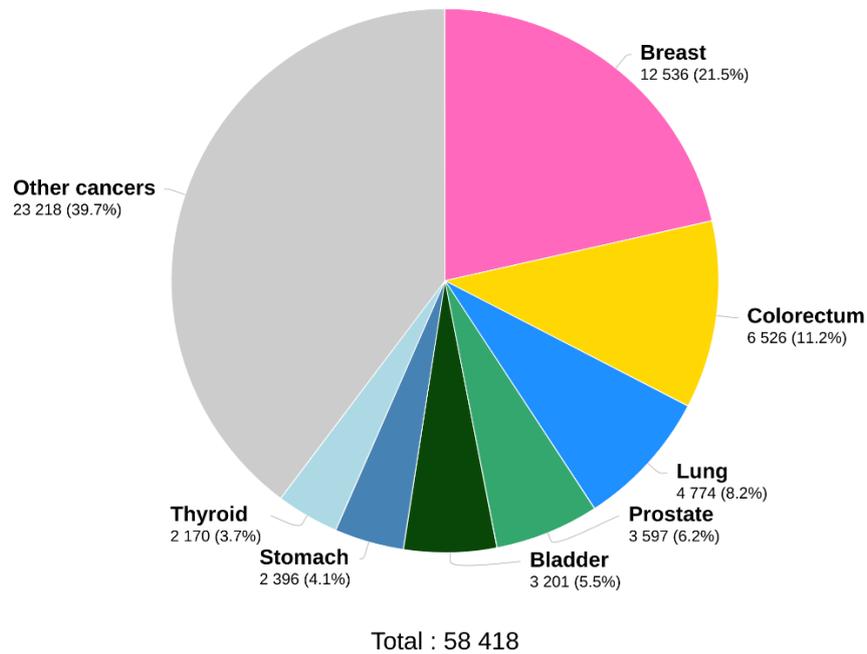


Figure 3 : Nombre de nouveaux cas de cancer enregistré en Algérie en 2020 (Globocan, 2020).

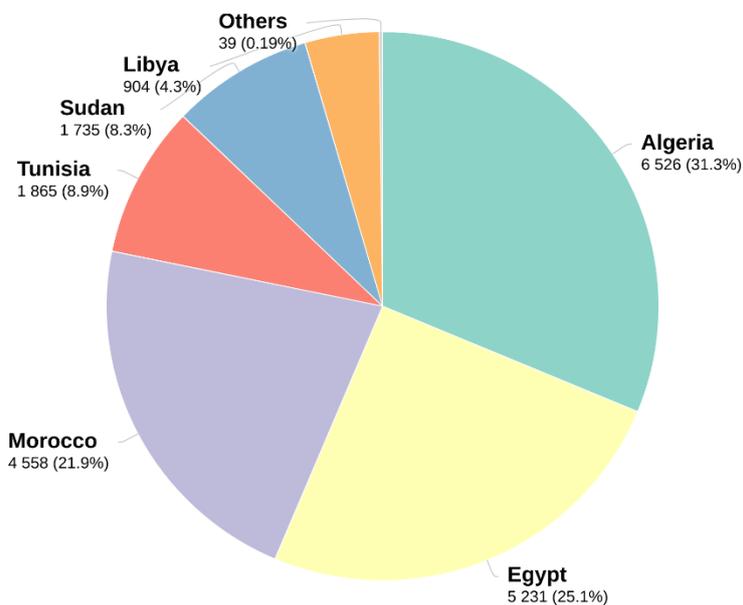


Figure 4 : L'incidence du cancer colorectal en Afrique du Nord (Globocan, 2020).

II- L'anatomie et la physiologie du colon :

Le côlon et le rectum font tous les deux parties du gros intestin qui est une composante du système digestif, également appelé système gastro-intestinal (GI). Il joue un rôle important dans la digestion en contribuant à l'absorption de l'eau, des minéraux et des nutriments restants après leur passage dans l'intestin grêle, ainsi qu'au stockage des déchets (Wyllie *et al.*, 2020 ; Krasteva et Georgieva, 2021).

Le microbiote intestinal présent dans le côlon décompose certaines substances non digérées en plus petites parties, et donne aux résidus restants une consistance semi-solide (matières fécales, ou selles). Elles sont aussi responsables de la fermentation produisant des gaz (Huizinga et Daniel, 1991).

Les déchets qui restent après avoir traversé le côlon vont dans le rectum, où ils sont stockés jusqu'à ce qu'il soit plein, il émet un signal au cerveau pour déclencher le déplacement des selles et leur expulsion par l'anus (Krasteva et Georgieva, 2021).

Situé entre l'iléon (l'intestin grêle) et le rectum, le côlon mesure environ 150 cm de long et est divisé en quatre segments principaux. Le rectum lui, représente le cinquième et dernier segment, il mesure environ 15 cm de long et relie le côlon à l'anus (Figure 5) (Stoker, 2009; Krasteva et Georgieva, 2021).

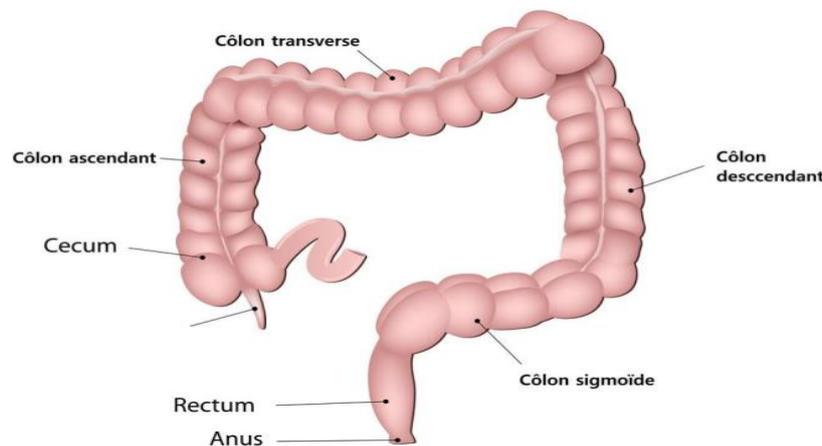


Figure 5 : Anatomie du colon (Gallot, 2006).

Le côlon ascendant, situé au côté droit du corps, commence par le cœcum qui relie le côlon à l'intestin grêle et se prolonge vers le haut jusqu'au **côlon transverse** qui traverse la partie supérieure de l'abdomen et relie le côlon ascendant au **côlon descendant** qui, longe le côté gauche du corps, et se prolonge vers le bas jusqu'au **côlon sigmoïde**, qui représente la dernière portion du côlon, et le relie au rectum. **Le rectum**, est la partie la plus distale du

gros intestin, relié au côlon sigmoïde au niveau proximal et convergeant vers le canal anal au niveau distal.

III- Histologie du Colon :

Le côlon et le rectum ont tous deux une structure histologique très similaire, typique du tube digestif. Histologiquement, ils contiennent les couches suivantes : la muqueuse, la sous-muqueuse, la musculuse et la séreuse/adventice (Krasteva et Georgieva, 2021).

La muqueuse du colon est la couche la plus interne qui est en contact avec la lumière du tube digestif. Elle est constituée d'un revêtement épithélial qui s'invagine en glandes dites cryptes de Lieberkühn et qui est soutenu par un tissu conjonctif appelé chorion. Cet épithélium simple comprend quatre types de cellules : les entérocytes (cellules absorbantes), les cellules entéroendocrines, les cellules de Tuft et les cellules caliciformes (toutes sécrétrices de mucus) (Figure 6) La muqueuse se termine par une mince couche de tissu musculaire lisse appelée *muscularis mucosae* ou muqueuse musculaire. (Stevens et Lowe, 2006).

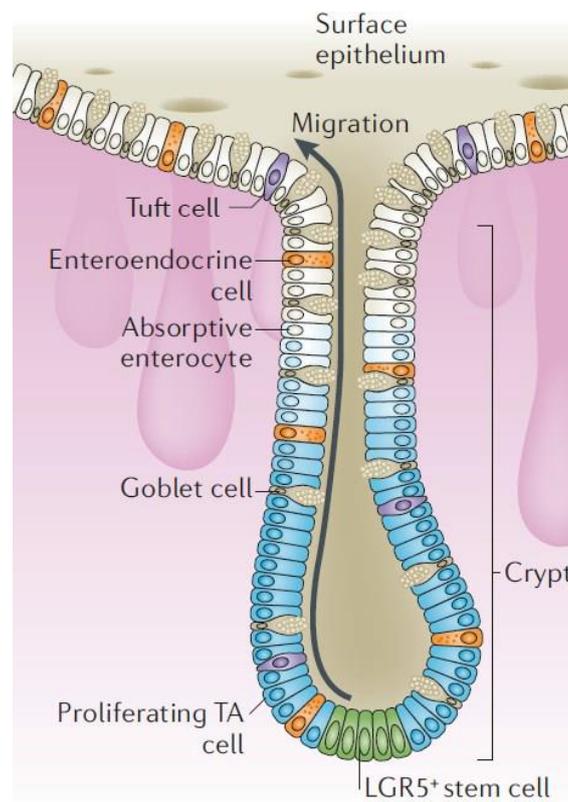


Figure 6: Schéma représentant la structure de l'axe cryptal colique (Barker, 2014).

La sous muqueuse, est un tissu conjonctif lâche qui renferme des vaisseaux sanguins et lymphatiques, ainsi que des nerfs. En dessous, se trouve **la musculuse** qui comporte deux couches de tissus musculaires lisses qui assurent les mouvements permettant l'excrétion des matières fécales. **La séreuse ou adventice**, forme la dernière couche tissulaire du gros intestin, elle a un rôle protecteur et est formée par le péritoine viscéral (Figure 7) (Stevens et Lowe, 2006).

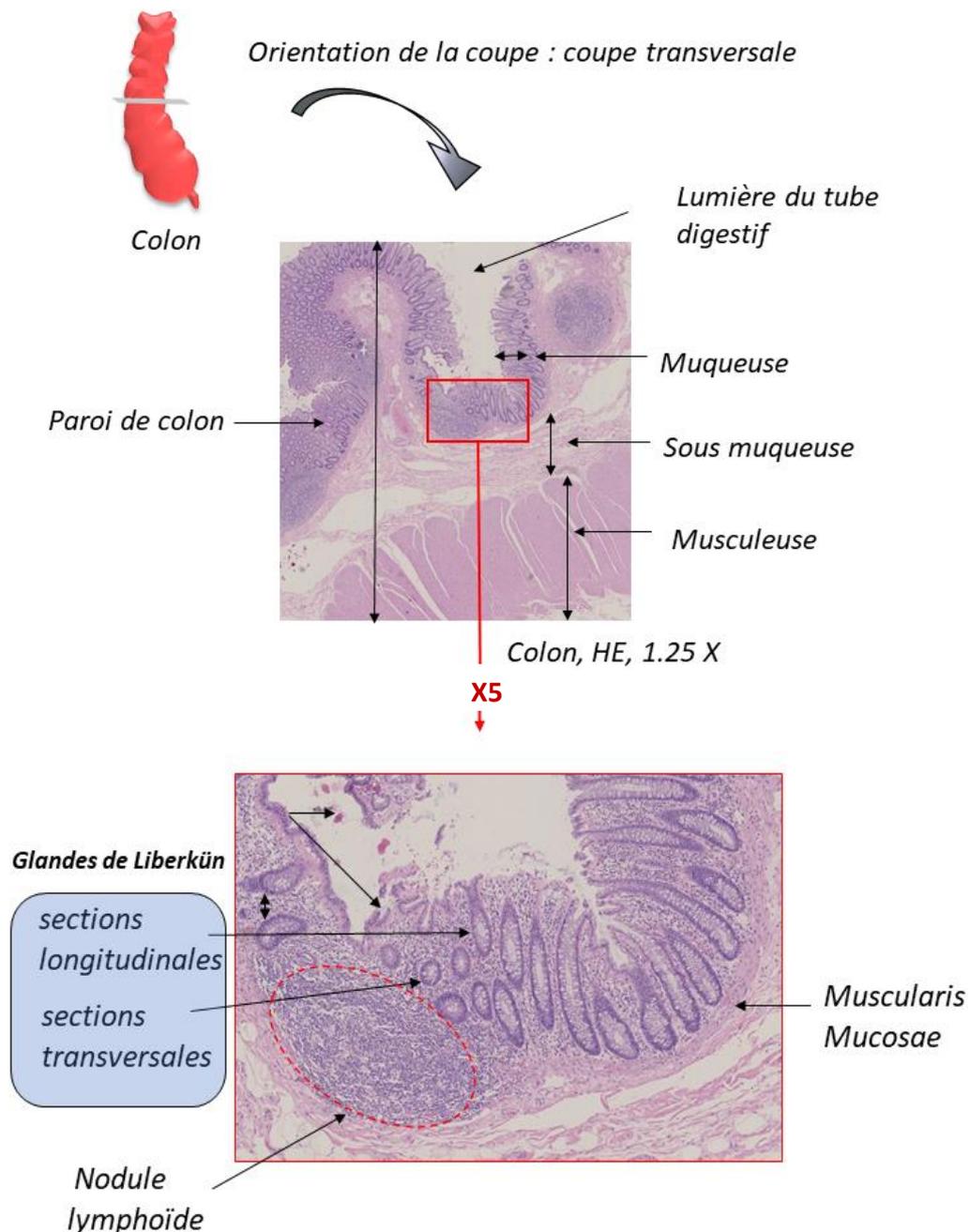


Figure 7: coupe histologique du colon (Université de Montpellier).

Dans le rectum, la couche de la séreuse est absente, ce qui facilite le passage de la tumeur et sa propagation locale.

IV- Cancer Colorectal :

IV.1- Définition :

Les carcinomes colorectaux surviennent exclusivement dans le côlon ou le rectum. Ces cancers peuvent également être appelés cancers du côlon ou du rectum, en fonction de leur point de départ, Cependant nous avons tendance à les regrouper sous le terme de "cancer colorectal" (CCR), ou bien à les utiliser de manière interchangeable en raison de leurs nombreuses caractéristiques communes tels que certains symptômes cliniques (saignements, douleurs et modifications des selles), le diagnostic, les facteurs de risque et enfin les mécanismes de carcinogénèse. (Krasteva et Georgieva, 2021).

Les CCR se développent en raison de la prolifération aberrante (Hyper-prolifération) des cellules épithéliales glandulaires du côlon lorsque ces dernières acquièrent une série de modifications génétiques ou épigénétiques (Hossain, 2022).

IV.2- Classification génétique du CCR :

Les carcinomes colorectaux (CCR) sont généralement classés en trois catégories :

a) Le CCR sporadique, Les cancers colorectaux sporadiques représentent 80%, soit la plus grande majorité des CCR. Cette forme sporadique des CCR se manifeste généralement à un âge médian de 70-75 ans, et se caractérise par l'absence totale d'antécédents familiaux notables chez les patients (Kheirleisid *et al.*, 2013; Arvelo *et al.*, 2015).

b) Le CCR familial, Le type familial, dont aucun gène associé n'a été identifié, constitue 30% des cas de cancers colorectaux. Des études de population montrent que ce type de Tumeur concerne les patients possédant au moins un membre de la famille de premier degré de consanguinité qui a souffert d'un CCR, et quand c'est un cancer du côlon sporadique le risque est de deux à trois fois plus élevé que les autres CCR (Kheirleisid *et al.*, 2013; Arvelo *et al.*, 2015).

c) Le CCR Héritaire. Il existe plusieurs syndromes héréditaires qui ont été associés aux cancers colorectaux, et parmi les plus connus et diagnostiqués d'entre eux nous retrouvons :

- **La Polypose adénomateuse familiale (FAP),** elle représente environ 1 % des cas de CCR et se caractérise par la présence de centaines, voire des milliers de polypes adénomateux colorectaux qui se développent généralement à la puberté.

L'incidence de la FAP est de 1/10 000 à 30 000 cas et se manifeste aussi bien chez les

hommes que chez les femmes. Si elle n'est pas identifiée et traitée à un stade précoce, le risque de développer un CCR avant l'âge de 40 ans est de 100 % avec le cancer du côlon survenant 10 ans après l'apparition des polypes (Al-Sukhni *et al.*, 2008; Bogaert, et Prenen, 2014).

La FAP est transmise selon un mode autosomique dominant par une mutation germinale du gène de la polypose adénomateuse coli (APC). La plupart des patients ont des antécédents familiaux de la maladie, mais environ 25 % d'entre eux présentent des mutations génétiques "de novo" dans le gène APC (Al-Sukhni *et al.*, 2008; Bogaert, et Prenen, 2014).

- **Le Cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC)**, également appelé syndrome de Lynch, constitue environ 2 à 5 % de tous les cas de CCR, soit la forme la plus courante des cancers colorectaux héréditaires.

Il s'agit d'une maladie génétique autosomique dominante, caractérisée par un risque accru de cancer du côlon et de cancer de l'endomètre, ainsi qu'un risque moindre d'autres cancers (ovaire, gastrique, intestin grêle, voies hépatobiliaires, des voies urinaires supérieures, du cerveau et de la peau). (Kheirleisid *et al.*, 2013; Bogaert, et Prenen, 2014).

IV.3- Les stades tumoraux du CCR :

D'après plusieurs études, Les stades du CCR désignent la taille de la tumeur, à quelle profondeur elle a pénétré dans les parois du côlon ou du rectum et si la tumeur s'est propagée aux ganglions lymphatiques ou à d'autres sites du corps. Selon Krasteva et Georgieva, nous pourrions les classer en cinq stades du CCR (annexe) (Krasteva et Georgieva, 2021).

La classification TNM est établie après un examen anatomopathologique complet (macroscopie et microscopie) de la pièce opératoire et elle repose sur 03 critères T (Tumeur), N (Ganglions lymphatiques) et M (Métastases). Les détails de cette classification sont résumés en annexe 2 (Labianca *et al.*, 2010).

IV.4- Facteurs de risques du CCR :

Selon des études réalisées, plusieurs facteurs modifiables (environnementaux et comportementaux) ou non modifiables (âge, sexe, génétique) sont impliqués dans le développement des cancers colorectaux (László *et al.*, 2010).

Les résultats d'un grand nombre d'études épidémiologiques indiquent une association entre l'augmentation du risque de cancer colorectal et le tabagisme (Keum et Giovannucci, 2019),

la consommation élevée d'alcool (Huxley *et al.*, 2009; Fedirko *et al.*, 2010), la consommation de viandes rouges (Chao *et al.*, 2005), le manque d'activité physique (Huxley *et al.*, 2009), le diabète de type 2 (Larsson *et al.*, 2005), et l'obésité (Ma *et al.*, 2013). Ayant tous des propriétés carcinogéniques, ils induisent de multiples conséquences métaboliques et moléculaires qui sont susceptibles d'induire des aberrations génétiques et épigénétiques et de déclencher la carcinogenèse du côlon (Rossi *et al.*, 2018).

Les autres facteurs majeurs sont l'âge et la prédisposition génétique, le cancer étant une maladie du vieillissement, les taux de développement et de décès liés au CCR augmentent rapidement après l'âge de 50 ans, 90 % des cas et des décès surviennent après cet âge. Les syndromes héréditaires de CCR tels que la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le cancer colorectal héréditaire non polyposique (HNPCC), confèrent un risque accru de CCR au cours de la vie des individus atteints (Burt *et al.*, 1995). En dehors de ces syndromes génétiques évidents, nous estimons que les personnes qui sont des parents au premier degré des individus atteints d'adénomes ou de cancer du côlon ont un risque au moins deux fois plus élevé de développer un cancer du côlon par rapport à la population générale (Kaz et Brentnall, 2006).

V- Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse colorectale :

Au niveau moléculaire, les cancers colorectaux constituent un groupe de maladies très hétérogène (De Rosa *et al.*, 2015). En effet, Le CCR est le résultat de la perte de l'intégrité génomique qui facilite l'accumulation de multiples mutations dans les gènes qui ont un rôle dans le contrôle du développement épithélial et de la différenciation cellulaire (Arvelo *et al.*, 2010).

D'après les progrès récents de la biologie moléculaire au moins trois voies distinctes d'instabilité génomique ont été décrites : les voies de l'instabilité chromosomique (CIN), de l'instabilité des microsatellites (MSI) et du phénotype méthylateur des îlots CpG (CIMP) (Figure 8) (Pino et Chung , 2010).

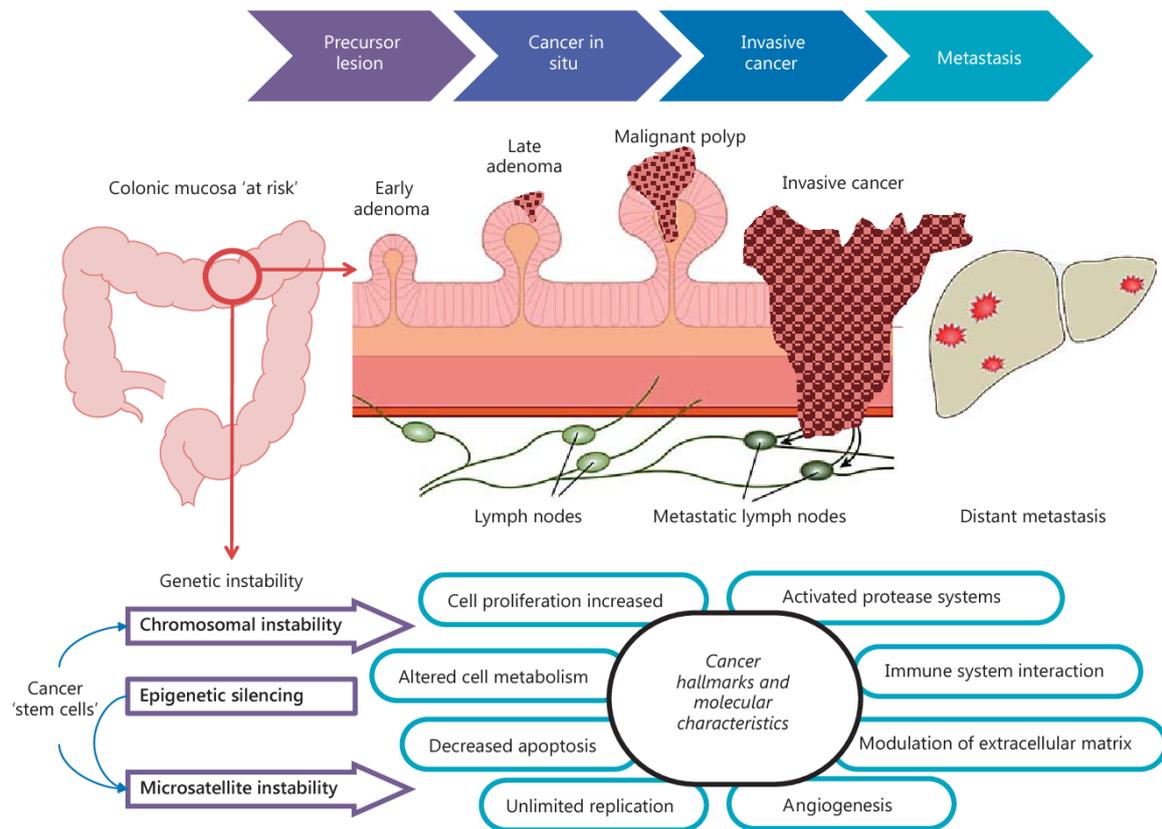


Figure 8 : Représentation schématique du processus adénome-carcinome-métastase. L'origine et le développement des cellules cancéreuses, depuis les cellules souches et la "muqueuse à risque" jusqu'aux métastases (Hagland *et al.*, 2021).

V.1- L'instabilité chromosomique (CIN) :

La CIN est observée dans 85 % des cancers colorectaux sporadiques. Elle est caractérisée par l'accumulation d'anomalies chromosomiques structurales ou numériques (aneuploïdie), une perte fréquente d'hétérozygotie (LOH) au niveau des loci des gènes suppresseurs de tumeurs et par des réarrangements chromosomiques. Entraînant ainsi une variabilité caryotypique d'une cellule à l'autre (Bogaert et Prenen, 2014).

Par conséquent, ces anomalies sont associées à des mutations fréquentes au niveau de certains oncogènes spécifiques (par exemple KRAS, PIK3CA, BRAF, etc.) et des gènes suppresseurs de tumeurs (SMAD4, TP53, APC), activant ainsi des voies critiques pour la tumorigénèse du CCR (Figure 9) (Bogaert et Prenen, 2014).

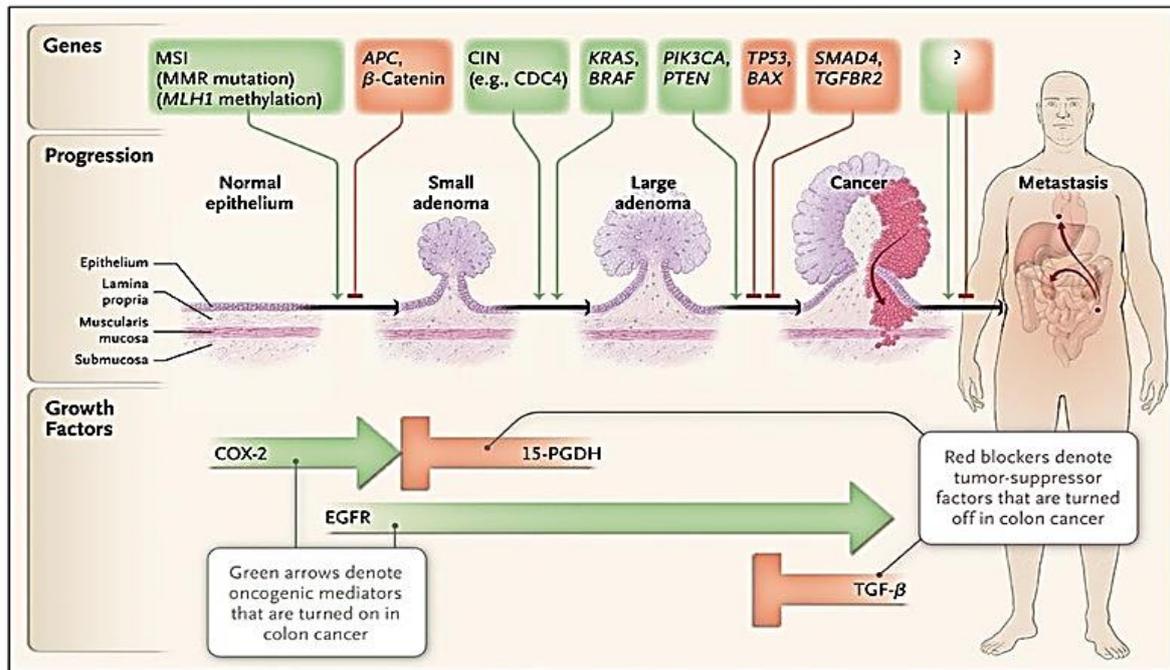


Figure 9 : Les différents facteurs variables de la cancérogenèse selon le type de CCR (Markowitz et Bertagnolli, 2009).

V.2- L'instabilité microsatéllitaire (MSI) :

L'instabilité microsatéllitaire a d'abord été décelée dans le syndrome de Lynch qui est une forme de prédisposition héréditaire aux cancers colorectaux, liée à la présence d'une mutation sur l'un des gènes du système MMR (MisMatch Repair) de réparation des mésappariements d'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, PMS1, PMS2) (Boland et Goel, 2010).

Ces gènes codent pour un complexe de protéines qui interagissent pour former une pince coulissante se déplaçant le long de la molécule d'ADN afin de trouver et de corriger les erreurs qui se produisent lors de la réplication, généralement l'ajout ou la suppression d'un ou de plusieurs nucléotides (Kaz et Brentnall, 2006). Des mutations dans un ou plusieurs de ces gènes produisent une pince défectueuse et les erreurs d'ADN commencent donc à s'accumuler. Dans certains cas de cancers sporadiques les erreurs s'accumulent en raison de l'hyperméthylation du promoteur MLH1. Comme conséquence, l'inactivation d'un gène MMR n'intervient pas directement dans la transformation maligne, mais induit des mutations sur des gènes cibles impliqués dans le contrôle de l'apoptose et du cycle cellulaire, et de ce fait confère à la cellule cancéreuse un phénotype moléculaire dit MSI+, c'est-à-dire avec une instabilité des microsatellites. Les microsatellites sont des séquences d'ADN, généralement

non codantes, constituées de la répétition en tandem d'un motif de 1 à 4 nucléotides (Figure 10).

Et du fait de leur structure répétée, les microsatellites sont difficiles à répliquer, et sont donc des cibles privilégiées d'erreurs de l'ADN polymérase responsable de mésappariements de l'ADN normalement identifiés et réparés par les enzymes du système MMR. En cas de défaillance de ce système, nous observons au niveau des microsatellites une accumulation d'erreurs d'où le terme instabilité microsatéllitaire.

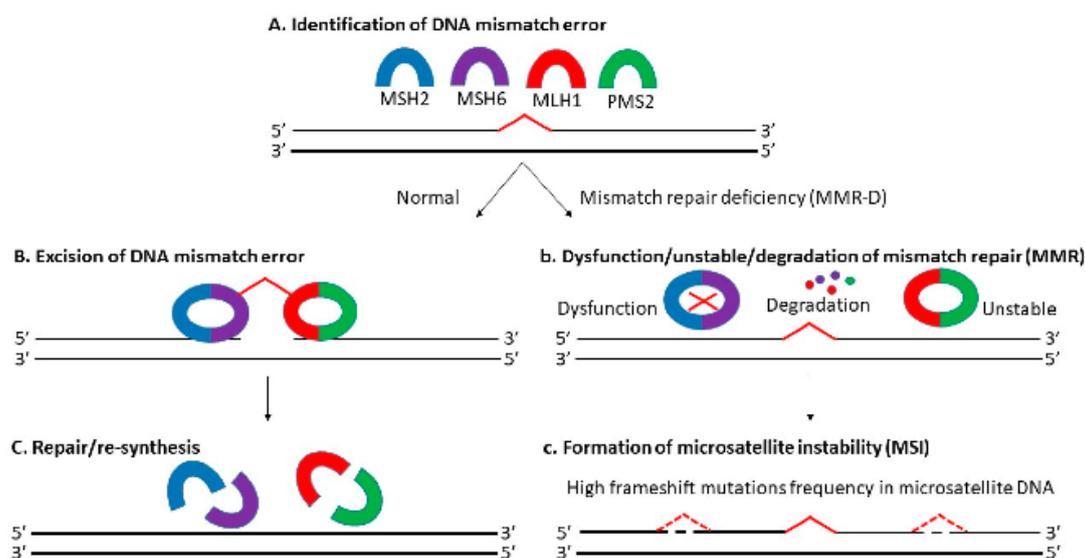


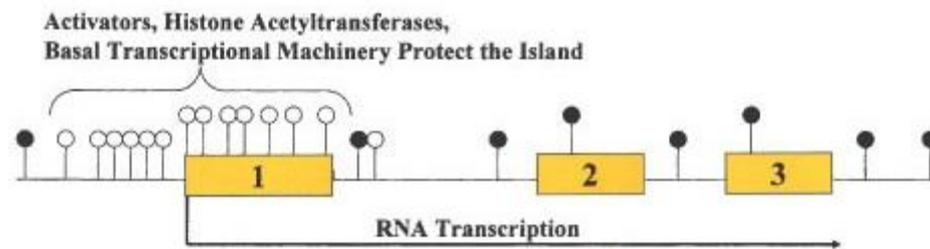
Figure 10 : Mécanisme de réparation de l'ADN et la MSI (Tieng *et al.*, 2021).

V.3- L'instabilité épigénétique (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype) :

De plus en plus de preuves suggèrent que les modifications épigénétiques pourraient même être plus importantes que les modifications génétiques et qu'elles joueraient un rôle déterminant dans l'origine de la tumeur et son hétérogénéité.

Une méthylation aberrante de l'ADN des îlots CpG a été récemment signalée dans les lésions précoces de la muqueuse du côlon. Cette hyperméthylation (Figure 11), induit une inactivation transcriptionnelle de certains gènes suppresseurs de tumeur, comme indiqué dans la Figure 12 (Bogaert et Prenen, 2014).

Ilot CpG Non-méthylé



Ilot CpG Hyperméthylé

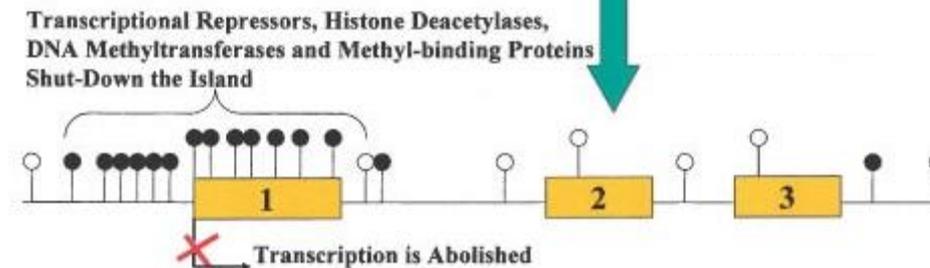


Figure 11 : Mécanisme de l'hyperméthylation des îlots CpG (Esteller, 2002).

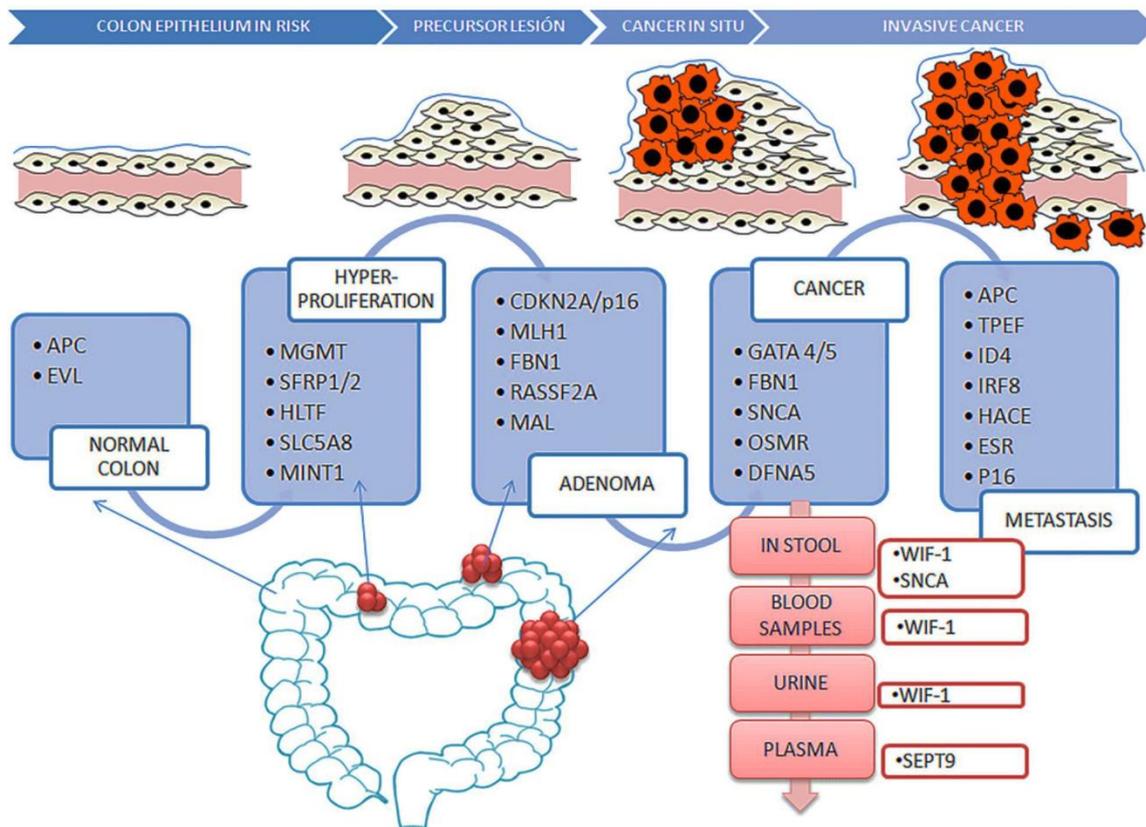


Figure 12 : Biomarqueurs de méthylation potentiels dans le CCR. L'ADN méthylé spécifique à la tumeur peut être localisé dans les tissus colorectaux à différents stades de la maladie, de la même manière que dans les échantillons de sang, de plasma ou d'urine. (González-Flores *et al.*, 2018).

VI- Les principales voies de signalisation impliquées dans le CCR :

Malgré cette hétérogénéité moléculaire, les conséquences en termes d'altération des voies de signalisation sont communes, nous retrouvons :

VI.1- La Voie Wnt/APC/ β caténine :

Chez les individus normaux, la protéine suppresseur de tumeur APC joue un rôle central dans la voie de signalisation Wnt en régulant la dégradation de la β -caténine qui agit comme un facteur de transcription des gènes intervenant dans la prolifération cellulaire.

Lorsque le ligand Wnt, une glycoprotéine sécrétée, se lie à ses récepteurs Frizzled (Fzd), le complexe APC, Axine et la glyco-gène synthase kinase 3β (GSK 3β) est inactivée et la β -caténine est stabilisée, accumulée dans le cytoplasme et finalement transloquée dans le noyau où elle interagit avec les facteurs LEF/ TCF et active des gènes cibles spécifiques.

En l'absence de signal Wnt, la caséine kinase 1 (CK1) et le complexe APC/Axin/GSK- 3β exerce une régulation négative sur la protéine oncogène β -caténine en favorisant sa phosphorylation, ce qui entraîne sa dégradation par le protéasome, empêchant ainsi sa translocation nucléaire.

Dans le cas où une mutation survient au niveau du gène APC (par exemple insertion, délétion, mutation non-sens), ceci entraînerait la perte de la fonction APC et une accumulation de la β -caténine conduisant à une prolifération incontrôlée des cellules épithéliales de la crypte intestinale (Figure 13) ([Bogaert et Prenen, 2014](#); [Zhang et Wang, 2020](#)).

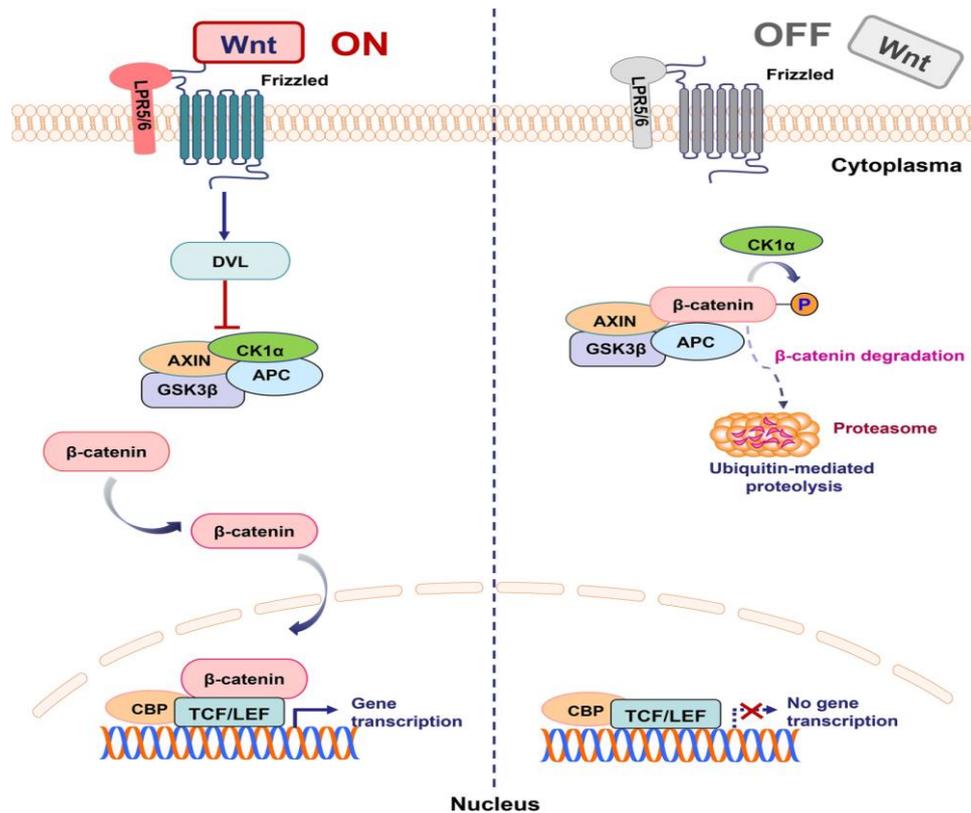


Figure 13 : Signalisation de la voie Wnt dans le CCR (Zhang et Wang, 2020).

VI.2 La voie TGF- β / SMAD :

La voie du TGF- β est impliquée dans la régulation de divers processus biologiques tels que la prolifération, la différenciation et l'apoptose cellulaires, et cela par le biais de divers médiateurs tels que les protéines SMAD2/3 et SMAD4 qui vont activer la transcription de gènes régulateurs du cycle cellulaire.

Des mutations inactivantes ont été signalées dans les gènes des récepteurs du TGF- β qui sont le TGF β R1 et TGF β R2, et parmi les mutations délétères du TGF β R2 près de 30 % ont été détectées dans tous les cancers colorectaux et ont été associées à la transformation maligne des adénomes.

D'autres mutations le long de la voie du TGF- β ont été impliquées dans la carcinogénèse sont celles des protéines SMAD, plus particulièrement SMAD4 (Harisson et Benziger, 2014).

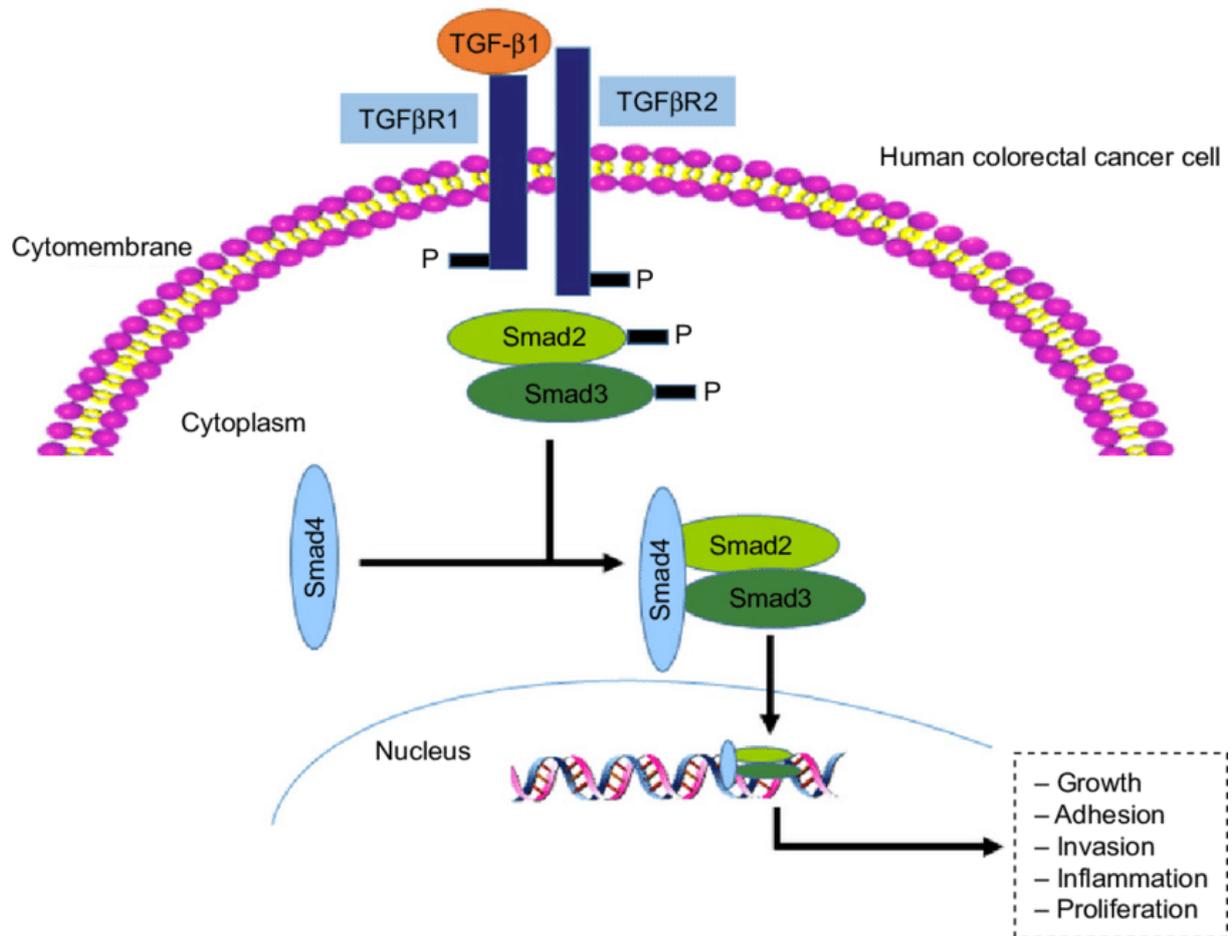


Figure 14 : Signalisation de la voie TGF- β dans le CCR (Jiang et al., 2019).

VI.3 La voie PI3K/AKT/PTEN :

La voie PI3K/AKT/PTEN est souvent trouvée dysfonctionnelle dans les CCR sporadiques et héréditaires, elle active la croissance cellulaire et inhibe l'apoptose en réponse à plusieurs stimulations extracellulaires, telles que les facteurs de croissance, les cytokines, les hormones, la chaleur et le stress oxydatif, l'hypoxie et l'hypoglycémie (Yang et al., 2019).

La liaison du facteur de croissance à son récepteur induit l'auto-phosphorylation et l'activation du récepteur lui-même. En conséquence, la PI3K est recrutée au niveau de la membrane plasmique et activée (De Rosa et al., 2015).

Le PI3K activé, convertit le phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate (PIP₂) en phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate (PIP₃) et la liaison du PIP₃ à l'AKT permet de l'ancrer à la membrane, ce qui permettra sa phosphorylation et son activation via la phosphoinositide-dépendante kinase-1 (PDK1) et la PDK2 (Papadatos-Pastos et al., 2015).

L'AKT intervient dans de nombreux processus cellulaires tels que le contrôle du métabolisme, de la traduction, de l'apoptose et du cycle cellulaire, en phosphorylant plusieurs protéines cibles, telles que BAD (antagoniste de la mort cellulaire BCL-2), la caspase-9, mTOR, GSK3 et la β -caténine (Rascio *et al.*, 2021).

Le PTEN, quant à lui, est un gène suppresseur de tumeur, dont les altérations sont impliquées dans plusieurs CCR sporadiques et héréditaires. Il est considéré comme un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT en déphosphorylant et en régulant la baisse les niveaux de PIP3 (Figure 15) (De Rosa *et al.*, 2015).

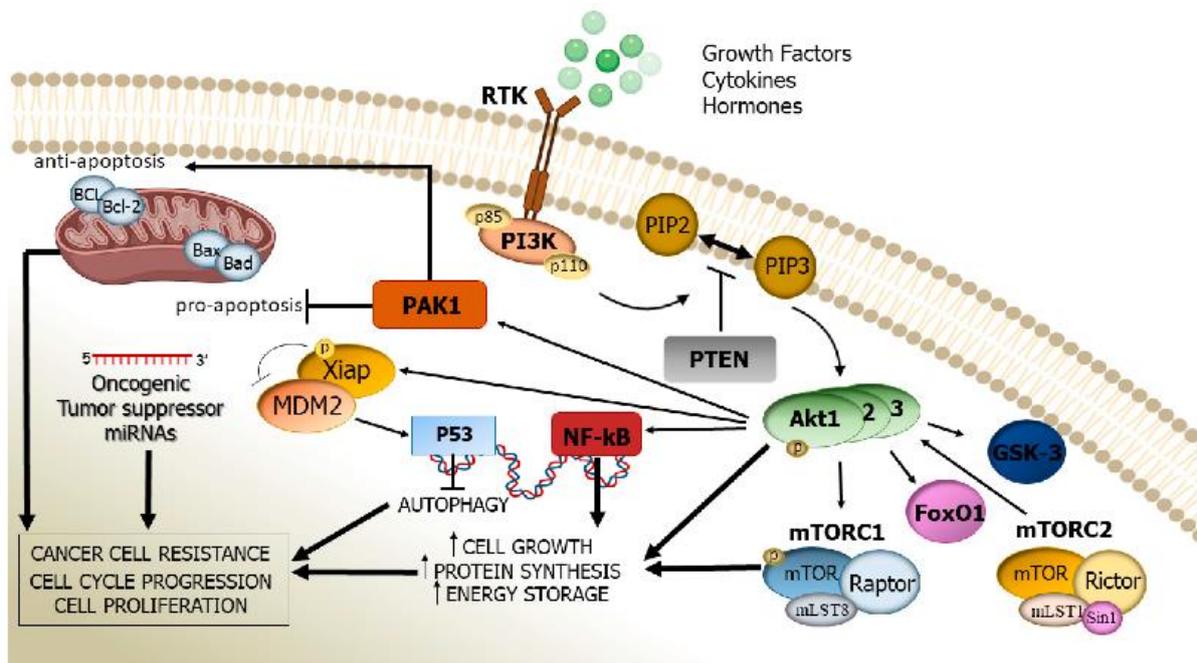


Figure 15 : Signalisation de la voie PI3K dans le CCR (Rascio *et al.*, 2021).

VI.4 La voie TP53 :

Le TP53 est considéré comme l'un des gènes suppresseurs de tumeurs les plus connus, il est induit par plusieurs protéines oncogènes, telles que c-Myc, RAS et l'adénovirus E1A. Dans des conditions normales, Tp53 est régulé négativement par MDM2, E3-ubiquitine ligase, et la protéine apparentée MDM4 (également connue sous le nom de MDMX), qui se lie au domaine de transactivation de p53 et ciblent sa dégradation par ubiquitination. Dans les cellules soumises à un niveau de stress élevé, les interactions entre MDM2, MDM4 et p53 sont perturbées, ce qui permet à la p53 activée d'exercer son activité transcriptionnelle (Figure 16) (Pino et Chung, 2010).

Défini comme le "gardien du génome", TP53 est un régulateur principal qui contrôle la transcription de centaines de gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADN, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, la sénescence, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire, la motilité et la migration. Parmi les cibles les mieux étudiées de p53 figurent l'inhibiteur du cycle cellulaire p21, GADD4/5 contribuant à l'arrêt en G2, et BAX, FAS (APO1), qui régulent l'activation des caspases et l'apoptose (Pitolli *et al.*, 2019).

Le dysfonctionnement de TP53 est une caractéristique presque universelle des tumeurs humaines et sa perte de fonction a été signalée dans 50 % à 75 % des CCR.

La majorité (80 %) des mutations de TP53 sont des mutations faux-sens qui conduisent à la synthèse d'une protéine inactive dont la demi-vie est anormalement longue et qui est détectable par immunohistochimie (Pino et Chung, 2010).

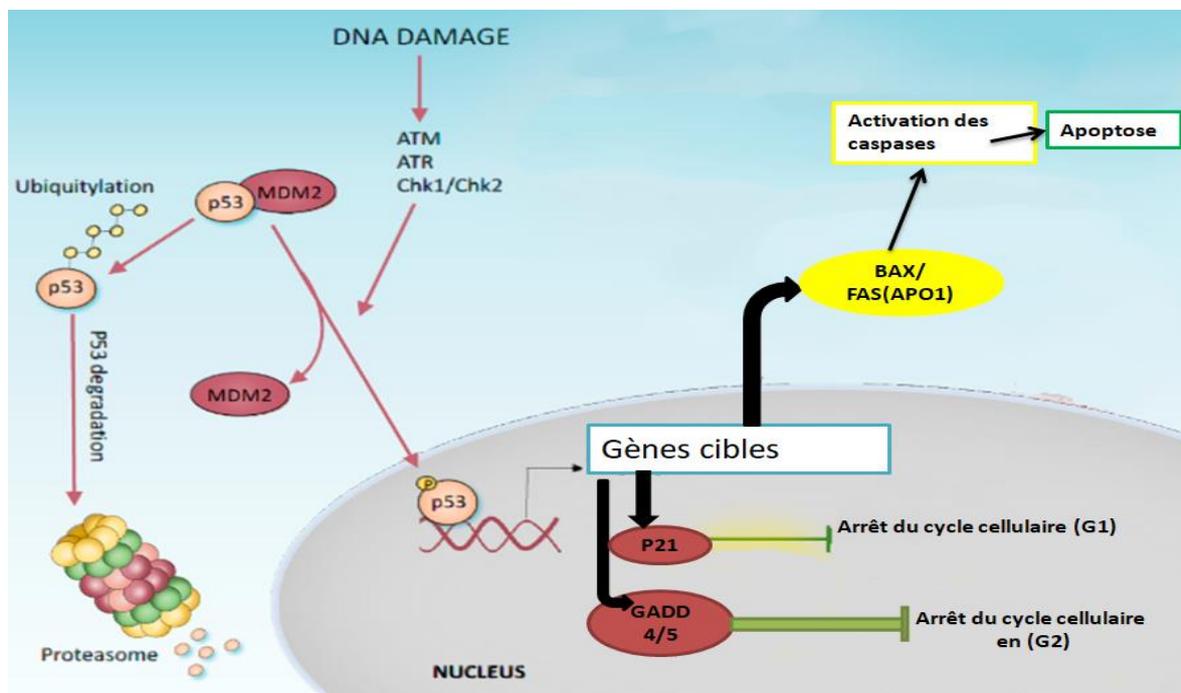


Figure 16 : Signalisation de la voie TP53 dans le CCR (Pitolli *et al.*, 2019).

VI.5 La Voie KRAS/ MAPK :

Le gène KRAS est un proto-oncogène situé sur le chromosome 12, il appartient à la famille des gènes RAS (KRAS, NRAS et HRAS) codant pour des protéines à activité GTPase qui sont membres de la superfamille des petites protéines G (Harisson et Benziger, 2014).

KRAS est une protéine de liaison de 21 kDa, située à la surface interne de la membrane cellulaire, et liée au GTP dans sa conformation active afin d'intégrer et de transmettre des

signaux de croissance extracellulaires vers le noyau et de ce fait contrôler la transduction des signaux intracellulaires. Quand, le GTP est hydrolysée en GDP par la GTPase, la protéine KRAS devient inactive (Calvert et Frucht, 2002; Haigis *et al.*, 2008; De Roock *et al.*, 2010).

Lorsqu'un ligand comme le facteur de croissance épidermique (EGF) se lie au récepteur tyrosine kinase (EGFR), ce dernier s'autophosphoryle et s'active. L'activation du récepteur tyrosine kinase entraîne la combinaison de La GRB2 avec un facteur d'échange de nucléotide guanine (GEF) tel que le SOS. Le SOS interagit avec la protéine KRAS en augmentant ses niveaux de liaisons au GTP, favorisant ainsi son activation.

La liaison du GTP à KRAS facilite la liaison des effecteurs pour déclencher plusieurs voies en aval notamment la voie MAPK ainsi que la voie PI3K qui jouent un rôle important dans le contrôle de plusieurs fonctions, telles que la croissance et la survie cellulaires (l'inhibition de l'apoptose) (Hyun et Shin, 2014).

Lorsque la protéine KRAS est activée, elle se dimérise. Les dimères de KRAS se lient alors aux effecteurs qui sont les kinases RAF et les activent, ensuite, le RAF active MEK1 et MEK2, qui à leur tour phosphorylent d'autres kinases de la voie, à savoir ERK1 et ERK2.

Dans les cellules normales, les ERK activées phosphorylent ensuite des substrats cytosoliques et nucléaires, notamment JUN et ELK1, qui régulent des enzymes telle que la cycline D1, impliquée dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (transition de la phase G1/S) (Pino et Chung, 2010; László *et al.*, 2021).

Les mutations somatiques de KRAS sont présentes dans environ 40 % des CCR et la grande majorité d'entre elles 85-90% affectent les codons 12 et 13 de l'exon 2 et de rares mutations affectent les codons 61 (5 %) et 146 (5 %) (Tableau I) (Fearon, 2010).

Tableau I: les mutations les plus fréquentes de KRAS (Pender *et al.*, 2015).

KRAS genotype	Mutation	Cases	Frequency
G12D	c.35G>A	10719	33.8%
G12V	c.35G>T	7138	22.5%
G13D	c.38G>A	3959	12.5%
G12C	c.34G>T	3713	11.7%
G12A	c.35G>C	1694	5.3%
G12S	c.34G>A	1507	4.7%
G12R	c.34G>C	1024	3.2%
G13C	c.37G>T	276	0.9%
Q61H	c.183A>C	144	0.5%

Lorsque les protéines RAS se lient au GTP, elles sont activées. Les facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF) comme le SOS1 catalysent les processus d'échange GDP-GTP, et les protéines activant la GTPase (GAP) tel que la NF1 catalysent l'hydrolyse et la désactivation du GTP et par conséquent l'arrêt de la transduction des signaux (Zhu *et al.*, 2010; Hyun et Shin, 2014).

Une fois que *KRAS* est muté, le cycle intrinsèque KRAS GTP-GDP régulé par les GEF et les GAP sera perturbé, permettant à la protéine KRAS mutante de s'accumuler dans un état actif et activant ainsi de manière persistante la cascade de signalisation MAPK et PI3K en aval, entraînant la prolifération et la survie des cellules de manière continue (Figure 17) (Zhu *et al.*, 2010).

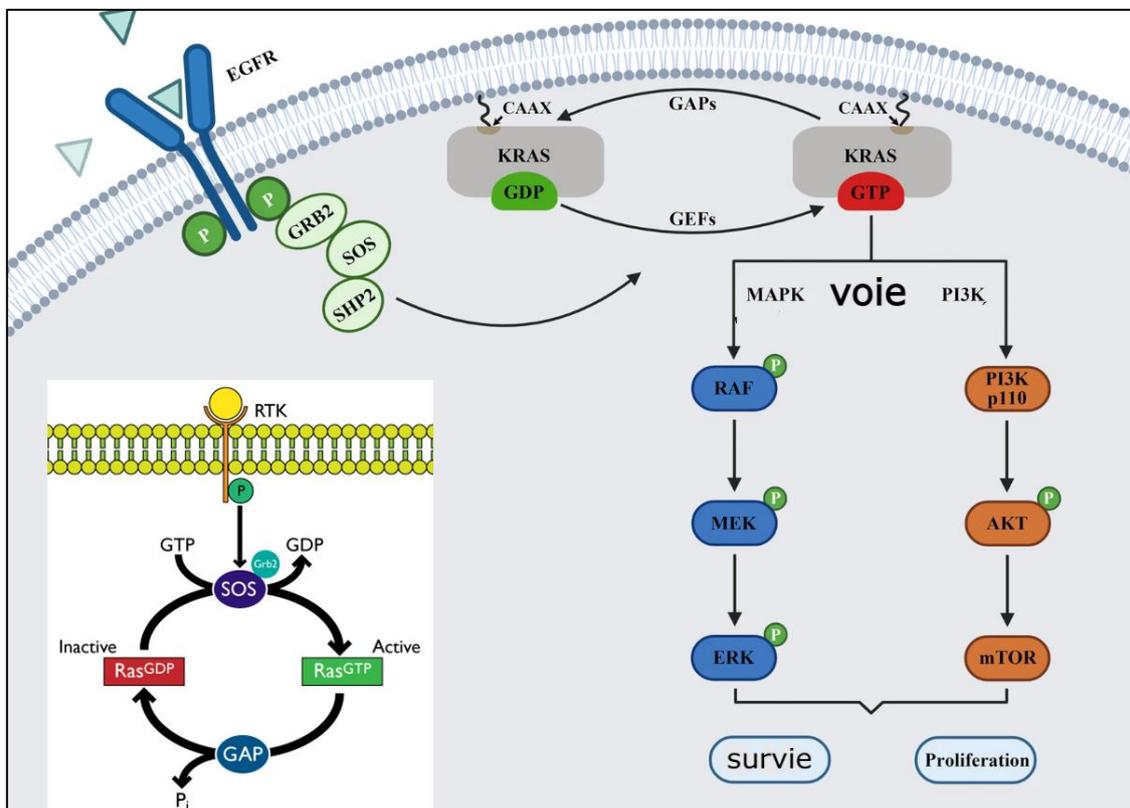


Figure 17 : Signalisation de la voie KRAS/MAPK dans le CCR (Zhu *et al.*, 2010).

En plus de ces mécanismes signalétiques, les différentes voies de signalisation, sont en interaction constante avec de nombreuses voies, chacune étant soumise à un réglage fin et à des activations de facteurs de régulation semblables à des interrupteurs (Figure 18). En résumé, les voies convergent vers l'amplification de molécules clés qui soutiennent les processus de prolifération, de croissance et de survie des cellules tumorales (Braicu *et al.*, 2019).

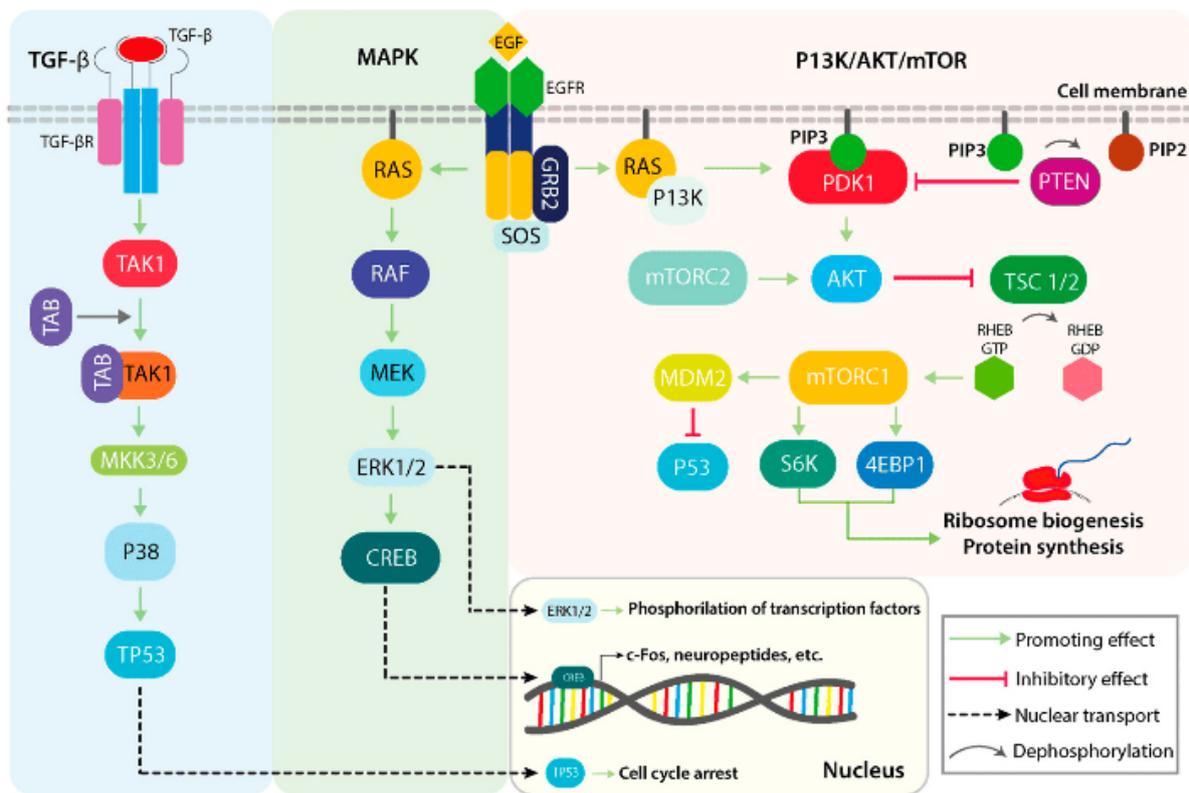


Figure 18 : Le rôle de différentes voies signalétiques dans le CCR (Braicu *et al.*, 2019).

VII- Dépistage et traitement :

Le CCR reste l'une des principales causes de mortalité dans le monde, malgré la disponibilité d'outils de dépistage fiables et de thérapies efficaces. Même si de nos jours, la majorité des patients atteints de CCR sont diagnostiqués à un stade précoce (stades I à III), ce qui offre une chance de guérison relativement plus élevée. Le taux de survie jusqu'à 5 ans des patients aux stades I et II est supérieur à 60 %, mais plus de 50 % des patients sont diagnostiqués au stade III ou au-delà, lorsque des métastases sont déjà apparues, et dans ce cas, le taux de survie jusqu'à 5 ans tombe à 10 % (Chakrabarti *et al.*, 2020).

VII.1- Dépistage :

La méthodologie de dépistage employée pour le CCR est étroitement liée aux antécédents familiaux et personnels des individus. Les conseils d'experts recommandent de commencer le dépistage chez les patients à risque moyen à l'âge de 45 ans en raison de l'incidence élevée de l'apparition précoce du cancer. Pour les personnes à haut risque le dépistage peut commencer dès l'adolescence. Il est recommandé de commencer le dépistage chez les personnes ayant des

antécédents familiaux positifs 10 ans avant l'âge auquel le membre de la famille a été diagnostiqué (Kumar et Lewis, 2022).

Les différentes modalités de détection précoce des CCR sont les suivantes :

Des tests basés sur les selles (test immunochimique fécal (TIF), test de recherche de sang occulte dans les selles au gâïac (RSOSg), test ADN des selles (FIT-DNA)). Des tests basés sur la visualisation (Coloscopie standard ou radiologique, Lavement baryté), et des tests sanguins (Kumar et Lewis, 2022).

VII.2- Traitement :

La procédure à suivre une fois que le diagnostic est posé dépend du stade et de l'évolution du cancer comme expliqué ci-suis.

VII.2.1. La chirurgie :

La chirurgie reste le traitement principal à tous les stades de la carcinogenèse. La tumeur est retirée via excision locale lorsqu'elle est superficielle ou via résection partielle ou colectomie quand l'infiltration et la propagation sont plus avancés. L'ablation de la tumeur est toujours accompagnée par un curage ganglionnaire (Rentsch *et al.*, 2016).

VII.2.2 La radiothérapie et la chimiothérapie :

Dans les stades avancés nous avons recourt à des méthodes visant à irradier les cellules malignes avec des rayons X ou autres radiations pour ralentir leur croissance c'est ce qu'on appelle la radiothérapie. La chimiothérapie elle, est l'administration de médicaments cytotoxiques qui ont pour but de tuer les cellules ou bloquer leur division. Des combinaisons de plusieurs agents chimiothérapeutiques ont été incorporées dans la pratique clinique de routine. Les combinaisons d'irinotécan, un inhibiteur semi-synthétique de la topoisomérase, d'oxaliplatine, un composé de platine de troisième génération qui provoque un arrêt mitotique par la formation d'adduits à l'ADN, et de capécitabine, un prodrug du 5-FU, sont désormais des options établies pour le traitement de première, de deuxième et de troisième intention du cancer colorectal (McQuade *et al.*, 2017).

VII.2.3- La thérapie ciblée :

La thérapie ciblée est un traitement souvent utilisé dans les cancers métastatique du CCR qui vise à utiliser différents agents chimiques pour agir sur les cellules cancéreuses en inhibant

directement leur prolifération, leur différenciation et leur migration. Le microenvironnement tumoral, y compris les vaisseaux sanguins locaux et les cellules immunitaires, peuvent également être modifiés par des médicaments ciblés afin d'entraver la croissance de la tumeur et de renforcer la surveillance et l'attaque immunitaires (Xie *et al.*, 2020). Nous avons ici quelques exemples d'inhibition des voies signalétiques majeures ciblées en thérapeutique :

- Inhibition de la voie de PI3K :

L'activation de la PI3K peut se produire par le biais de stimuli par l'intermédiaire de récepteurs tyrosine kinases (RTK) ou par la stimulation de Ras activés. Elle peut également se produire suite à des mutations somatiques. De nombreux essais cliniques évaluent actuellement de nouveaux médicaments qui interfèrent avec la signalisation des composants du PI3K. Quatre types de composés sont en cours de développement : les inhibiteurs de la PI3K, les doubles inhibiteurs de la PI3K et de la mTOR, les inhibiteurs de l'AKT et les inhibiteurs de la mTOR. Les inhibiteurs de PI3K peuvent être subdivisés en isoformes spécifiques et en pan-inhibiteurs des PI3Ks de classe Ia dans le cancer (Figure 19). Ces molécules ont principalement des effets cytostatiques avec arrêt en phase G1 *in vitro* et des effets anticancéreux favorables *in vivo* (Papadatos-Pastos, *et al.* 2015).

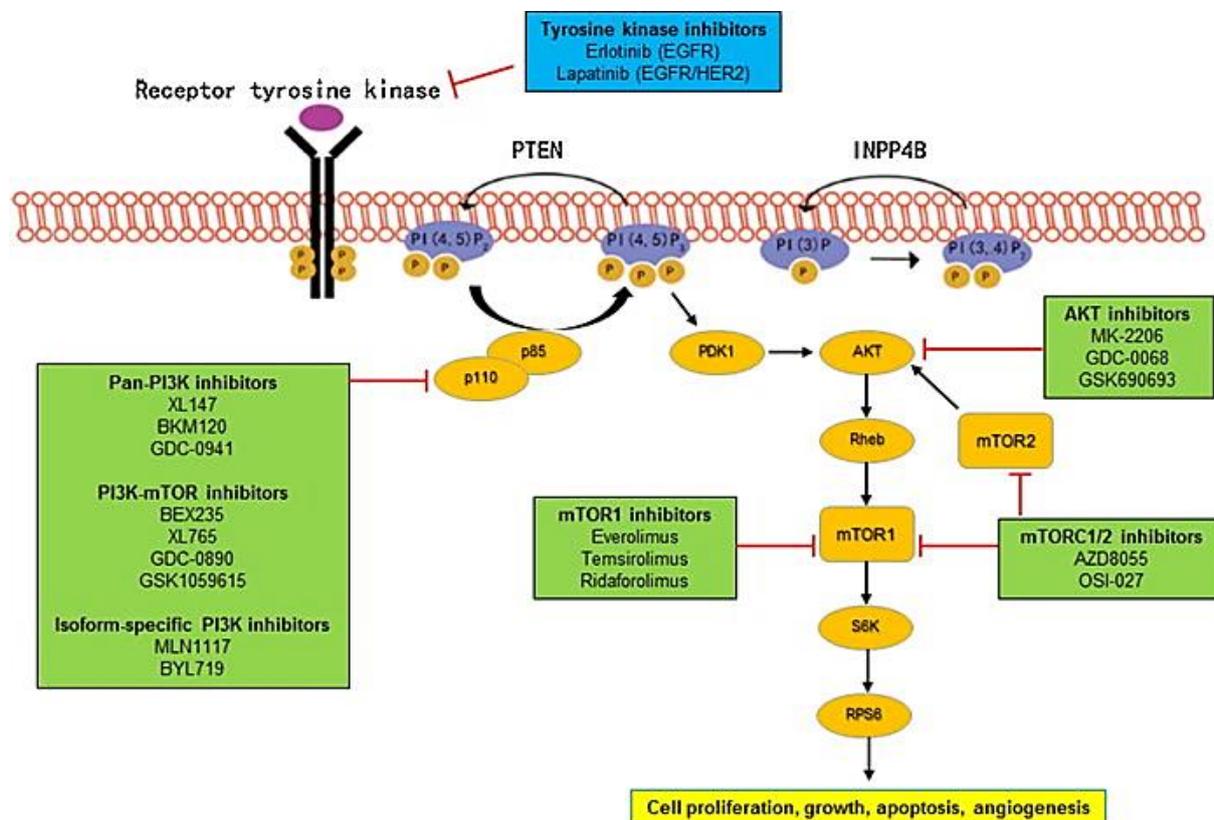


Figure 19 : Les cibles pharmacologiques possibles de la voie PI3K (Papadatos-Pastos, *et al.* 2015).

- Inhibition de la voie de TGF- β :

La voie du TGF- β fait l'objet d'une évaluation approfondie en tant que cible thérapeutique potentielle en raison de son rôle important dans le développement de la plupart des tumeurs solides humaines. Dans la signalisation du TGF- β , les SMADs transduisent les signaux des complexes ligand-récepteur à la surface des cellules vers la transcription des gènes dans le noyau. Les interactions spécifiques entre les protéines SMAD déterminent la spécificité de la signalisation. Les SMADs inhibiteurs, les corécepteurs à la surface et les kinases intracellulaires peuvent modifier la force de signalisation des SMADs et représentent un autre domaine stratégique à prendre en compte dans le ciblage de la voie du TGF- β (Figure 20) (Nagathihalli et Datta, 2010).

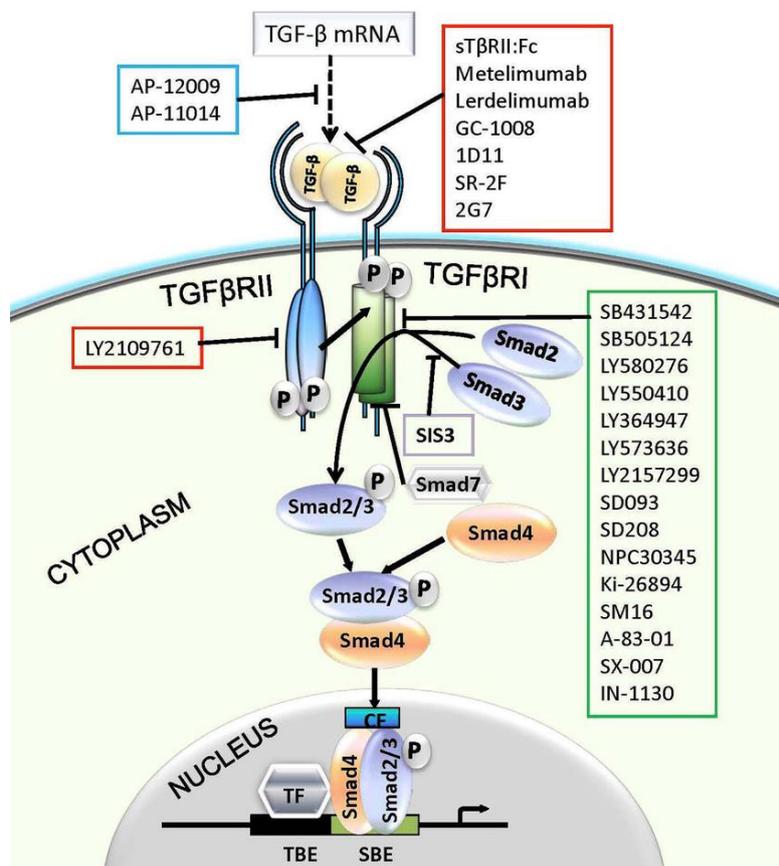


Figure 20 : Inhibiteurs de la voie de signalisation TGF- β actuellement en cours de développement pour une éventuelle thérapie anticancéreuse (Nagathihalli et Datta, 2010).

- Inhibition de la voie de WNT :

La signalisation Wnt/ β -caténine est fortement activée dans les cancers, ce qui a conduit au développement de divers inhibiteurs de la signalisation Wnt pour les thérapies anticancéreuses. Afin de supprimer les ligands ou les récepteurs de la WNT pour le traitement

du cancer, les inhibiteurs de PORCN, les antagonistes des ligands de la WNT et les antagonistes/anticorps monoclonaux de la FZD ont été examinés dans le cadre d'essais cliniques portant sur divers cancers humains associés à la signalisation de la Wnt (Figure 21). Néanmoins, le blocage de la signalisation Wnt entraîne des effets secondaires tels que l'altération de l'homéostasie et de la régénération des tissus. Cela rend le développement de thérapies difficile tant qu'on n'a pas une compréhension plus complète et approfondie de cette voie (Jung et Park, 2020).

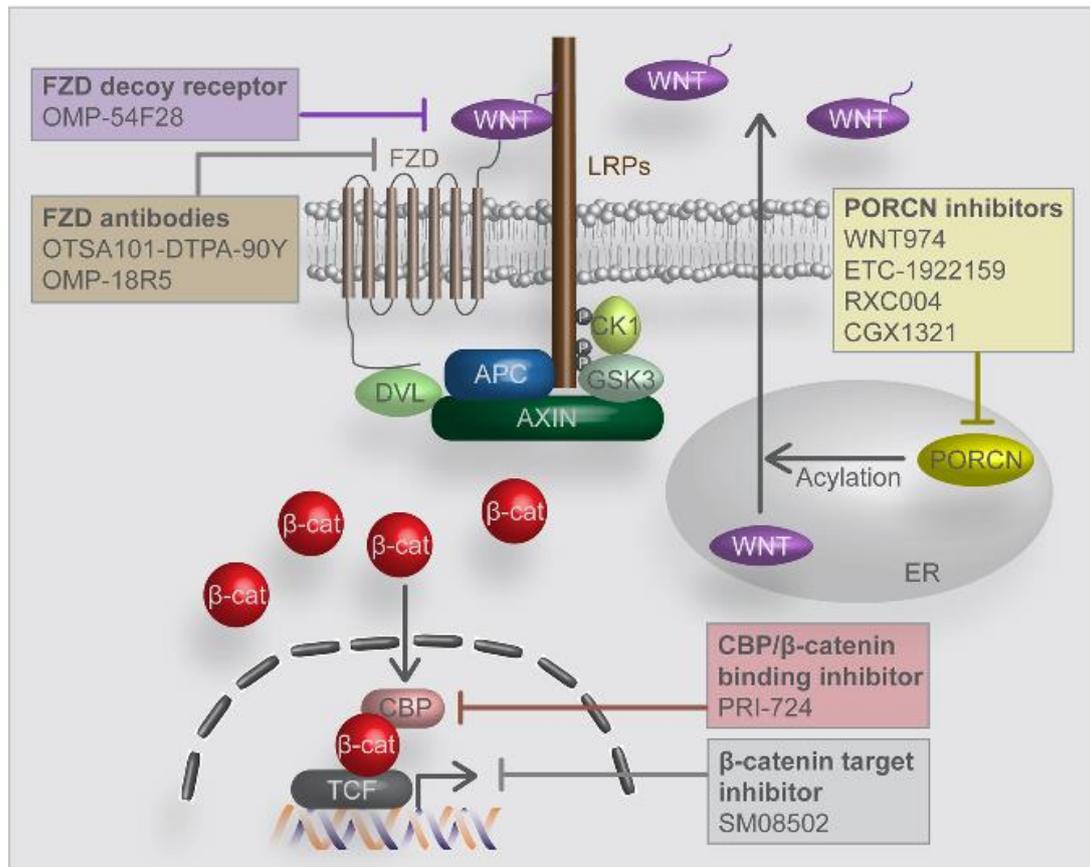


Figure 21 : Inhibiteurs de la signalisation Wnt/ β -caténine dans les essais cliniques en cours et passés (Jung et Park, 2020).

-Inhibition de la voie de K-RAS :

Après l'activation du récepteur tyrosine kinase, GRB2 se combine avec le facteur d'échange de guanine nucléotide SOS et interagit ensuite avec la protéine KRAS qui est attachée à la membrane cellulaire, favorisant ainsi l'activation de KRAS. Le cycle GTP-GDP intrinsèque de KRAS est régulé par des GEF et des GAP. Lorsque le gène KRAS est muté, ce cycle est perturbé, ce qui permet à la protéine KRAS mutante de s'accumuler dans un état actif et d'activer de manière persistante la cascade de signalisation MAPK et PI3K en aval, entraînant

ainsi la prolifération et la survie des cellules. Les différents inhibiteurs de KRAS énumérés dans le cadre ont été développés pour cibler chaque complexe de la voie de signalisation de KRAS et ont ensuite été évalués dans le cadre d'études précliniques ou cliniques (Figure 22) (Zhu *et al.*, 2021).

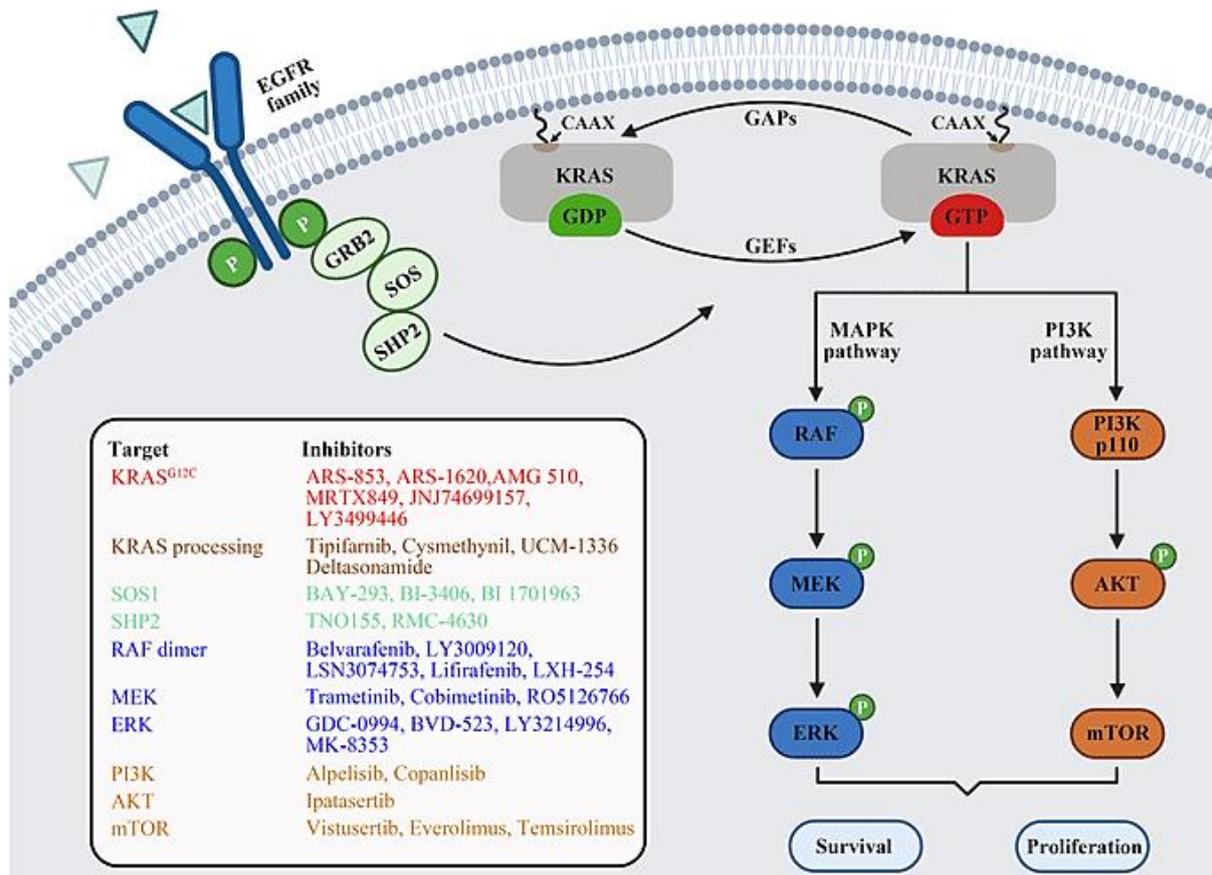


Figure 22 : Voie de signalisation du KRAS et inhibiteurs pertinents pour chaque cible (Zhu *et al.*, 2021).

Il est important de noter que les patients atteints de tumeurs avec un KRAS de type sauvage sont plus enclins à répondre à la thérapie anti-EGFR, alors que ceux avec KRAS mutant ne le sont pas en raison d'une activation constante de la voie d'EGFR indépendamment du blocage pharmacologique du récepteur (Zhu *et al.*, 2021). C'est pour cela que l'étude du statut mutationnel est très importante pour adapter la thérapie au patient.

Chapitre II

Matériels et méthodes

PARTIE PRATIQUE :

Objectif :

L'objectif principal de ce travail consiste à réaliser une étude subdivisée en trois volets portant sur le cancer colorectal (CCR) :

- 1- L'étude statistique visant à établir un profil épidémiologique du CCR au niveau de la wilaya de Bejaia.
- 2- L'étude anatomopathologique du CCR.
- 3- L'étude de biologie moléculaire qui se concentre sur l'évaluation du statut KRAS en utilisant la technique de la PCR. Cette approche jouera un rôle crucial dans l'établissement des profils moléculaires pertinents pour le choix thérapeutique du CCR et la prise en charge des patients.

MATERIELS ET METHODES :

Cadre d'étude :

Dans le cadre de cette étude, un stage d'une durée de 4 mois a été effectué au sein de 03 services différents :

- *service d'oncologie du CHU de Béjaia.
- * laboratoire d'anatomie et cytopathologie de Sidi Ali Lebhar Annexe du CHU de Bejaïa.
- * laboratoire de cancérologie au niveau du laboratoire de médecine (Université de Béjaia).

I- Etude épidémiologique :

Il s'agit d'une analyse rétrospective qui s'est déroulée au niveau du service d'oncologie du CHU de Béjaia.

I.1- Population étudiée :

La population étudiée concerne les patients présentant un cancer colique ou rectal durant la période allant d'aout 2021 à mars 2023, englobant ainsi un total de 85 malades (36 femmes et 49 hommes).

I.2 Recueil des données :

La collecte des données a été réalisée suite à la consultation des dossiers médicaux des patients, tout en répondant au questionnaire de la fiche d'enquête mise au point (annexe 2).

II- Etude anatomopathologique :**II.1- Matériels :**

Les divers équipements et produits utilisés au cours de cette étude anatomopathologique ont été répertoriés dans l'Annexe 3.

II.2- Les prélèvements opératoires :

Après chaque chirurgie, les pièces opératoires de résection colique sont fixées dans des solutions de formol dilué à 10%, par la suite envoyées au laboratoire d'anatomie et cytopathologie de Sidi Ali Lebhar annexe du CHU de Bejaïa afin d'être analysées.

A la réception de ces pièces opératoires accompagnées d'une fiche de renseignements (âge des patients, sexe, site tumoral ...etc.), un numéro d'enregistrement leur est attribué.

II.3- Examens macroscopique :

La macroscopie est le diagnostic à l'œil nu fait par un médecin pathologiste, qui se résume à :

- 1- mesurer la taille de la pièce opératoire et celle de la tumeur ;
- 2- décrire l'aspect macroscopique de la tumeur (Figure23, A, B).
- 3- disséquer la pièce opératoire et prélever des fragments à partir du siège de la tumeur ainsi que des limites d'exérèse.
- 4- prélever les ganglions et préciser leurs nombres.
- 5- déposer les fragments tissulaires et les ganglions prélevés dans des cassettes en plastique sur lesquelles est noté le numéro d'enregistrement accompagné d'une lettre d'alphabet pour chaque cassette (Figure 23, C, D).

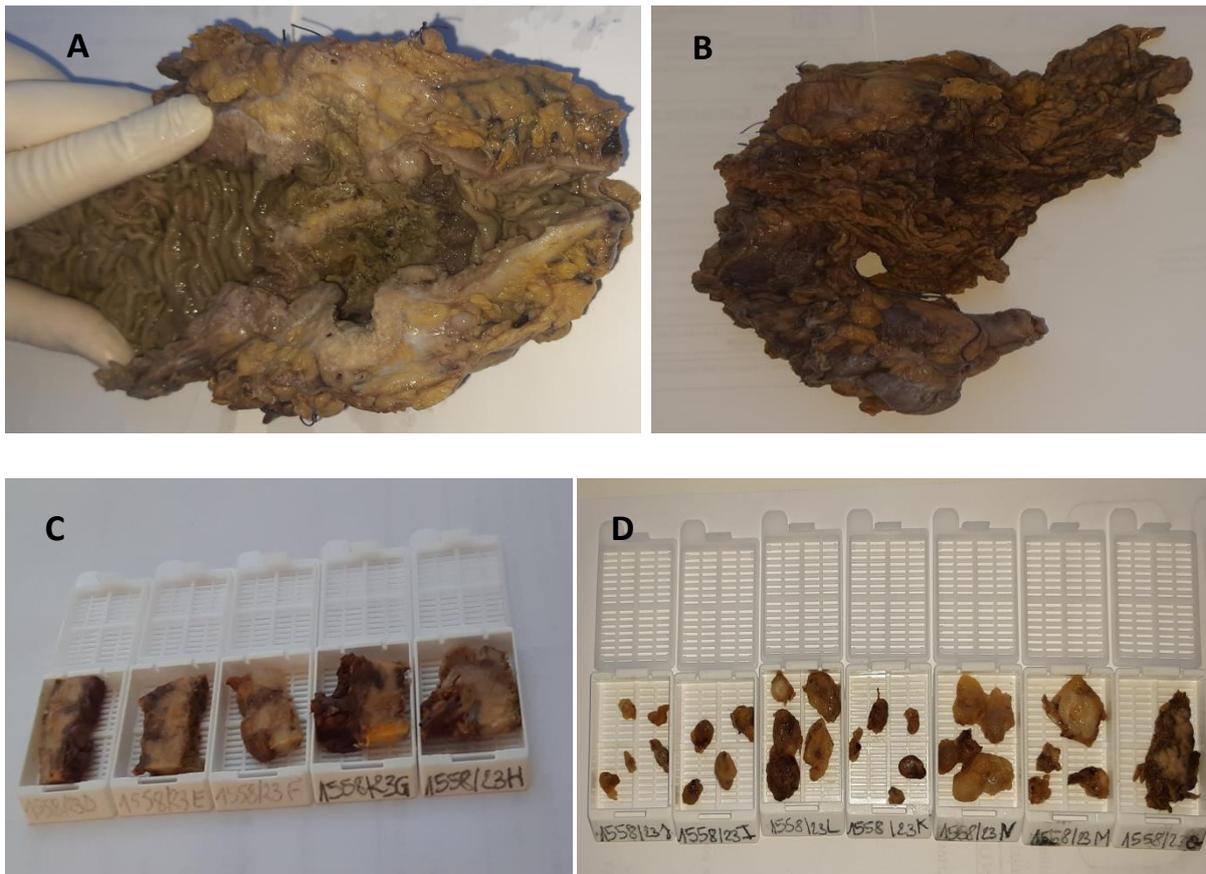


Figure 23 : Pièce opératoire (A, B) de 48cm du colon transverse prélèvement mis en cassette, Prélèvement de la masse tumorale (C), Prélèvement de ganglions lymphatiques (D) (Photos originales).

II.4- Etude histologique :

A) La déshydratation :

Afin de préparer les prélèvements tissulaires pour une bonne inclusion à la paraffine qui permettrait d'avoir la possibilité d'obtenir des coupes histologiques nettes, une étape de déshydratation est nécessaire. Les cassettes sont mises dans un portoir que nous introduisons dans un automate de déshydratation qui dispose de 12 stations (Annexe 4), pendant 18 heures.

B) L'enrobage :

L'enrobage n'est rien d'autre que l'inclusion et l'imprégnation des prélèvements après leur déshydratation, dans des blocs de paraffine, et cela a été réalisé au niveau de la station d'enrobage (Annexe 4).

C) Confection des coupes :

Après le dégrossissement, le microtome est ajusté 3 μm d'épaisseur afin d'avoir des coupes tissulaires très minces.

D) Coloration hématoxyline-éosine (HE) :

La coloration H&E permet de visualiser les principaux constituants cellulaires et cela en colorant le cytoplasme en rose par l'éosine et le noyau en bleu par l'hématoxyline. Le mode opératoire détaillé de la coloration H&E des coupes est précisé dans l'annexe 5.

E) Montage des lames :

Le montage est un procédé primordial pour l'étape de l'observation au microscope. Pour cela, une goutte d'Eukit est déposée sur chacune des lames. Une lamelle y est déposée délicatement avec la pince, puis les lames ont été séchées sous hotte (**Annexe 6**).

II.5- Etude microscopique :

L'examen microscopique est réalisé par un médecin pathologiste, qui effectue une lecture ainsi qu'une interprétation des lames après leur observation sous un microscope optique, et cela dans le but d'avoir un diagnostic exact du cancer. Vers la fin, l'ensemble des renseignements obtenus à partir de l'étude macroscopique et microscopique vont être rédigé sous forme d'un compte rendu descriptif intitulé compte rendu d'anapathologie (**Annexe 7**).

III- Etude moléculaire :**III.1- Matériels et Réactifs : (Annexe 8)****III.2- Méthodes :****III.2.1- Extraction de l'ADN à partir d'un tissu colique fixé au formole et à la paraffine (FFPE) :**

Dans cette étude, nous avons tenté de cibler une mutation au niveau du gène KRAS. Pour cela, une extraction de l'ADN a été réalisée à partir des tissus paraffinés (FFPE) selon le protocole de [Pikor et al. \(2011\)](#) et [Boukhari, \(2014\)](#) avec modifications.

Avant d'entamer les étapes d'extraction d'ADN, il a été impératif de préparer toutes les solutions requises du protocole tel que détaillé dans l'**Annexe 9**.

Des blocs de tissus tumoraux coliques enrobés de paraffine ont été récupérés au sein du laboratoire d'anatomie et cytopathologie du CHU de Bejaia. En utilisant un microtome semi-automatique, nous avons découpé des sections de 10 μ m à partir de ces blocs. Par la suite, les sections ainsi obtenues ont été délicatement placées à l'intérieur de tubes Eppendorf de 1,5 ml bien étiquetés (**Annexe 10**).

Des étapes de déparaffinage et de réhydratation ont été réalisées au préalable avant d'entamer l'étape d'extraction de l'ADN.

A) Le déparaffinage :

Le déparaffinage a été réalisé suite à un lavage au xylène. 800 μ l de xylène ont été ajoutés à chaque tube sous hotte, mélangé par retournement pendant 15 min, centrifugé pendant 3 min à 14000 rpm. Le surnageant a été éliminé soigneusement, sans perturber le culot cellulaire. Afin d'éliminer totalement la paraffine, ce lavage a été répété 3 fois.

B) La réhydratation :

Elle a été réalisée en trois étapes en utilisant différentes concentrations décroissantes d'alcool éthanoïque. Pour cela, 600 μ l d'éthanol absolu ont été ajoutés à chaque tube. Ces derniers, ont été vortexés et centrifugés à 14000 rpm pendant 3 min, et le surnageant y a été éliminé. Les étapes précédentes ont été répétées avec de l'éthanol à 70% puis à 50%. Après l'élimination de l'éthanol à 50%, les culots cellulaires ont été séchés en tubes renversés, à température ambiante, pendant 5 min.

C) Extraction d'ADN :

L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir des cellules déparaffinées et réhydratées selon les étapes suivantes :

- 315 μ l de tampon de lyse (10 mM Tris, pH 7,5/ 100 mM EDTA, pH 8/ 50 mM NaCl) ont été ajoutés. 5 à 10 μ l de protéinase K (20 mg/ml) ont été additionnés selon la taille du culot cellulaire dans chaque tube. Le tout a été incubé à 55°C pendant 1 h 30 min en vortexant les tubes toutes les 5 à 10 min (Figure 24, A). Après, 100 μ l de NaCl (6 M) ont été ajoutés et vortexés pendant 6 min puis centrifugés (13000 rpm) pendant 10 min (Figure 24, B). Le surnageant (presque 250 μ l/tube), contenant l'ADN a été récupéré dans un nouveau tube Eppendorf de 1,5 ml.

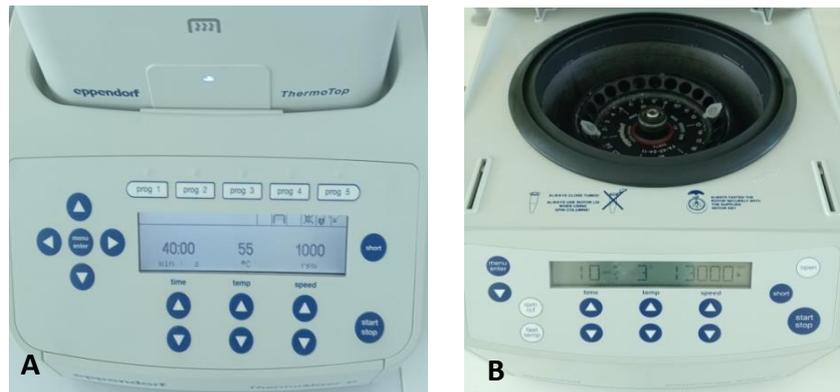


Figure 24 : (A) Incubateur, (B) Centrifugeuse. (Photos originales)

D) Précipitation de l'ADN :

200 μ l d'isopropanol ont été ajoutés au surnageant. Le contenu a été retourné et secoué jusqu'à observation d'une pelote blanchâtre et compacte d'ADN. Les tubes ont été centrifugés 10 min à 13000 rpm afin de culoter la pelote d'ADN, l'isopropanol a été éliminé. 300 μ l d'éthanol (70%) ont été ajoutés au culot d'ADN puis centrifugés quelques secondes. L'éthanol (surnageant) a été éliminé et les culots d'ADN séchés à température ambiante pendant 3 à 5 min afin d'éliminer toutes traces d'éthanol. Les échantillons d'ADN ont été suspendus dans l'eau distillée puis incubés à 50°C pendant 10 min.

L'ADN a été ensuite quantifié, aliquoté et conservé à -20°C jusqu'à usage ultérieur (courte conservation).

E) Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN

Après extraction, l'analyse quantitative et qualitative de l'ADN a été réalisée par mesure de l'absorbance avec un spectrophotomètre BioDrop (Thermo Fisher Scientific) (Figure 25, A). Pour cela, 2 μ L de l'échantillon d'ADN prélevé a été placé dans la cuvette du spectrophotomètre BioDrop (Figure 25, B), Ce dernier donne alors la concentration de l'ADN en μ g/ml, ainsi que la courbe de spectrophotométrie obtenue entre les longueurs d'onde 220nm et 320nm.

L'absorbance mesurée à une longueur d'onde de 260 et 280 nm donne une information sur la pureté des échantillons d'ADN dosé et cela en calculant le rapport d'absorbance 260/280.

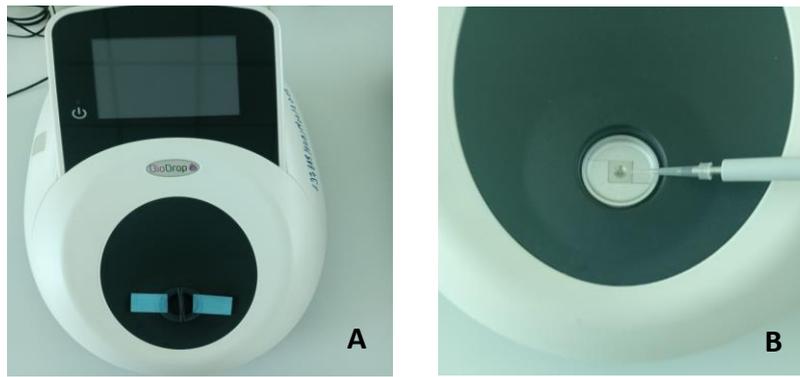


Figure 25 : (A) Spectrophotomètre BioDrop (Thermo Fisher Scientific) (B) La cuvette du spectrophotomètre (photos originales)

III.2.2- PCR (Polymerase Chain Reaction) :

Dans le cadre de la détection d'une mutation du gène KRAS chez les patients atteints de cancer colorectal, une PCR a été réalisée pour assurer une quantité adéquate de fragments d'ADN à analyser ultérieurement avec le système Vilber Lourmat UV Pads. Cette amplification cible spécifiquement la séquence de l'exon 2 du gène KRAS, qui est connue pour présenter des mutations fréquentes dans les cancers colorectaux, notamment au niveau des codons 12 et 13.

Pour cela, deux amorces contrôle de la ACTB (Actine bêta) ont été choisies (Tableau II), et deux amorces KRAS (Tableau II) sélectionnées suite à une recherche bibliographique à partir des études antérieures notamment Sakai, K. et al. (2015) ; Solassol, J. et al. (2011) ; Suzuki, S. I. et al. (2015), puis confirmées à l'aide du logiciel Blast. Une fois les amorces définitivement choisies, elles ont été conçues par le fabricant et envoyées sous forme lyophilisée.

Tableau II. Les amorces utilisées.

Région Amplifié	Amorce Sens (S) et Amorce Anti-Sens (AS) (5'→3')	
Gène Kras Exon 2	S	AAGGCCTGCTGAAAATGACTG
	AS	GTCCTGCACCAGTAATATGC
Gène ACTB Exon	S	CATGTACGTTGCTATCCAGGC
	AS	CTCCTTAATGTCACGCACGAT

Afin d'obtenir une concentration finale de 100pmol/ μ l, les amorces ont été dissoutes dans un volume d'eau sans nucléases (nuclease free water de Ambion), conformément aux indications précisées dans le Tableau en Annexe 11 par le fournisseur des Amorces.

Par la suite, avant d'effectuer la PCR, en suivant les recommandations du protocole du kit de PCR Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity (Annexe 12), les amorces ont été diluées par un facteur de 10 pour atteindre une concentration optimale finale de 10 μ M. Une fois les amorces prêtes à être utilisées, tous les composants ont été ajoutés respectivement dans des tubes de PCR (0.2ml) :

- 1 μ l d'ADN 200 nM
- 2 μ l d'amorce sens KRAS ou bien ACTB
- 2 μ l d'amorce Anti-sens KRAS ou bien ACTB
- 45 μ l du mix (kit de PCR)

L'amplification ciblée de l'ADN par PCR a été effectuée de manière automatisée par le thermocycleur SimpliAmp (Figure 26, A).

Les échantillons contenus dans les tubes de PCR ont été placés dans le bloc thermique du thermocycleur (Figure 26, B), puis le programme de PCR a été lancé (Figure 27).



Figure 26 : (A) Thermocycleur SimpliAmp, (B) le bloc thermique (photos originales).



Figure 27 : Programme de la PCR (photos originales).

III.2.3- Électrophorèse sur gel d'agarose :

Afin d'évaluer l'efficacité et la validité des amorces et leur adéquation et donc démontrer l'efficacité de l'amplification de l'ADN par PCR, une électrophorèse a été effectuée.

100ml d'un gel d'agarose à 4% (Annexe 12) a été préparé et 2 µl de BET (bromure d'éthidium) y ont été rajoutés.

Après sa gélification, le gel d'agarose a été immergé dans un tampon de migration TAE 1x (préparé selon le protocole présenté en annexe 13) et placé dans une chambre à électrophorèse. Dans les puits, le mélange de 10 µl de produits amplifiés avec 1 µl de bleu de chargement ont été déposés soigneusement (Figure 28).

La migration a été initiée en faisant passer un courant de 100 volts jusqu'à migration (Figure 29)

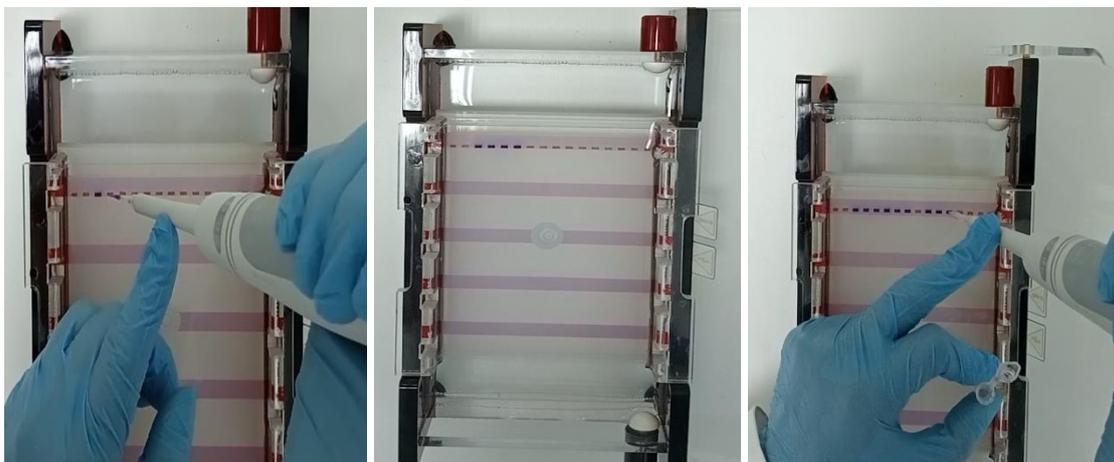


Figure 28 : Dépôt des produits amplifiés dans les puits (photos originales).



Figure 29 : Initiation de la migration (photos originales).

III.2.4- Visualisation des fragments amplifiés par le système Vilber Lourmat UV Pads et détection des mutations Kras :

Une fois la migration électrophorétique terminée, le gel a été séché et placé sur la surface de l'UV Pad du système Vilber Lourmat, et le mode UV a été enclenché afin de prendre les photos. (Figure 30)

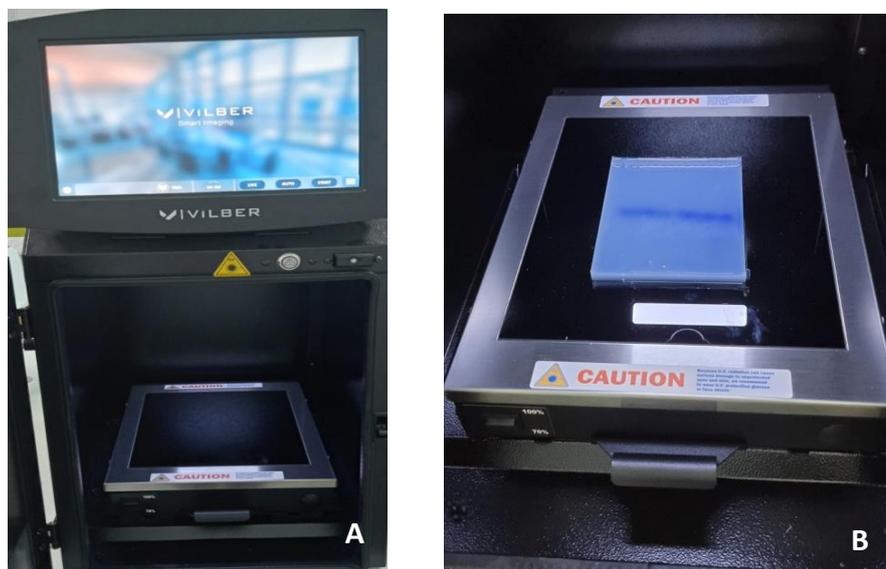


Figure 30 : (A) Le système Vilber Lourmat UV Pads, (B) le gel prêt à être passé sous rayons UV (photos originales).

Chapitre III

Résultats et Discussion

I- Etude épidémiologique :

Nous avons effectué une étude épidémiologique qui s'est étalée de aout 2021 à mars 2023 où nous avons récolté diverses données sur le CCR malgré certaines difficultés rencontrées notamment la présence de lacunes dans les dossiers médicaux ainsi que le manque d'organisation des éléments de certains dossiers, cela nous a contraintes à effectuer un tri préalable afin de remplir correctement les fiches d'enquête.

Nous avons étudié un échantillon de 49 hommes et 36 femmes. (Figure 31) Le CCR représentait 17,58% des cas totaux en 2021 et 16,8% en 2022. Il est donc plus répandu localement qu'au niveau national (11,2%) et mondial (10%) (Globocan, 2020). Cela peut être expliqué par l'échantillon restreint et le manque de données.

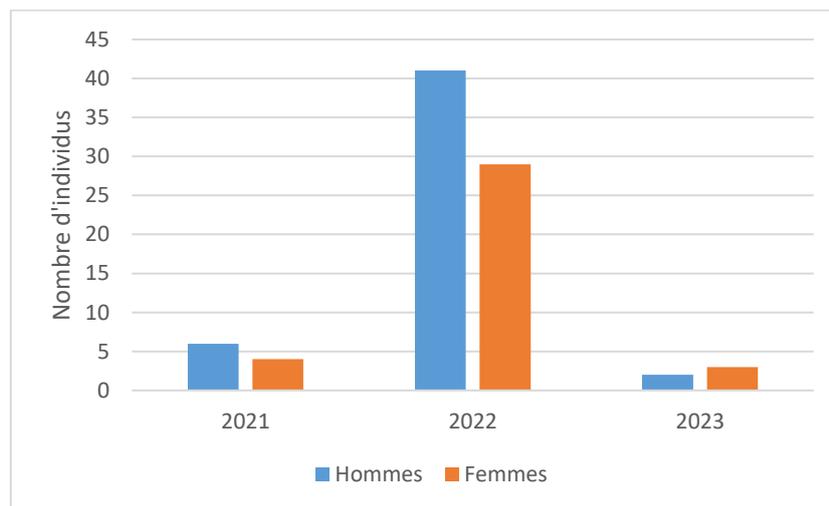


Figure 31 : Histogramme des cas recensés pour chaque sexe par an

Nous observons aussi que la tranche d'âge la plus touchée concerne les 50 à 70 ans avec une prévalence plus précoce chez les hommes que chez les femmes. En effet, nous observons un pic chez les quinquagénaires pour les hommes et chez les sexagénaires pour les femmes (Figure 32). Ces résultats ne sont pas tout à fait en accord avec les données mondiales qui recensent un nombre de cas plus élevé chez les hommes et les femmes de plus de 60 ans avec une augmentation du risque qui est proportionnelle avec l'âge jusqu'à 50ans (Siegel et al., 2023).

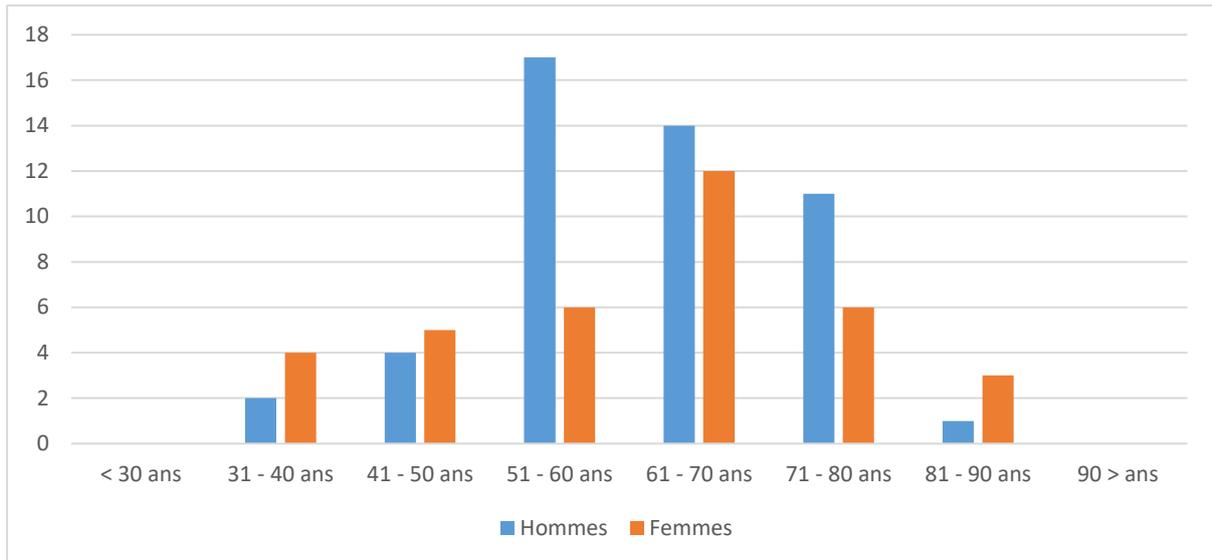


Figure 32 : Histogramme des tranches d'âge des cas recensés pour chaque sexe

L'étude de l'IMC montre que la plupart ont, au moment de l'entretien, une IMC normale, soit inférieure à 25 (Figure 33), mais ils avaient tous signalé un amaigrissement. Nous pouvons donc expliquer cette divergence avec les données statistiques mondiales ([Ma et al., 2013](#)), par un diagnostic tardif.

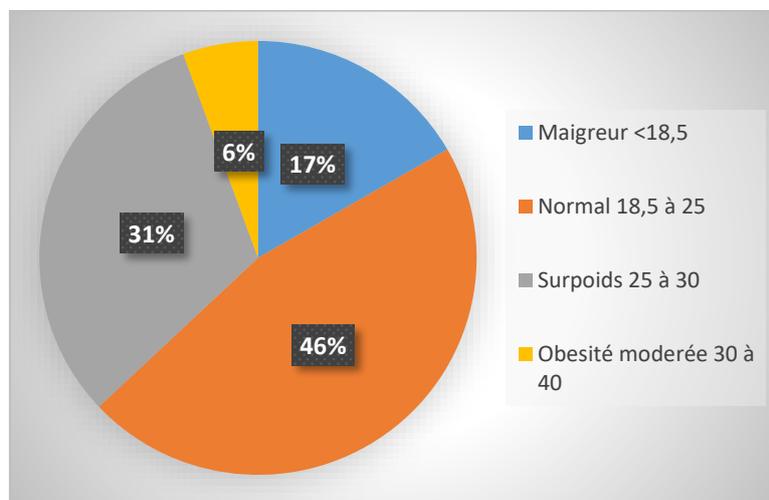


Figure 33 : Répartition des cas selon leur IMC (Indice de Masse Corporelle)

Nous avons également déterminé la localisation primaire des CCR qui est le colon droit suivi par le rectum avec 26,19% et 20,23% respectivement (Figure 34). Les statistiques mondiales sont pour la plupart en désaccord avec ces résultats même si cela dépend grandement de la population étudiée. En effet le CCR touche le plus souvent le rectum et la partie gauche du colon (Peate, 2018). Mais compte tenu du faible nombre de données récoltées il nous est impossible d'avancer avec certitude une quelconque explication.

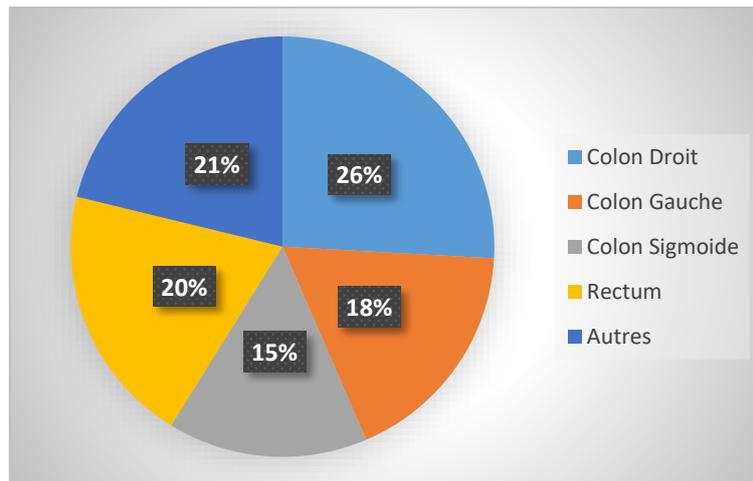


Figure 34 : Répartition des localisations primaires de CCR(cancer colorectal)

L'étude a aussi démontré que 59,52% des CCR étaient métastatiques. Nous pouvons observer que les organes les plus touchés sont le foie et les poumons représentant respectivement 36% et 21% des métastases (Figure 35), ce sont les localisations de métastases de CCR les plus courantes au niveau mondial (Kim et al., 2012).

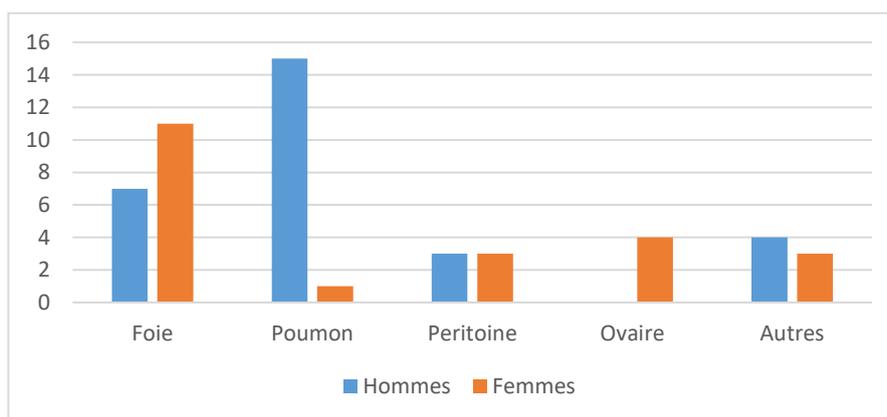


Figure 35 : Histogramme des sièges les plus communs des métastases

D'un point de vue histologique, nous avons trouvé que le type de différenciation le plus commun était l'ADK bien différencié (de bas grade) présent dans 87,05% des cas (Figure 36).

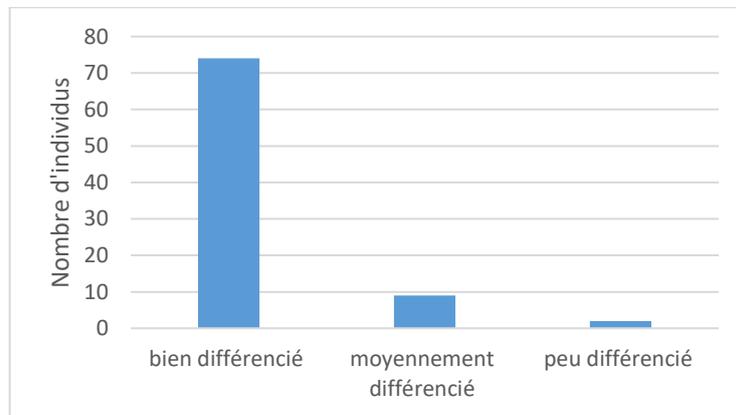


Figure 36 : Histogramme des différentes différenciations des carcinomes.

Nous avons aussi évalué le statut mutationnel de KRAS et avons trouvé que sur les 14 cas testés seule la moitié avait un type muté ce qui représente 8.23% des cas totaux (Figure 37). Avec un échantillon aussi limité il est difficile de faire une comparaison avec les taux mondiaux, cependant le fait que la moitié des cas étudiés soient des KRAS mutés peut indiquer une forte incidence, comme observée au niveau mondial. Effectivement, les études ont démontré que 30% à 40% des CCR sont porteurs d'une mutation au niveau du gène de KRAS (Dinu et al., 2014).

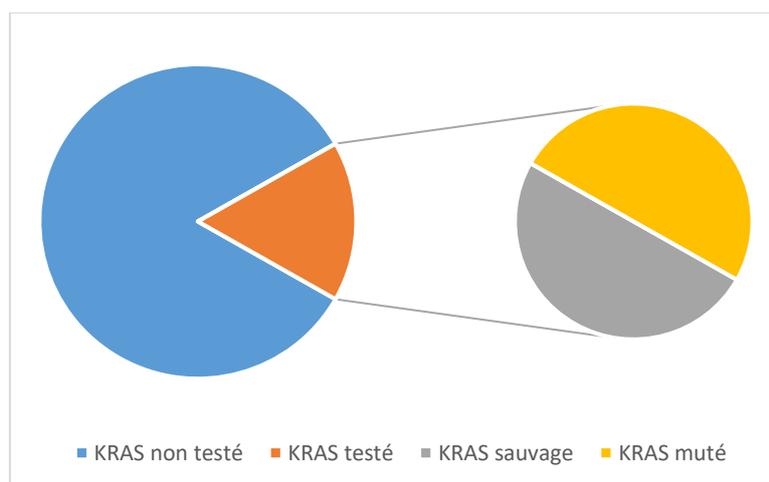


Figure 37 : Répartition des statuts KRAS dans les carcinomes.

II- Étude anatomopathologique :

Des résultats microscopiques variés relatifs à 3 patients diagnostiqués avec un CCR sont présentés dans cette étude.

II.1- Aspects histologiques du CCR :

Dans un épithélium sain (Figure 38), lorsque les glandes sont sectionnées transversalement, la disposition des cellules caliciformes « en champs de marguerites » constitue une structure aisément reconnaissable.

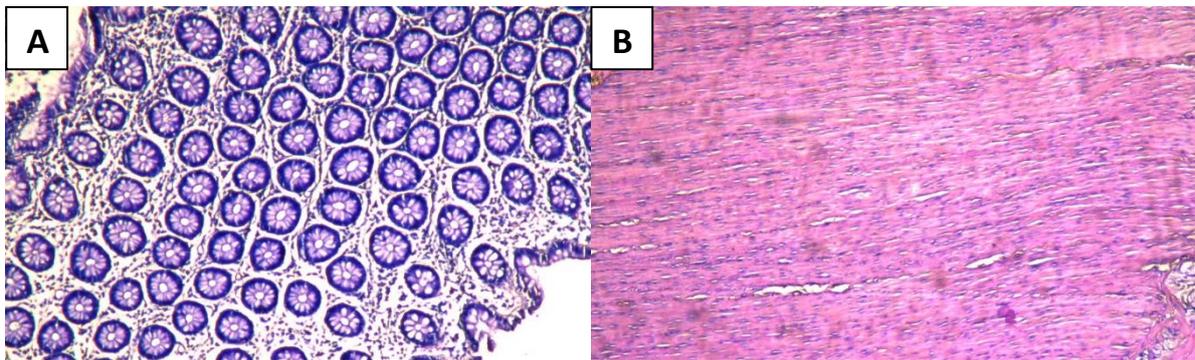


Figure 38 : (A) Aspect histologique d'une muqueuse colique saine (HE, Gx10) (B) Aspect histologique d'une musculature saine (HE, Gx10) (photos originales).

II.1.1- Adénocarcinome bien différencié :

Les cellules cancéreuses bien différenciées présentent une morphologie et un comportement similaires aux cellules saines du tissu d'origine. Les adénocarcinomes colorectaux bien différenciés ont tendance à être moins agressifs et se propagent lentement (Figure 39).

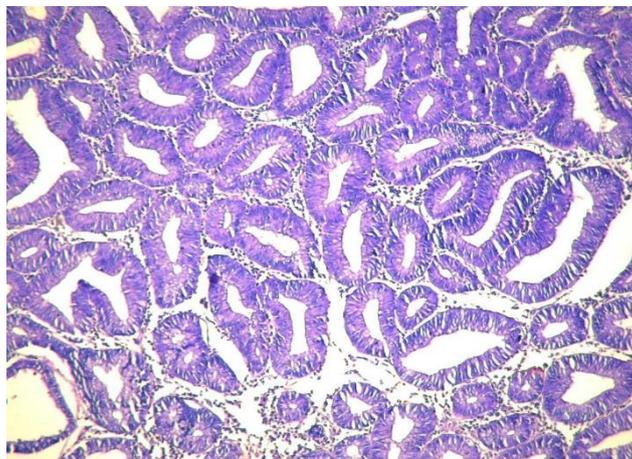


Figure 39 : Aspect histologique d'un adénocarcinome bien différencié. (HE, Gx10) (photos originales)

II.1.2- Adénocarcinome moyennement différencié :

- Les adénocarcinomes colorectaux moyennement différenciés se caractérisent par une altération progressive de l'architecture glandulaire normale de la muqueuse colique, accompagnée d'une prolifération tumorale à cet emplacement (Figure 40).

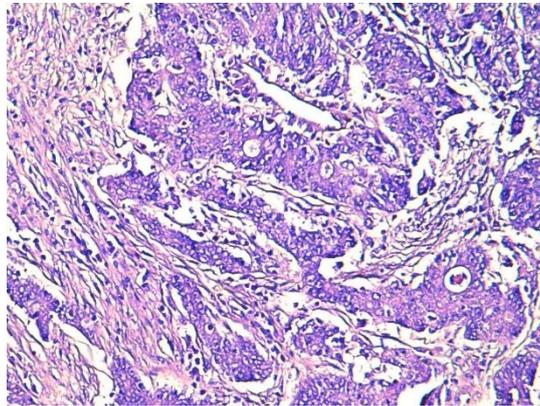


Figure 40 : Aspect histologique d'un adénocarcinome moyennement différencié. (HE, Gx10) (photos originales)

II.1.3- Adénocarcinome peu différencié :

-Les cellules cancéreuses peu différenciées ou indifférenciées ont une apparence et un comportement très différents de ceux des cellules normales (Figure 41). Les adénocarcinomes colorectaux peu différenciés ou indifférenciés sont plus agressifs et se propagent rapidement, ce qui est un signe d'un mauvais pronostic.

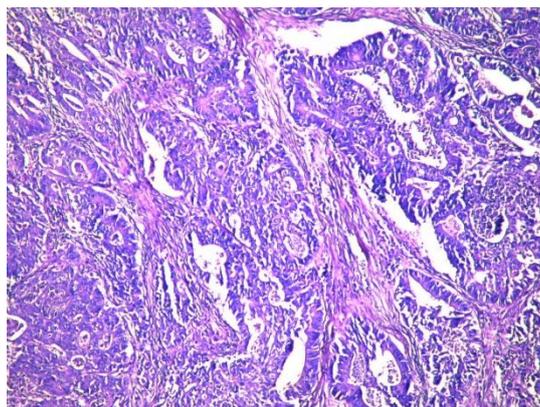


Figure 41 : Aspect histologique d'un adénocarcinome peu différencié. (HE, Gx10) (photos originales)

II.2- Emboles vasculaires :

La présence d'emboles vasculaires témoigne de l'intrusion des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins, augmentant ainsi le risque de dissémination métastatique des cellules cancéreuses dans l'organisme. (Figure 42).

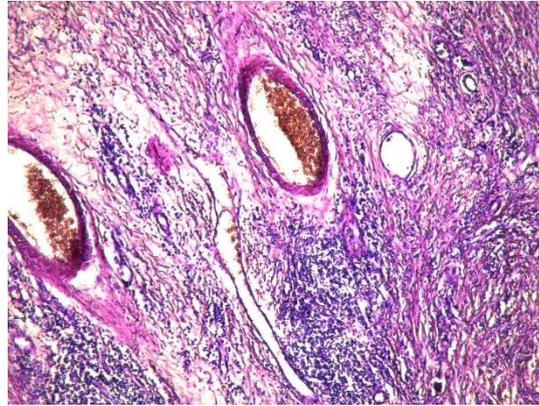


Figure 42 : Aspect histologique d'embolus vasculaire (HE, Gx10). (photos originales).

II.3- Engainements péri-nerveux :

Dans l'éventualité où des cellules tumorales sont retrouvées dans les nerfs, nous parlerons d'engainements péri-nerveux (Figure 43). Ces engainements péri-nerveux sont généralement fréquents et représentent un facteur de risque significatif de récurrence

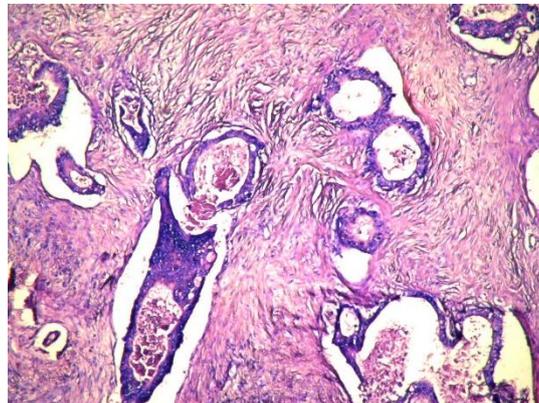


Figure 43 : Aspect histologique d'engainement péri-nerveux (HE, Gx10) (photos originales).

II.4- Les ganglions lymphatiques :

Les ganglions lymphatiques sont dispersés de manière ubiquitaire dans tout l'organisme et jouent un rôle essentiel dans le fonctionnement et l'activation du système immunitaire en présence d'anomalies ou de dangers tels que la présence de cellules anormales, notamment des cellules cancéreuses. (Figure 44).

A des stades avancés, le cancer du côlon s'étend et peut envahir les ganglions lymphatiques voisins en disséminant ses cellules cancéreuses dans ces derniers donnant lieu à des métastases ganglionnaires.

De ce fait, lors de l'examen microscopique, les conclusions suivantes peuvent être tirées :

-L'absence de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques, indique que le cancer est encore localisé au côlon et qu'il ne s'est pas métastasé (N0).

-La présence de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques témoigne d'un stade avancé du cancer, rendant ainsi les chances de survie plus difficiles et complexes.

-La présence de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques témoigne d'un stade avancé du cancer, rendant ainsi les chances de survie plus difficiles et complexes.

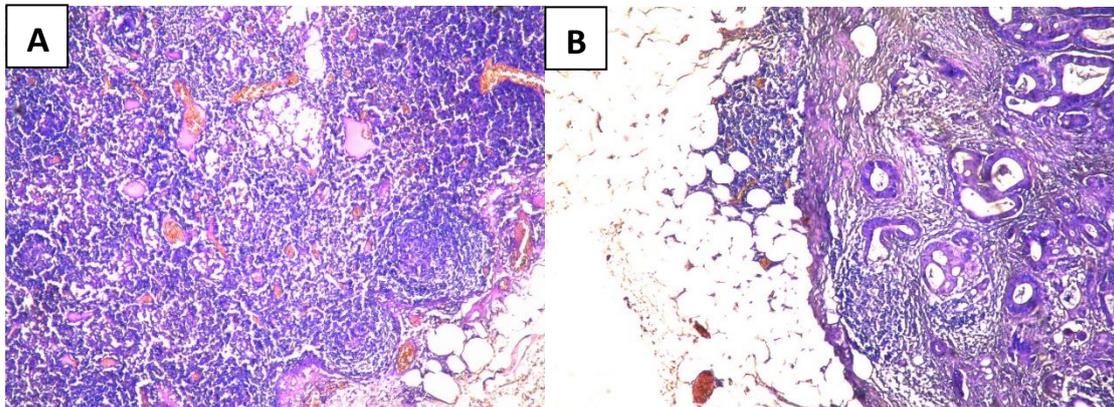


Figure 44 : A. Aspect histologique d'un ganglion lymphatique sain (HE, Gx10), B. Aspect histologique d'un ganglion lymphatique métastatique (HE, Gx10) (photos originales).

III- Etude moléculaire :

III.1. Extraction d'ADN à partir des Tissus FFPE :

Initialement, les extractions de l'ADN ont été entreprises en suivant le protocole original établi par [Pikor et al. \(2011\)](#) et modifié par [Boukhari, \(2014\)](#). Cependant, les résultats obtenus (Figure 45) ont démontré l'absence d'ADN dans tous les échantillons FFPE testés.

En effet, aucun pic n'a été observé à 260nm (Figure 45, B, E), des concentrations très faibles (dues sûrement à des contaminants) ont été obtenues avec des ratios insignifiants. L'extraction de l'ADN à partir des échantillons de tissus FFPE serait considérée comme réussie si les échantillons analysés avec le spectrophotomètre Biodrop présentaient un pic d'absorbance significatif à 260nm, un rapport 260/280 compris entre 1,80 et 2. et des concentrations comprises entre 200 et 800ng/μl.

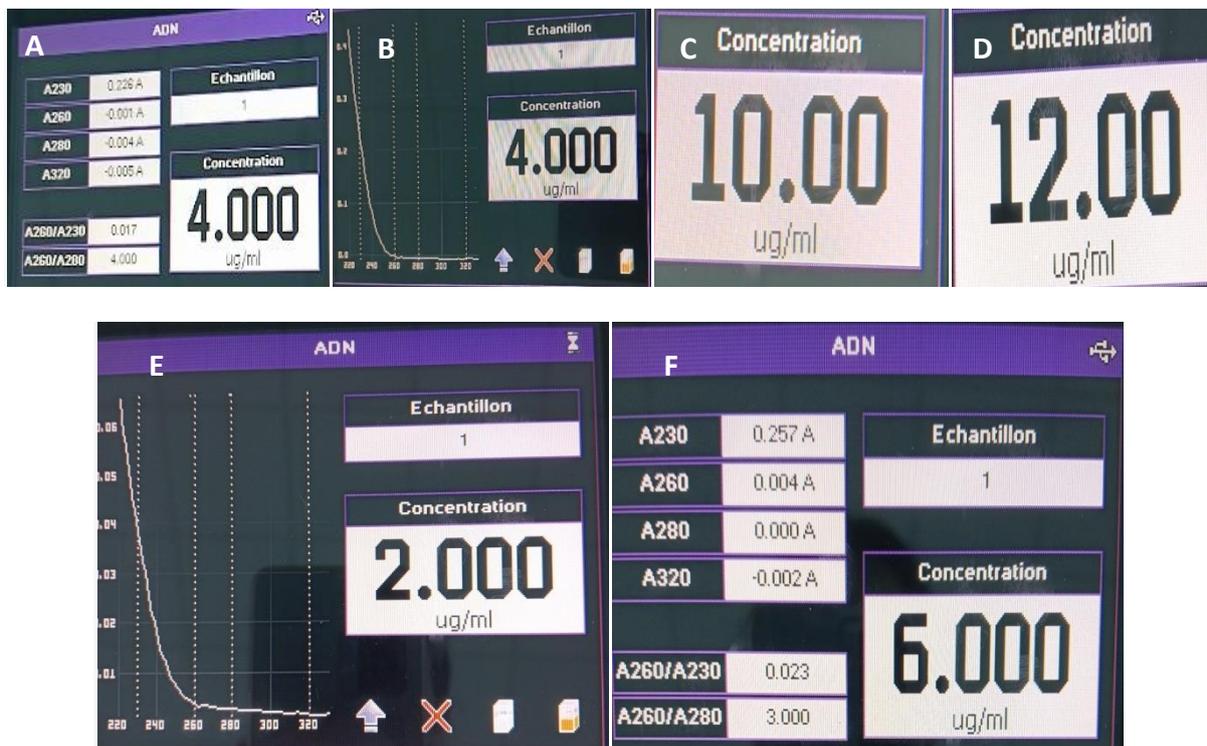


Figure 45 : les résultats de spectrophotométrie : - Absence de pic ; - Concentration en ADN très faible : - Un ratio 260/280 anormalement élevé (photos originales)

D'après une série de tentatives menées à cet égard, il a été corroboré que le processus d'extraction de l'ADN à partir des échantillons de tissus fixés et inclus en paraffine (FFPE) présente des défis significatifs et peut s'avérer complexe à mettre en œuvre. Ceci peut être attribué à diverses raisons et probabilités, notamment :

-un protocole d'extraction inapproprié.

-une très faible quantité d'ADN présente dans l'échantillon initial.

- La fixation des tissus par le formol : le formol étant utilisé pour fixer les tissus afin de préserver leur structure, cependant, son action sur les acides nucléiques engendre de multiples complications et rend l'exploitation des échantillons fixés complexe dans le domaine de la biologie moléculaire. En effet, d'après l'étude menée par [Jun Nakamura et Mai Nakamura en 2020](#), Le formol crée des liaisons covalentes (crosslink) entre l'ADN et des protéines. Ces DPC (DNA-protein crosslinks) sont l'un des types de dommages les plus délétères de l'ADN créant des blocages dans la transcription ainsi que la traduction de l'ADN conférant ainsi à l'ADN une résistance accrue lors des procédures d'extraction et d'amplification ultérieure.

-En outre, selon l'étude faite en 2017 par [Guyard et al](#), ces auteurs ont observé une dégradation significative de l'ADN extrait des mêmes blocs FFPE après 4 à 6 ans de stockage. Ces résultats corroborent ceux de l'étude faite par [Arreaza et al \(2016\)](#) et par [Yi et al \(2020\)](#). De ce fait, plus la durée de fixation est longue et plus ceci entraînera une détérioration accrue ainsi qu'une diminution de la qualité de l'ADN.

- La paraffine a également été identifiée comme étant un problème qui peut affecter l'extraction de l'ADN en raison des restes de cire qu'elle peut laisser, selon [Sengüven et al \(2014\)](#) ces derniers réduisent la pureté de l'ADN extrait.

En conclusion, l'absence d'ADN après l'extraction à partir d'un échantillon de tissu FFPE peut être attribuée à diverses raisons. Ce qui rend ce support d'extraction très complexe et pour cela, afin de remédier à cette situation, plusieurs méthodes et protocoles d'extraction d'ADN ont été développés, notamment l'utilisation de kits commerciaux spécialement conçus pour optimiser les conditions d'extraction d'ADN à partir de tissus FFPE.

Une étude, réalisée en 2015 par [Kocjan et al](#), répertorie 69 kits commerciaux spécifiquement dédiés aux prélèvements FFPE issus de 43 compagnies différentes. Mais seuls 2 ou 3 kits sont extrêmement fiables. Il est à noter que ces derniers sont très onéreux ce qui complique leur utilisation.

Dans la perspective d'améliorer les résultats de l'extraction de l'ADN, nous avons entrepris une réflexion afin de comprendre les faiblesses du protocole initial et de tenter de l'optimiser. Notre première réflexion s'est axée sur la possibilité de ne pas avoir assez d'ADN dans nos échantillons paraffinés. Pour cela deux solutions potentielles se sont présentées à

nous selon les différentes études :ou nous avons mal réalisé le prélèvement en prenant trop de paraffine et en ne délimitant pas assez bien la zone tumorale, pour cela nous avons sélectionné la zone tumorale uniquement et ôté le maximum de paraffine excédant grâce à un bistouri après coupe au microtome en premier lieu (optimisation1), ou nous n'avions pas assez de tissus, pour cela nous avons tenté d'optimiser les résultats obtenus en augmentant carrément la quantité du prélèvement en réalisant des carottes comme ceci a été fait par Pikor et col, en tentant de bricoler un ustensile qui en était capable. En deuxième lieu nous avons donc réalisé des carottes de 2mm de diamètre et 1cm de longueur au niveau de la zone tumorale (optimisation2).

La deuxième réflexion s'est portée sur l'éventualité que le problème résidait dans l'étape de lyse. En premier, des doutes sur la quantité de la protéinase K que nous avons réduit au maximum (à cause de problèmes de disponibilité) et sur le temps d'incubation qui variait d'un auteur à un autre. Pour cela, nous avons entre autre prolongé la période d'incubation à 56°C pendant 3 jours à la place d'une heure et demie avec l'ajout quotidien de 20µl de protéinase K pour assurer une lyse complète du tissu comme il a fallu, selon Pikor, tout réaliser à -20°C.

Les résultats obtenus sont résumés dans la (Figure 46).ont révélé une amélioration significative tant en termes de qualité que de rendement des extractions ce qui se traduit par une efficacité remarquable de l'extraction de l'ADN.

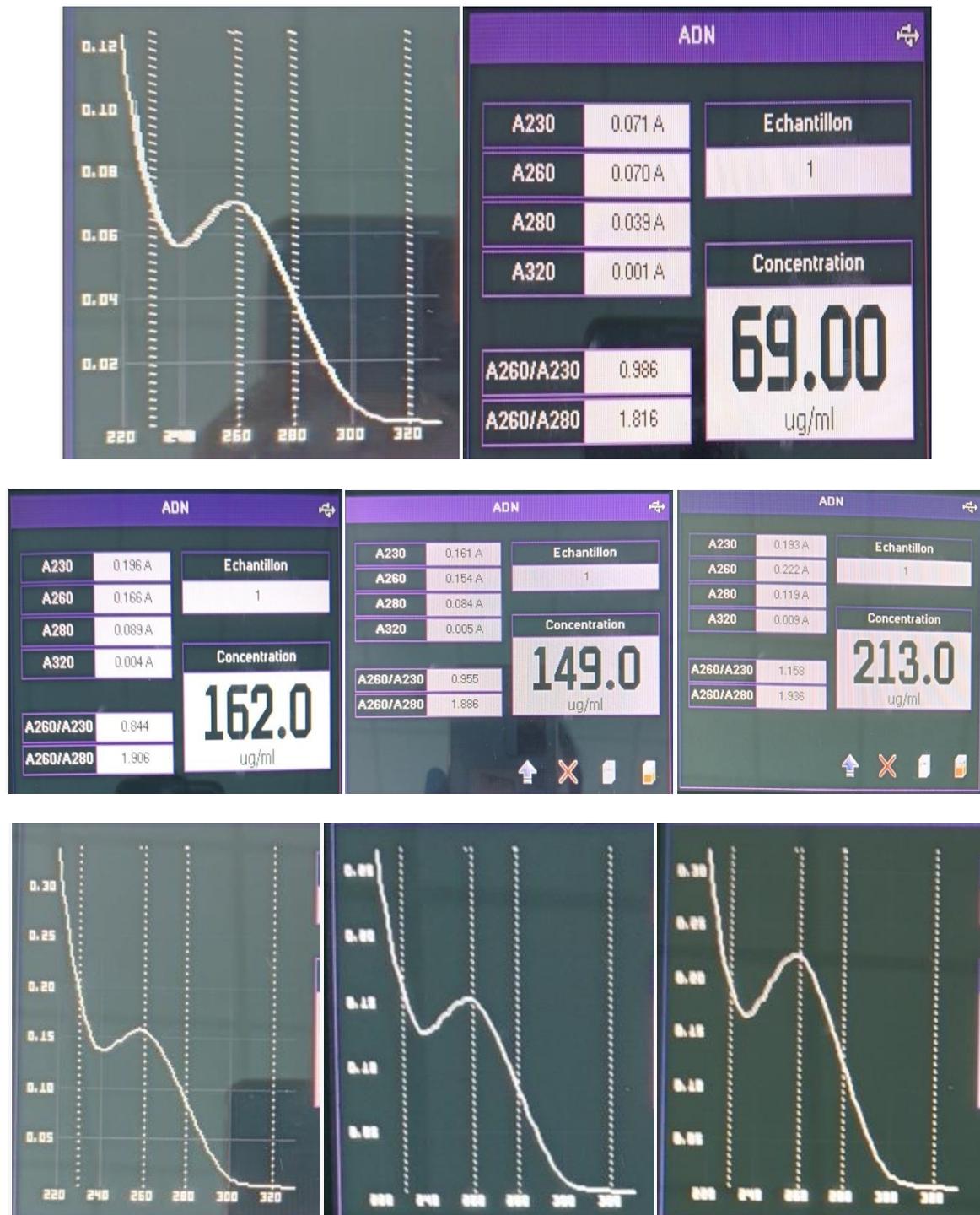


Figure 46 : les résultats de spectrophotométrie : - Présence de pics à la longueur d'onde 260 ;
 - Concentrations en ADN satisfaisantes ; - Ratio 260/280 optimal (Photos originales)

Les résultats obtenus indiquent bien la présence d'ADN et l'absence de contaminants aussi bien dans l'optimisation 1 que 2.

III.2- La PCR :

Tous les échantillons d'ADN extraits ont été soumis à une amplification par PCR en utilisant deux paires d'amorces une pour le KRAS et l'autre pour un témoin, l'ACTB. La première paire encadre un fragment de 21 pb au niveau de l'exon 2 du gène KRAS autour de codant 13, le site étudié. Le deuxième couple encadre un fragment de 21 pb du gène de l'ACTB.

Nous avons ensuite soumis les produits des amplifications à une migration électrophorétique suivie d'une coloration en BET puis d'une visualisation sous UV. Le profil électrophorétique présenté dans la (Figure 47) représente les produits la PCR.

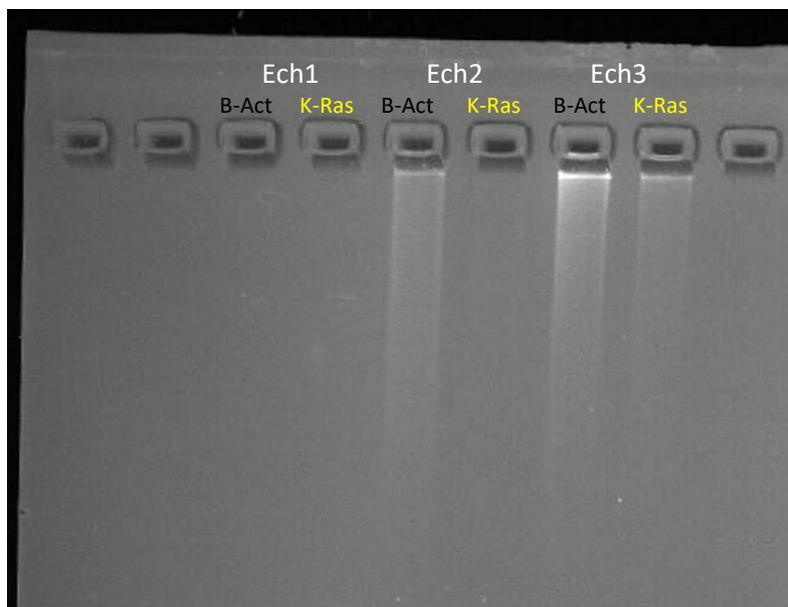


Figure 47: Les produits PCR obtenus après électrophorèse sur gel d'agarose à 4% et coloration au BET suivie d'une visualisation sous UV. Les puits des nombres impairs sont l'ACTD quant aux puits pairs c'est le KRAS. (Photo originale)

Les résultats obtenus montrent que la PCR a échoué, aucune migration n'a eu lieu et de gros amas d'ADN sont restés près des puits. Nous avons plusieurs hypothèses qui pourraient expliquer cela.

La PCR étant préprogrammée il y a de faibles chances que l'erreur soit due à une température inadaptée ou autre.

Tout d'abord la présence d'ADN non hybridé prouve que le problème n'est pas dû à un échec lors de l'extraction mais ça ne prouve pas que la qualité de l'ADN extrait est optimale. Cela est dû à la nature des tissus FFPE et de la difficulté de manipuler l'ADN (souvent endommagé) qu'ils contiennent.

Premièrement nous avons la fixation elle-même qui, si mal faite, peut réduire considérablement la qualité de l'ADN obtenue, que ce soit à cause d'un temps trop long pris entre la chirurgie et la fixation ou la partie de la pièce fixée (tissu gras, vascularisé...), ou à cause d'une sur ou sous fixation. Aussi, des études ont démontré que plus le temps de conservation était long plus la concentration d'ADN extrait était faible (Arreaza *et al.*, 2016 ; Yi *et al.*, 2020) Sauf que, leur particularité, est qu'il est possible de les étudier histologiquement et immuno-histo-chimiquement avant de procéder à une étude génétique ce qui le rend un support de choix dans les études moléculaires en oncologie.

Puis nous avons le formaldéhyde, composant principal du formol, qui est hautement réactif avec les protéines et l'ADN (Figure 48), générant des crosslinks histone-ADN (1), des adhérences formaldéhyde-ADN (2), des crosslinks ADN-protéines (3) et des crosslinks ADN-ADN (4). La formation de l'uracile (5) et la thymine (6), qui résultent de la désamination de la cytosine et du 5-mC, respectivement, sont également présents dans l'ADN FFPE. Des bases de l'ADN sont également perdues, ce qui donne lieu à des sites abasiques (7), et des brins d'ADN sont cassés, ce qui entraîne une fragmentation de l'ADN (8). Le tout provoque des modifications de l'ADN à un taux estimé à une mutation pour 500 bases (Do et Dobrovic, 2015 ; Cazzato *et al.*, 2021) en sachant que notre amorce fait 21 pb.

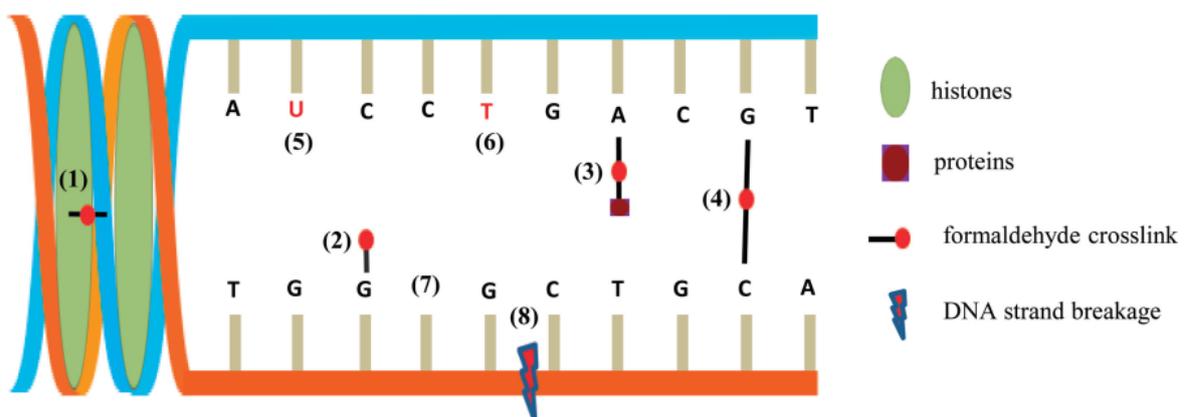


Figure 48 : Les différentes lésions de l'ADN dues au formaldéhyde retrouvées dans les tissus FFPE (Do et Dobrovic, 2015)

Un autre problème qui peut se poser est l'inactivation de la protéinase K, essentielle lors de la lyse, par des résidus de xylène utilisé lors du déparaffinage (Coura *et al.*, 2005). Mais les travaux de Lu *et al.*, (2018) ont démontré que l'extraction d'ADN sur un tissu déparaffiné à la chaleur au lieu du xylène réduisait considérablement le rendu final d'ADN.

Tous ces paramètres rendent la procédure d'extraction et de purification d'ADN depuis des tissus FFPE longue, complexe et pas toujours fiable ce qui a poussé plusieurs laboratoires à mettre au point des kits d'extraction plus fiables qui sont spécifiques à ce type de tissus mais ça reste une solution onéreuse.

- Une autre possibilité est que le problème est plutôt survenu lors de la préparation de la solution de la PCR car l'amplification des deux gènes KRAS et l'ACTB a échoué.

Cela peut donc dire que le problème est dû à une erreur lors du calcul des concentrations qui aurait comme conséquence une quantité trop faible ou trop élevée d'amorces ou d'ADN qui sont des causes courantes de l'échec des PCR. Une optimisation à envisager est de placer plusieurs concentrations différentes d'ADN et d'amorces et d'observer les résultats obtenus pour connaître les concentrations optimales.

- Comme le tampon de PCR est préfabriqué un problème de concentration des dNTPs, de la taqDNA polymérase ou du Mg²⁺ est peu probable, mais le kit ayant été conservé pendant plus de deux ans dans des conditions pas toujours optimales il se peut qu'il soit défectueux. Aussi, une contamination lors de la manipulation n'est pas à exclure.

- La possibilité que l'hybridation n'a pas eu lieu à cause d'une température non adaptée aux deux paires d'amorces est très probable, car leurs TMs sont assez éloignées. Séparer les deux paires dans les blocs du Thermocycleur peut être une solution.

- Une dernière possibilité tout à fait probable est que la PCR fût une réussite mais que le gel de migration trop concentré (4%) a empêché la migration et donc une simple baisse de la concentration à 1% montrerait des bandes de migration.

Conclusion :

L'étude faite sur les dossiers des patients atteints de cancer colorectal au niveau du CHU de la wilaya de Béjaïa, nous a permis d'observer et d'analyser les données épidémiologiques recueillies au cours des deux années précédentes et de les comparer aux tendances mondiales même si notre effectif reste trop restreint pour établir un profil épidémiologique génétique local.

La réussite de l'optimisation d'un protocole d'extraction d'ADN depuis des tissus FFPE ouvre la voie sur l'étude moléculaire du CCR. En effet, cette optimisation a démontré l'importance de bien délimiter la zone de prélèvement, et de réduire au maximum la présence de paraffine. Nous avons aussi noté l'importance de l'étape de digestion à la protéinase K. En effet, la concentration et la durée d'incubation sont deux paramètres essentiels à la réussite de l'extraction. Malgré l'échec de la PCR pour diverses raisons possibles, nous pouvons déjà envisager plusieurs optimisations pour y remédier. Cela nous donnera tout d'abord la possibilité d'établir le statut mutationnel de KRAS localement qui serait une chose inédite jusqu'à présent au niveau du CHU de Béjaïa et donc d'adapter les traitements administrés aux patients

En outre, nous pouvons envisager d'élargir ce processus aux autres gènes tels que BRAF et PI3K pour des traitements plus personnalisés, ou aux gènes impliqués dans les formes héréditaires de façon préventive et évidemment à tous les autres types de cancers et de corréler les résultats avec les données épidémiologiques et faire des études et séquençages à grande échelle.

Références :

A

Al-Sukhni, W., Aronson, M., & Gallinger, S. (2008). Hereditary colorectal cancer syndromes: familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. *Surgical Clinics of North America*, 88(4), 819-844.

Arreaza, G., Qiu, P., Pang, L., Albright, A., Hong, L. Z., Marton, M. J., & Levitan, D. (2016). Pre-analytical considerations for successful next-generation sequencing (NGS): challenges and opportunities for formalin-fixed and paraffin-embedded tumor tissue (FFPE) samples. *International journal of molecular sciences*, 17(9), 1579.

Arvelo, F., Sojo, F., & Cotte, C. (2015). Biology of colorectal cancer. *Ecancermedicalscience*, 9.

B

Barker, N. (2014). Adult intestinal stem cells : Critical drivers of epithelial homeostasis and regeneration. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 15(1), 19-33.

Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9.

Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073–2087.e3.

Boukhari, D. (2014). Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes de réparation de la recombinaison homologue (RAD51, XRCC2 et 3) et risque de cancer du sein chez les femmes Algériennes (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider de Biskra, Département des Sciences de la Nature et de la Vie).

Braicu C, Buse M, Busuioc C, Drula R, Gulei D, Raduly L, Rusu A, Irimie A, Atanasov AG, Slaby O, et al. (2019). A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*. 2019; 11(10):1618.

Burt, MD, R. W., DiSario, MD, J. A., & Cannon-Albright, Ph. D, L. (1995). Genetics of colon cancer: impact of inheritance on colon cancer risk. *Annual review of medicine*, 46(1), 371-379.

C

Calvert, P. M., & Frucht, H. (2002). The genetics of colorectal cancer. *Annals of internal medicine*, 137(7), 603-612.

Cazzato, G., Caporusso, C., Arezzo, F., Cimmino, A., Colagrande, A., Loizzi, V., Cormio, G., Lettini, T., Maiorano, E., Scarcella, V. S., Tarantino, P., Marrone, M., Stellacci, A., Parente, P., Romita, P., De Marco, A., Venerito, V., Foti, C., Ingravallo, G., Rossi, R., ... Resta, L. (2021). Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Samples for Next Generation Sequencing: Problems and Solutions. *Genes*, 12(10), 1472.

Chakrabarti, S., Peterson, C. Y., Sriram, D., & Mahipal, A. (2020). Early stage colon cancer: Current treatment standards, evolving paradigms, and future directions. *World journal of gastrointestinal oncology*, 12(8), 808–832.

Chao, A., Thun, M. J., Connell, C. J., McCullough, M. L., Jacobs, E. J., Flanders, W. D., ... & Calle, E. E. (2005). Meat consumption and risk of colorectal cancer. *Jama*, 293(2), 172-182.

Coura, R., Prolla, J. C., Meurer, L., & Ashton-Prolla, P. (2005). An alternative protocol for DNA extraction from formalin fixed and paraffin wax embedded tissue. *Journal of Clinical Pathology*, 58(8), 894-895.

D

De Roock, W., De Vriendt, V., Normanno, N., Ciardiello, F., & Tejpar, S. (2011). KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer. *The lancet oncology*, 12(6), 594-603.

De Rosa, M., Pace, U., Rega, D., Costabile, V., Duraturo, F., Izzo, P., & Delrio, P. (2015). Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer. *Oncology reports*, 34(3), 1087-1096.

Dinu, D., Dobre, M., Panaitescu, E., Bîrlă, R., Iosif, C., Hoara, P., Caragui, A., Boeriu, M., Constantinoiu, S., & Ardeleanu, C. (2014). Prognostic significance of KRAS gene mutations in colorectal cancer--preliminary study. *Journal of medicine and life*, 7(4), 581–587.

Do, H., & Dobrovic, A. (2015). Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clinical chemistry*, 61(1), 64-71.

E

Esteller, M. (2002). CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*, 21(35), 5427–5440.

F

Fearon, E. R. (2011). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 6, 479-507.

Fedirko, V., Tramacere, I., Bagnardi, V., Rota, M., Scotti, L., Islami, F., ... & Jenab, M. (2011). Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an overall and dose–response meta-analysis of published studies. *Annals of oncology*, 22(9), 1958-1972.

G

Gallot, D. (2006). Anatomie chirurgicale du côlon. EMC Tech Chir Appar Dig, 1, 1-8.

Globocan (2020). [Internet].

González-Flores, E., Hernández, R., Álvarez, P. J., Cabeza, L., Perazzoli, G., Zafra, I., ... & Rama, A. R. (2018). DNA methylation patterns as molecular biomarkers: an overview in colorectal cancer. *Eur J Anat*, 22(4), 303-16.

Grady, W. M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer and metastasis reviews*, 23, 11-27.

Guyard, A., Boyez, A., Pujals, A., Robe, C., Tran Van Nhieu, J., Allory, Y., ... & Leroy, K. (2017). DNA degrades during storage in formalin-fixed and paraffin-embedded tissue blocks. *Virchows Archiv*, 471, 491-500.

H

Hagland, H. R., Berg, M., Jolma, I. W., Carlsen, A., & Søreide, K. (2013). Molecular pathways and cellular metabolism in colorectal cancer. *Digestive surgery*, 30(1), 12–25.

Haigis, K. M., Kendall, K. R., Wang, Y., Cheung, A., Haigis, M. C., Glickman, J. N., ... & Jacks, T. (2008). Differential effects of oncogenic K-Ras and N-Ras on proliferation, differentiation and tumor progression in the colon. *Nature genetics*, 40(5), 600-608

Harrison, S., & Benziger, H. (2011). The molecular biology of colorectal carcinoma and its implications: a review. *The surgeon*, 9(4), 200-210.

Hossain, M. S., Karuniawati, H., Jairoun, A. A., Urbi, Z., Ooi, D. J., John, A., ... & Hadi, M. A. (2022). Colorectal cancer: a review of carcinogenesis, global epidemiology, current challenges, risk factors, preventive and treatment strategies. *Cancers*, 14(7), 1732.

Huizinga, J. D., & Daniel, E. E. (1991). Motor functions of the colon. *The Large Intestine: Physiology, Pathophysiology and Disease*, 93-114.

Huxley, R. R., Ansary-Moghaddam, A., Clifton, P., Czernichow, S., Parr, C. L., & Woodward, M. (2009). The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *International journal of cancer*, 125(1), 171-180.

Hyun, S., & Shin, D. (2021). Small-molecule inhibitors and degraders targeting KRAS-driven cancers. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12142.

J

Jiang, Zhitao & Cao, Qianyu & Dai, Guoliang & Wang, Jianchun & Liu, Chundi & Lv, Lingyan & Pan, Jinhua. (2019). Celestrol inhibits colorectal cancer through TGF- β 1/Smad signaling. *OncoTargets and Therapy*. Volume 12. 509-518.

Jung, Y.-S., & Park, J.-I. (2020). Wnt signaling in cancer : therapeutic targeting of Wnt signaling beyond β -catenin and the destruction complex. *Experimental & Molecular Medicine*, 52(2), 183–191.

K

Kaz, A. M., & Brentnall, T. A. (2006). Genetic testing for colon cancer. *Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology*, 3(12), 670-679.

Keum, N., & Giovannucci, E. (2019). Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 16(12), 713-732.

Kheirelseid, E. A., Miller, N., & Kerin, M. J. (2013). Molecular biology of colorectal cancer: Review of the literature.

Kim, S. K., Lee, C. H., Lee, M. R., & Kim, J. H. (2012). Multivariate Analysis of the Survival Rate for Treatment Modalities in Incurable Stage IV Colorectal Cancer. *Journal of the Korean Society of Coloproctology*, 28(1), 35–41.

Kocjan, B. J., Hosnjak, L., & Poljak, M. (2015). Commercially available kits for manual and automatic extraction of nucleic acids from formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Acta Dermatovenerol Alp Pannonica Adriat*, 24(3), 47-53.

Krasteva, N., & Georgieva, M. (2022). Promising Therapeutic Strategies for Colorectal Cancer Treatment Based on Nanomaterials. *Pharmaceutics*, 14(6), 1213.

Kumar, R., & Lewis, C. R. (2020). Colon cancer screening. In StatPearls [Internet]. *StatPearls Publishing*.

L

Labianca, R., Beretta, G. D., Kildani, B., Milesi, L., Merlin, F., Mosconi, S., ... & Wils, J. (2010). Colon cancer. *Critical reviews in oncology/hematology*, 74(2), 106-133.

Larsson, S. C., Orsini, N., & Wolk, A. (2005). Diabetes mellitus and risk of colorectal cancer: a meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*, 97(22), 1679-1687.

László, L., Kurilla, A., Takács, T., Kudlik, G., Koprivanacz, K., Buday, L., & Vas, V. (2021). Recent updates on the significance of KRAS mutations in colorectal cancer biology. *Cells*, 10(3), 667.

Lu, X. D., Liu, K. Y., Zhu, Y. S., Cui, C., & Poh, C. F. (2018). Using ddPCR to assess the DNA yield of FFPE samples. *Biomolecular detection and quantification*, 16, 5-11.

M

Ma, Y., Yang, Y., Wang, F., Zhang, P., Shi, C., Zou, Y., & Qin, H. (2013). Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PloS one*, 8(1), e53916.

Markowitz, S. D., & Bertagnolli, M. M. (2009). Molecular basis of colorectal cancer. *New England journal of medicine*, 361(25), 2449-2460.

McQuade, R. M., Stojanovska, V., Bornstein, J. C., & Nurgali, K. (2017). Colorectal Cancer Chemotherapy: The Evolution of Treatment and New Approaches. *Current medicinal chemistry*, 24(15), 1537–1557.

N

Nagathihalli, Nagaraj & Datta, Pran. (2010). Targeting the Transforming Growth Factor- β Signaling Pathway in Human Cancer. *Expert opinion on investigational drugs*, 19, 77-91.

Nakamura, J., & Nakamura, M. (2020). DNA-protein crosslink formation by endogenous aldehydes and AP sites. *DNA repair*, 88, 102806.

Negrichi, S., & Taleb, S. (2021). Hereditary, environmental, and dietary risk factors of colorectal cancer: a case-control study in the Algerian East. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(10), 12372-12381.

P

Pacal, I., Karaboga, D., Basturk, A., Akay, B., & Nalbantoglu, U. (2020). A comprehensive review of deep learning in colon cancer. *Computers in Biology and Medicine*, 126, 104003.

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

Papadatos-Pastos, D., Rabbie, R., Ross, P., & Sarker, D. (2015). *The role of the PI3K pathway in colorectal cancer. Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 94(1), 18–30.

Peate, I. (2018) Colorectal cancer. *British Journal of Healthcare Assistants* 2018 12:11, 530-535.

Pender, A., Garcia-Murillas, I., Rana, S., Cutts, R. J., Kelly, G., Fenwick, K., Kozarewa, I., Gonzalez de Castro, D., Bhosle, J., O'Brien, M., Turner, N. C., Popat, S., & Downward, J. (2015). Efficient Genotyping of KRAS Mutant Non-Small Cell Lung Cancer Using a Multiplexed Droplet Digital PCR Approach. *PloS one*, 10(9), e0139074.

Pikor, L. A., Enfield, K. S., Cameron, H., & Lam, W. L. (2011). DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *Journal of visualized experiments : JoVE*, (49), 2763.

Pitolli, C., Wang, Y., Candi, E., Shi, Y., Melino, G., & Amelio, I. (2019). p53-mediated tumor suppression: DNA-damage response and alternative mechanisms. *Cancers*, 11(12), 1983.

R

Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M. T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G. S., & Ranieri, E. (2021). The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review. *Cancers*, 13(16), 3949.

Rentsch, M., Schiergens, T., Khandoga, A., & Werner, J. (2016). Surgery for Colorectal Cancer - Trends, Developments, and Future Perspectives. *Visceral medicine*, 32(3), 184–191.

Rossi, M., Jahanzaib Anwar, M., Usman, A., Keshavarzian, A., & Bishehsari, F. (2018). Colorectal cancer and alcohol consumption—populations to molecules. *Cancers*, 10(2), 38.

S

Sakai, K., Tsurutani, J., Yamanaka, T., Yoneshige, A., Ito, A., Togashi, Y., ... & Nishio, K. (2015). Extended RAS and BRAF mutation analysis using next-generation sequencing. *PLoS one*, 10(5), e0121891.

Sengüven, B., Baris, E., Oygur, T., & Berktaş, M. (2014). Comparison of methods for the extraction of DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded archival tissues. *International journal of medical sciences*, 11(5), 494.

Siegel, RL, Wagle, NS, Cercek, A, Smith, RA, Jemal, A. (2023) Colorectal cancer statistics., *CA Cancer J Clin*. 2023; 73(3): 233-254.

Solassol, J., Ramos, J., Crapez, E., Saifi, M., Mangé, A., Vianès, E., ... & Maudelonde, T. (2011). KRAS mutation detection in paired frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) colorectal cancer tissues. *International journal of molecular sciences*, 12(5), 3191-3204.

Stoker, J. (2009). Anorectal and pelvic floor anatomy. *Best practice & research Clinical gastroenterology*, 23(4), 463-475.

Stevens A., Lowe J. (2006). Histologie humaine. 3 ème Ed, DE BOECK, 345 p.

Suzuki, S. I., Matsusaka, S., Hirai, M., Shibata, H., Takagi, K., Mizunuma, N., & Hatake, K. (2015). A novel approach to detect KRAS/BRAF mutation for colon cancer: Highly sensitive

simultaneous detection of mutations and simple pre-treatment without DNA extraction. *International Journal of Oncology*, 47(1), 97-105.

T

Tieng, F. Y. F., Abu, N., Lee, L. H., & Ab Mutalib, N. S. (2021). Microsatellite instability in colorectal cancer liquid biopsy—current updates on its potential in non-invasive detection, prognosis and as a predictive marker. *Diagnostics*, 11(3), 544.

U

Université de Montpellier (2023). [Internet].

V

Voronov, E., & Apte, R. N. (2015). IL-1 in colon inflammation, colon carcinogenesis and invasiveness of colon cancer. *Cancer microenvironment*, 8, 187-200.

W

Wyllie, R., Hyams, J. S., & Kay, M. (2020). Pediatric gastrointestinal and liver disease E-Book. Elsevier Health Sciences.

X

Xie, YH., Chen, YX. & Fang, JY. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Sig Transduct Target Ther* 5, 22.

Y

Yang, J., Nie, J., Ma, X., Wei, Y., Peng, Y., & Wei, X. (2019). Targeting PI3K in cancer: mechanisms and advances in clinical trials. *Molecular cancer*, 18(1), 26.

Yi, Q. Q., Yang, R., Shi, J. F., Zeng, N. Y., Liang, D. Y., Sha, S., & Chang, Q. (2020). Effect of preservation time of formalin-fixed paraffin-embedded tissues on extractable DNA and RNA quantity. *Journal of International Medical Research*, 48(6), 0300060520931259.

Z

Zhang, Y., & Wang, X. (2020). Targeting the Wnt/ β -catenin signaling pathway in cancer. *Journal of hematology & oncology*, 13, 1-16.

Zhu, G., Pei, L., Xia, H., Tang, Q., & Bi, F. (2021). Role of oncogenic KRAS in the prognosis, diagnosis and treatment of colorectal cancer. *Molecular cancer*, 20(1), 1-17

Annexes :

Annexe 1 Classification des stades d'une tumeur

TNM	
T-primary tumor	
TX	Primary tumor cannot be assessed
T0	No evidence of primary tumor
T1	Tumor invades mucosa or submucosa T1a size <1 cm T1b size 1–2 cm
T2	Tumor invades muscularis propria or size >2 cm
T3	Tumor invades subserosa/pericolic/perirectal fat
T4	Tumor directly invades other organs/structures and/or perforates visceral peritoneum
For any T add (m) for multiple tumors	
N-regional lymph nodes	
NX	Regional lymph node status cannot be assessed
N0	No regional lymph node metastasis
N1	Regional lymph node metastasis
M-distant metastases (subspecification as in small bowel)	
MX	Distant metastasis cannot be assessed
M0	No distant metastases
M1 ^a	Distant metastasis

Annexe 2 matériels et produits utilisés en anatomopathologie

Matériels	Produits
<ul style="list-style-type: none"> -Hotte. -Cassettes. -Portoir. - automate de déshydratation. -Station d'enrobage. -Pince. - Moules métalliques. - Microtome. - Compresses. -bain marie à 37°C. -plaque chauffante. -Aiguilles. - Lames - Porte lames. - Etuve - Cuves à coloration. - Lamelles. - Microscope optique. 	<ul style="list-style-type: none"> -Fixateur : aldéhyde formique (le formol). -Alcool (éthanol). -Xylène. -Paraffine. --Eau distillée. -Colorants :(Eosine/Hématoxyline). -Milieu de montage : Eukit.

Annexe 3 Station d'enrobage



Annexe 4 Microtome



N° :.....

EXAMEN MICROSCOPIQUE :

• **Prolifération tumorale :**

- Type histologique :
-
-
- Grade :
- Les atypies cytonucléaires :
- Autre contingent associé :
- Stroma tumoral :
- Embole vasculaire : Oui Non :
- Embole lymphatique : Oui Non :
- Infiltration périnerveuse : Oui Non :
- Bourgeonnement tumoral « tumour Budding » : absent présent

• **Résection post traitement néo adjuvant :**

- Grade de régression tumoral : 0 1 2 3 4 5
Selon.....

• **Niveau d'infiltration :**

- Non évaluable (Tx)
- Pas de tumeur (T0)
- Intramuqueux (Tis)
- Sous-muqueuse (T1) sm1 sm2 sm3
- Musculeuse (T2)
- Sous-séreuse (T3)
- Séreuse (T4a) Organe adjacent (T4b)
Lequel :

• **Limites de résection :**

- Proximale : saine infiltrée
- Distale : saine infiltrée
- Circonférentielle : saine infiltrée
- Autre :

• **Extension :**

- Nombre de ganglions prélevés :
- Nombre de ganglions métastatiques :
- *sans effraction capsulaire :
- *avec effraction capsulaire :
- Dépôts tumoraux : Non oui nombre :
- Emboles vasculaires extramuraux : non oui

Annexe 6

Matériels et réactifs utilisés en étude moléculaire.

Matériels utilisés	réactifs
-hotte -Plaque agitatrice -Barreaux magnétiques -PH mètre -Balance -Centrifugeuse -Vortex -incubateur -spectrophotomètre Biodrop -micropipettes -Embouts -Tubes Eppendorf 1.5mL -Tubes PCR 2mL -La verrerie (flacons, éprouvettes, fioles jaugées, verres de montre, pissettes, portoirs, Béchers).	-Tris base -EDTA -NaCl -SDS -HCl -NaOH -Phénol -Chloroforme -Alcool isoamylique -Xylène -Ethanol (100% / 75% / 50%) -Protéinase K -Eau distillée -Isopropanol 100%

Annexe 7

Protocole de préparation des solutions

Solutions	Préparation
	-Les dilutions d'alcool ont été préparées en appliquant l'équation suivante : $C1 \times V1 = C2 \times V2$ Donc : $V1 = C2 \times V2 / C1$
1/ Alcools	*Alcool 70% Préparer l'éthanol à 70% en ajoutant 27.09 ml d'eau distillée à 72.91 ml d'alcool à 96% afin d'avoir un volume final de 100ml. $96 \% \times V1 = 70 \% \times 100\text{ml}$ $V1 = 72.91 \text{ ml alcool } 96\% + 27.09 \text{ ml eau distillée} = 100\text{ml}$
	*Alcool 50 % Préparer en mélangeant 52.08 ml d'alcool à 47.92 ml d'eau distillée.
	* Masse molaire de NaCl : $M = 58.44 \text{ g/mol}$ Afin de préparer un volume de 30 ml de NaCl à 6M :

<p>2/ NaCl 6M</p>	<p> $C = n/V$ $n = C \times V$ Donc : $n = 6 \times 0.03 = 0.18 \text{ mol}$ $n = m / M$ $m = n \times M$ $m = 0.18 \text{ mol} \times 58.44 \text{ g/mol}$ $-m = 10.5192 \text{ g}$ -de ce fait on a mélangé 10.5192 g de NaCl avec 30 ml d'eau distillée. </p>
<p>3/ Tampon de Lyse :</p> <p>-10 mM Tris-HCl pH 7,5</p> <p>-100 mM EDTA, ph 8</p> <p>-50 mM NaCl</p>	<p>La préparation du tampon de lyse s'est fait comme suit :</p> <p>1/d'abord on a commencé à préparer des solutions Stock pour chaque composant du tampon.</p> <p>A- 50ml de solution stock du Tris HCl (0.1M) :</p> <p>*Masse molaire du Tris : $M = 121,14 \text{ g/mol}$</p> <p> $n = c \times v$ $n = 0.1 \text{ M} \times 0.05 \text{ L} = 0.005 \text{ mol}$ $m = n \times M$ $m = 0.005 \text{ mol} \times 121.14 \text{ g/mol} = 0.6057 \text{ g}$ </p> <p>*donc, notre solution stock sera composée de : 0.6057 g de Tris + 50 ml d'eau distillée</p> <p>*On prend alors 0.6057 grammes de Tris et on les dilue dans 40 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH avec du HCl tout en l'agitant sur une plaque agitatrice Quand le Tris va atteindre un pH 7.5, On rajoute les 10 ml d'eau distillée restante afin d'obtenir un volume final de 50 ml.</p> <p>B- 50ml de solution de stock EDTA (0.3 M) :</p> <p>*Masse molaire d'EDTA : $M = 292,2438 \text{ g/mol}$</p> <p> $n = c \times v$ $n = 0.3 \text{ M} \times 0.05 \text{ L} = 0.015 \text{ mol}$ $m = n \times M$ $m = 0.015 \text{ mol} \times 292.24 \text{ g/mol} = 4.3836 \text{ g}$ </p> <p>*donc, notre solution stock sera composée de :</p>

4.3836 g d'EDTA + 50 ml d'eau distillée

*Ajouter 4.3836 grammes d'EDTA à 50 ml d'eau distillée, puis ajuster le pH avec 02 pastilles de NaOH, l'équivalent de 1g, tout en agitant sur une plaque agitatrice.

Lorsque l'EDTA atteint le pH 8, elle se dissout complètement.

C- 100ml de solution de stock NaCl (0.1 M) :

*Masse molaire du NaCl : $M = 58.44 \text{ g/mol}$

$$n = c \times v$$

$$n = 0.1 \text{ M} \times 0.1 \text{ L} = 0.01 \text{ mol}$$

$$m = n \times M$$

$$m = 0.01 \text{ mol} \times 58.44 \text{ g/mol} = 0.5844 \text{ g}$$

***donc, notre solution stock sera composé de :**

0.5844 g de NaCl + 100 ml d'eau distillée

*On prend 0.5844 grammes de NaCl et on les dilue dans 100 ml d'eau distillé tout en l'agitant sur une plaque agitatrice.

2/Par la suite après avoir fini la préparation des solutions stocks, on procède au mélange des 03 réactifs afin d'obtenir 100ml de tampon de lyse.

-dans le but de préparer 100ml de ce tampon, il faudrait d'abord déterminer les volumes qu'on rajoutera de chaque solution stock pour obtenir les concentrations indiquées dans le protocole, et cela a été réalisé en appliquant la loi suivante :

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

***Tris**

C1 : concentration stock Tris (1M) = 100 mM

V1 : volume stock Tris qu'on prendra

C2 : concentration du Tris avec lequel on travaille (10 mM)

V2 : volume du tampon qu'on veut obtenir (100 ml)

Donc :

$$100 \text{ mM} \times V1 = 10 \text{ mM} \times 100 \text{ ml}$$

$$V1 = 10 \text{ ml de Tris}$$

***EDTA**

C1 : concentration stock EDTA (0.3M) = 300 mM

V1 : volume stock EDTA qu'on prendra ??
C2 : concentration de l'EDTA avec lequel on travaille (100 mM)
V2 : volume du tampon qu'on veut obtenir (100 ml)

Donc :
 $300 \text{ mM} \times V1 = 100 \text{ Mm} \times 100 \text{ ml}$

$V1 = 33.33 \text{ ml d'EDTA}$

***Nacl**

C1 : concentration stock NaCl (0.1M) =100 mM
V1 : volume stock NaCl qu'on prendra ??
C2 : concentration du NaCl avec lequel on travaille (50 mM)
V2 : volume du tampon qu'on veut obtenir (100 ml)

Donc :
 $100 \text{ mM} \times V1 = 50 \text{ Mm} \times 100 \text{ ml}$

$V1 = 50 \text{ ml de NaCl}$

-De ce fait notre tampon de lyse sera composé de :

$50 \text{ ml de NaCl} + 33.33 \text{ ml EDTA} + 10 \text{ ml Tris} = 93.33 \text{ ml}$

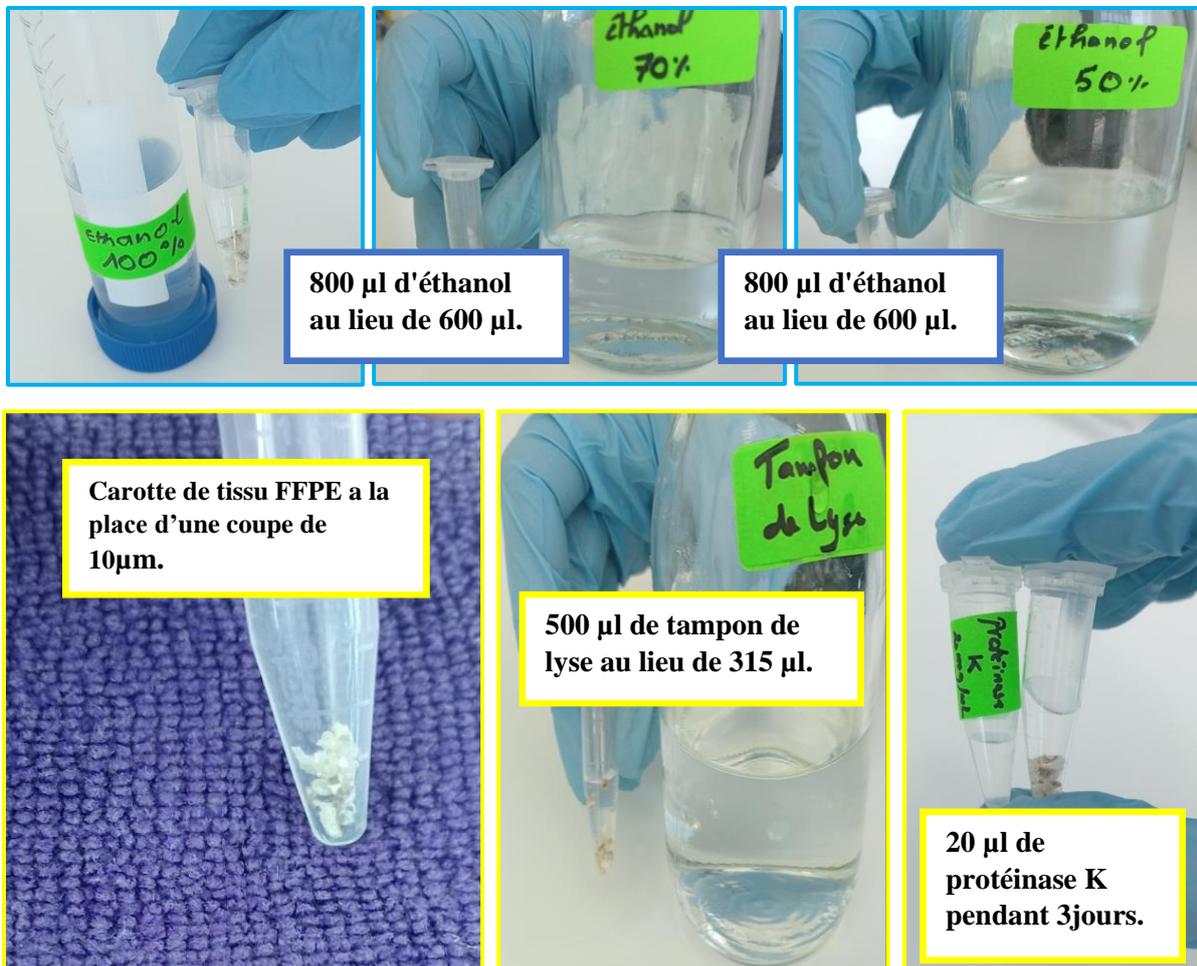
$100 - 93.33 = 6.67$

mélanger les trois solutions et ajouter 6.67 ml d'eau distillée de manière à obtenir un volume final de 100 ml.

- vers la fin, toutes les solutions ont été conservées entre 15 °C et 30 °C.

Annexe 8

Les modifications apportées au protocole d'extraction selon les recommandations de Pikor et al, 2011.



Résumé : Le cancer colorectal (CCR) est le deuxième cancer le plus mortel au monde avec une incidence croissante et son traitement est complexe à cause de tous les facteurs génétiques qui entrent en jeu. A travers notre étude, nous avons analysé diverses paramètres cliniques afin d'établir un profil épidémiologique et pathologique du CCR. Suite à ça, nous avons optimisé un protocole d'extraction d'ADN à partir de tissus FFPE qu'on a utilisé pour étudier le statut mutationnel du gène KRAS dans une tumeur grâce à une PCR. La pertinence de cette étude réside dans le fait que, quand le KRAS est muté la thérapie anti-EGFR devient inefficace.

Mots-Clés : Cancer Colorectal, Epidémiologie du CCR, Extraction d'ADN, Tissus FFPE, KRAS, PCR.

Abstract: Colorectal cancer (CRC) is the second most deadly cancer in the world, with an increasing incidence, and its treatment is complex because of all the genetic factors involved. In our study, we analyzed various clinical parameters to establish an epidemiological and pathological profile of CRC. Following this, we optimized a DNA extraction protocol from FFPE tissue, which we used to study the mutational status of the KRAS gene in a tumor using PCR. The relevance of this study lies in the fact that when KRAS is mutated, anti-EGFR therapy becomes ineffective.

Key words: Colorectal cancer, CRC epidemiology, DNA extraction, FFPE tissue, KRAS, PCR.

ملخص: يعتبر سرطان القولون والمستقيم ثاني أكثر السرطانات فتكاً في العالم، حيث تزداد الإصابة به، وعلاجه معقد بسبب جميع العوامل الوراثية التي ينطوي عليها. في دراستنا، قمنا بتحليل المعلمات السريرية المختلفة لإنشاء ملف وبائي ومرضي. بعد ذلك، قمنا بتحسين بروتوكول استخراج الحمض النووي من أنسجة FFPE، والذي استخدمناه لدراسة الحالة الطفيرية لجين KRAS في الورم باستخدام PCR. تكمن أهمية هذه الدراسة في حقيقة أنه عندما يتم تحور KRAS، يصبح العلاج المضاد لـ EGFR غير فعال.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم، وبائيات CRC، واستخراج الحمض النووي، وأنسجة FFPE، وKRAS، وPCR.