

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur de la Recherche Scientifique
Université A.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 Moléculaire du Cancer Colorectal

Présenté par :

Lina ABZAR

Soutenu le : **13 Septembre 2023**

Devant le jury composé de :

Mme. Ayouni Karima
Mme. Ouahmed Hania
Mme. Mazouzi Chahra
Mme. Ait Ali El djida

MCB
MCB
MCA
MCB

Présidente
Encadreur
Co-Encadreur
Examinatrice

Année universitaire : 2022– 2023

Remerciements

*Je tiens à exprimer mes profonds remerciements à mon enseignante et encadreur, le **Docteur Ouahmed H.**, pour m'avoir guidé et encouragé tout au long de ce travail.*

Sa gentillesse, sa disponibilité, sa patience remarquable et ses judicieux conseils ont été d'une grande aide pour moi et ont grandement contribué à mon avancement. Je lui adresse mes plus hauts respects de m'avoir accordé sa confiance dans la réalisation de ce travail et m'avoir offert une totale liberté dans son exécution. De simples remerciements ne suffisent pas à exprimer toute ma reconnaissance à son égard.

*Je souhaite témoigner de ma gratitude envers le **Docteur Ait ali ES.**, tout d'abord de m'avoir fait le grand honneur d'évaluer mon modeste travail, mais également pour toute l'aide précieuse qu'elle m'a apportée tout au long de mon stage au laboratoire de cancérologie. Elle a consacré son temps, partagé généreusement son vaste savoir, m'a guidée et m'a assistée même au-delà des heures de travail.*

*J'adresse mes sincères remerciements au **Docteur Ayouni K.**, pour avoir accepté de présider le juré de soutenance de ce mémoire. Son enseignement précieux a été pour moi une chance inestimable.*

*Mes remerciements les plus sincères et chaleureux sont également destinés au **docteur Bencharif C.**, et au **professeur Mazouzi C.**, pour m'avoir offert cette inestimable opportunité de réaliser une partie de mon stage au sein de leurs services respectifs, et pour leurs précieuse assistance, disponibilité et gentillesse.*

*Mes remerciements vont également à **Hakima, Luiza** et **Sara** pour leurs soutien constant tout au long de mon stage au laboratoire de cancérologie.*

Enfin, je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail à des personnes très spéciales dans ma vie :

*À Ma grande sœur **Nesrine**, ta présence constante et ton soutien inconditionnel m'ont permis d'avancer et de donner le meilleur de moi-même. Sans toi ce travail n'aurait jamais été meilleure.*

*À **mes parents**, vos encouragements ont été un moteur essentiel dans la réalisation de ce travail. Je ne saurais jamais vous remercier assez pour les innombrables sacrifices que vous avez consentis pour mon bien-être et ma réussite.*

*À mes meilleures amies d'enfance **Aïda** et **Thinhinane**, mes confidentes et mes complices depuis toujours. Votre amitié précieuse a été un pilier dans ma vie, et ce travail est une modeste façon de vous remercier pour tous les moments inestimables que nous avons partagés et que je chérirai à jamais.*

*À **Nawel** et **Rania**, des amis exceptionnels qui ont toujours été là pour m'encourager et me soutenir, sans rien attendre en retour. Votre amitié sincère mérite toute la reconnaissance du monde. Je vous souhaite du fond du cœur beaucoup de réussite tant dans vos vie professionnelles que personnelles.*

Liste Des Abréviations

5-FU: 5 FluoroUracile.

ACTB: Actine Bêta.

ADK: Adénocarcinome.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

AKT: Protéine Kinase B.

APC: Adenomatous Polyposis Coli.

BAX: Bcl2-Associated X protein.

BET: Bromure d'éthidium.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool.

BRAF: V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B.

CCR : Cancer Colorectal.

CHU: Centre Hospitalo-Universitaire.

CIMP: CpG Island Methylator Phenotype.

CIN: Chromosomal Instability.

CK1: Caséine Kinase 1.

DPC: DNA-Protein Crossliks.

EDTA: Ethylène Diamine Tétra-Acétique.

EGF: Epidermal Growth Factor.

EGFR: Epidermal Growth Factor Receptor.

ELK1: ETS Like-1 protein.

ERK: Extracellular signal- Regulated Kinase.

FAS: Tumor Necrosis Factor Receptor.

FFPE: Formalin Fixed Paraffin Embedded.

FZD: Frizzled.

G: Grossissement.

GADD4/5: Growth Arrest and DNA Damage-inducible proteins 4/5.

GAP: GTPase-Activating Protein.

GDP: Guanosine Diphosphate.

GEF: Guanine nucleotide Exchange Factor.

GRB2: Growth factor Receptor-Bind protein 2.

GSK3 β : Glycogène Synthase Kinase 3 β .

GTP: Guanosine Triphosphate.

HCL: Chlorure d'Hydrogène.

HE: Hématoxyline-Eosine.

HNPCC: Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer.

K-RAS: Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene.

LEF: Lymphoid Enhancer Factor.

LOH: Loss of Heterozygosity.

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinase.

MDM2: Murin Double Minute 2.

MEK: MAPK/ERK Kinase.

MLH: Mutl Homolog.

MMR: MisMatch Repair.

moAbs: Monoclonal Antibodies .

MSH: Muts Homolog.

MSI+: Micro-Satellite Instability.

mTOR: Mammalian Target of Rapamycin.

NaCl: Chlorure de Sodium.

NF1: Neurofibromin 1.

P21: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1.

PAF: Polypose Adénomateuse Familiale.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

PDK: Pyruvate Dehydrogenase Kinase.

PIK3CA: Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha.

PI3K: Phosphoinositide 3-Kinase .

PIP2: Phosphatidylinositol (4,5)-bisphosphate.

PIP3: Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisphosphate.

PMS: Post-Meiotic Segregation .

PORCN: Protein O-acyltransferase Porcupine.

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog.

RAF: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma.

RAS-WT: RAS- Wild Type.

SOS: Son Of Sevenless.

TP53: Tumor Protein 53.

TCF: T-Cell Factor.

TIF: Tests Immunochimiques Fécaux.

TMS: Melting Temperatures.

TRIS: Tris (hydroxyméthyl) aminométhane.

VEGF: Vascular Endotelial Growth Factor.

VEGFR: Vascular Endotelial Growth Factor Receptor.

WNT: Wingless-Type.

Liste des tableaux

Tableau I: Amorces utilisées pour l'amplification par PCR.	26
--	----

Liste des figures

Figure 1: Anatomie du colon.....	2
Figure 2: Coupe histologique du colon	3
Figure 3: Epidémiologie du cancer colorectal au niveau mondiale en 2020	4
Figure 4: Incidence et mortalité du CCR par continent en 2020	5
Figure 5: Nombre de nouveaux cas de cancer enregistré en Algérie en 2020	5
Figure 6: Incidence du cancer colorectal en Afrique du Nord en 2020.	5
Figure 7: Rôle de la voie CIN dans la progression du cancer du côlon.....	8
Figure 8: Système de réparation de l'ADN (MMR) et l'instabilité microsatéllitaire (MSI).....	9
Figure 9: Hyperméthylation des îlots CpG dans le CCR.	9
Figure 10: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/b-caténine	10
Figure 11: Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/ AKT/ PTEN.....	11
Figure 12: Représentation schématique de la voie de signalisation TP53	12
Figure 13: Représentation schématique de la voie de signalisation KRAS	13
Figure 14: Mécanisme d'action du Bévacizumab dans le traitement du mCCR.....	16
Figure 15: Mécanisme d'action des anti-EGFR dans le traitement du mCCR.....	17
Figure 16: Inhibiteurs de la signalisation Wnt/ β –caténine	18
Figure 17: Inhibiteurs de la signalisation PI3K	18
Figure 18: Inhibiteurs de la signalisation Kras.....	18
Figure 19: prélèvements de la masse tumorale et des Ganglions lymphatiques	20
Figure 20: introduction des cassettes dans un automate de déshydratation	21
Figure 21: Les étapes de l'inclusion des tissus dans la paraffine	21
Figure 22: les étapes de la réalisation des coupes histologiques	21
Figure 23: Coloration Hématoxyline-éosine (HE).	22
Figure 24: Montage des lames	22
Figure 25: Déparaffinage par lavage au xylène..	23
Figure 26: Les étapes d'extraction d'ADN	25
Figure 27: spectrophotomètre Biodrop (Thermo Fisher Scientifique)	25

Figure 28: Thermocycleur SimpliAmp.	27
Figure 29: Programme de Cyclage de la PCR.....	27
Figure 30: électrophorèse su gel d'agarose.....	28
Figure 31: Visualisation des produits d'amplification sous rayons UV	28
Figure 32: Aspect histopathologique d'un adénocarcinome Bien différencié.....	29
Figure 33: Aspect histopathologique d'un adénocarcinome moyennement différencié	30
Figure 34: Aspect histopathologiques d'un adénocarcinome mucineux	30
Figure 35: Aspect histopathologique d'emboles vasculaires intra-lymphatiques.	31
Figure 36: Aspect histopathologique d'engainements péri-nerveux.	31
Figure 37: Aspect histopathologique d'un ganglion lymphatique sain et métastatique	32
Figure 38: Aspect histopathologique d'une séreuse infiltrée	32
Figure 39: Les résultats de spectrophotométrie.....	33
Figure 40: Les résultats de spectrophotométrie après optimisations.....	36
Figure 41: La migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 4%	39
Figure 42: Les produits d'amplification obtenus après une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.....	40
Figure 43: La désamination de la cytosine et la 5-méthyle cytosine	42
Figure 44: Les Différentes réticulations induites par le formaldéhyde retrouvées dans les tissus FFPE	43

Glossaires :

Péristaltisme : ensemble de contractions musculaires permettant la progression des aliments dans le tube digestif.

Oncogènes : à l'origine des proto-oncogènes qui contrôlent la division, la différenciation et la survie des cellules. Après avoir subi des altérations par des mutations ou des changements épigénétiques, ces oncogènes sont activés de manière constante ou accrue entraînant une croissance cellulaire incontrôlée, et par conséquent contribuent au développement des cancers.

Gènes suppresseur de tumeur : sont des gènes qui favorisent la réparation de l'ADN et contribuent à l'inhibition de la croissance cellulaire incontrôlée en activant les points de contrôle du cycle cellulaire ainsi que l'apoptose.

Anticorps monoclonaux : sont des Anticorps qui ne reconnaissent qu'un seul type d'épitope sur un antigène donné et permettent donc une action particulièrement bien ciblée.

Transmission autosomique dominante : c'est le mode de transmission dans lequel l'expression d'un trait nécessite la présence d'une seule copie du gène correspondant situé sur l'un des chromosomes non sexuels (autosomes).

Microbiote intestinale : ou flore intestinale désigne les communautés de micro-organismes vivant dans tube digestif humain.

Mutation germinale : sont des mutations qui surviennent dans les cellules reproductrices (ovules et spermatozoïdes) et de ce fait peuvent être transmises à la descendance.

Mutation génétique « de novo » : c'est une altération génétique qui se produit de manière spontanée et n'est pas héritée des parents.

Les polypes adénomateux colorectaux : sont des excroissances bénignes qui se forment sur la muqueuse du côlon ou du rectum, cependant ils sont considérés comme des lésions précancéreuses puisque certains d'entre eux peuvent évoluer sur de nombreuses années pour devenir des cancers.

Microsatellites : sont des séquences d'ADN, généralement non codantes, constituées de répétitions en tandem d'un motif de 1 à 6 nucléotides répartis plus ou moins uniformément dans tout le génome humain.

Îlots CpG : sont de courtes régions d'ADN génomique riche en dinucléotide GC (60-70°A), Représentent 2 % du génome et retrouvés principalement dans les régions non codantes du génome telles que les promoteurs de gènes.

Apoptose : désigne la mort cellulaire programmée.

Angiogenèse : c'est le Processus de formation de nouveaux vaisseaux sanguins depuis un réseau préexistant, contrôlé par un équilibre entre les facteurs pro-angiogéniques (stimulant l'angiogenèse) et les facteurs anti-angiogéniques (qui inhibent l'angiogenèse).

GTPase: enzyme qui catalyse l'hydrolyse du GTP en GDP.

Sommaire

Liste des Tableaux

Liste des Figures

Glossaires

Introduction: 1

Chapitre I : Revue Bibliographique

I.1 Anatomie du colon :	2
I.2 Histologie du Colon :	2
I.3 Physiologie du colon :	3
II- Cancer Colorectal:.....	4
II.1 Définition:.....	4
II.2 Epidémiologie du cancer colorectal :	4
II.3 Facteurs de Risques du CCR :	6
II.4 Classification Génétique du CCR :	6
III- Les mécanismes moléculaires de la carcinogenèse colorectale :	7
IV- Diagnostique du CCR :	14
V- Traitement :	15

Chapitre II : Matériels et Méthodes

I- Etude anatomopathologique :	19
II- Extraction de l'ADN à partir des tissus coliques (FFPE) :	23
III- Etude moléculaire :	26

Chapitre III : Résultats et Discussion

I- Étude Histologique:	29
II- Optimisation de l'extraction d'ADN à partir des Tissus FFPE :	33
III- PCR et électrophorèse sur gel d'agarose:	38
Conclusion	44

Références Bibliographiques

Annexes

Introduction

De nos jours, le cancer colorectal (CCR) est universellement reconnu comme l'une des formes de tumeurs les plus malignes et dévastatrice, se classant en troisième position en terme d'incidence et au deuxième rang des cancers les plus mortelles à l'échelle mondiale (Negrichi et Taleb, 2021).

La carcinogénèse 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 de risque liés à l'alimentation et au mode de vie (Grady, 2004 ; Fearon, 2011).

Parmi les défauts moléculaires et génétiques impliqués dans le développement d'un cancer colorectal, nous retrouvons les altérations responsables de l'activation ou l'augmentation de l'expression des oncogènes notamment le K-RAS (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene*), ainsi que les altérations qui induisent une perte de fonction des gènes suppresseurs de tumeurs comme le gène TP53 (*Tumor protein 53*). Et enfin, il y'a les altérations touchant les différents gènes des systèmes de réparation de l'ADN en particulier le système MMR (*MisMatch Repair*) (Burt et al., 1995).

Etant donné que l'ensemble de ces gènes sont impliqués dans le contrôle de la prolifération cellulaire, l'apoptose ainsi que la stabilité génomique, lorsqu'ils sont mutés, les cellules acquièrent un potentiel de reproduction et de croissance désordonnés et excessif, contribuant ainsi au développement du CCR.

Dans le cadre de ce mémoire, Nous avons réalisé une étude centrée sur le cancer colorectal répartie en trois Aspects:

- Effectuer une étude anatomopathologique des CCR diagnostiqués chez les patients enregistrés au niveau du CHU Khelil Amrane de la wilaya de Bejaia.
- Mettre au point un protocole qui nous permettra d'extraire de l'ADN à partir des tissus de CCR fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE).
- Tenter d'évaluer le statut mutationnel de KRAS dans un CCR en utilisant la PCR comme technique de biologie moléculaire.

Chapitre I

Revue Bibliographique

I- Rappels sur le colon

I.1 Anatomie du colon

Le côlon et le rectum font tous les deux partie du gros intestin qui est une composante du système digestif, également appelé système gastro-intestinal (GI) (Krasteva et Georgieva, 2022). Le côlon mesure environ 150 cm de long et est subdivisé en cinq segments principaux: **le côlon ascendant**, situé au côté droit du corps, il commence par le cæcum qui relie le côlon à l'intestin grêle et s'étend vers le haut jusqu'au **côlon transverse**, ce dernier 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**.

Enfin, il y'a **le rectum**, représentant le dernier segment du gros intestin, il mesure environ 15 cm de long et est relié au côlon sigmoïde au niveau proximal, convergeant vers le canal anal au niveau distal (**Figure 1**) (Stoker, 2009).

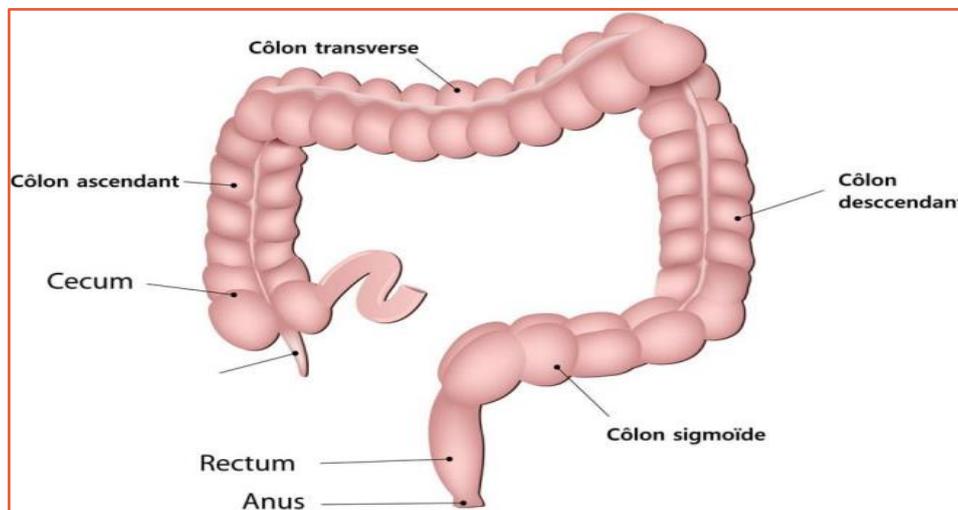


Figure 1: Anatomie du colon (Gallot, 2006).

I.2 Histologie du Colon

Le côlon et le rectum ont tous deux une structure histologique très similaire, typique du tube digestif (Krasteva et Georgieva, 2022), ils contiennent les couches suivantes :

La muqueuse, désignant la couche la plus interne qui rentre en contact direct avec la lumière du tube digestif, elle est composée de trois sous-couches : un revêtement épithélial qui s'invagine en glandes dites cryptes lieberkühnien, un tissu conjonctif lâche appelé chorion, et enfin, la muqueuse musculaire constituée de muscle lisse permettant les

mouvements locaux de la muqueuse ainsi que l'expulsion de certains produits glandulaires. **La sous-muqueuse** constituée d'un tissu conjonctif plus dense que le chorion, est fortement vascularisée, et relie la muqueuse à la musculuse. **La musculuse** quant à elle, comporte deux sous couches de tissus musculaires lisses responsable du péristaltisme. Enfin, il y'a **la séreuse** qui représente la couche tissulaire la plus externe du gros intestin (**Figure 2**) (Stevens et Lowe, 2006).

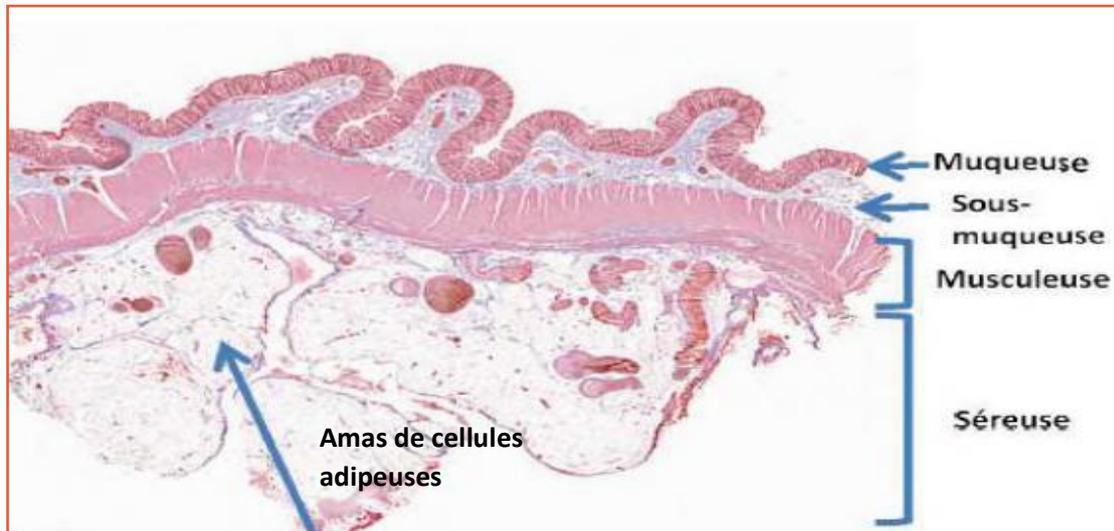


Figure 2: Coupe histologique du colon.

I.3 Physiologie du colon

Le côlon et le rectum jouent un rôle important dans la digestion en contribuant à la finalisation de la réabsorption d'eau et d'électrolytes restants après leur passage dans l'intestin grêle (Bessaguet *et al.*, 2022).

Le microbiote intestinal présent dans le côlon décompose les substances non digérées en plus petites parties, et donne aux résidus restants une consistance semi-solide (matières fécales). Ces microorganismes sont aussi responsables de la fermentation produisant des gaz (Cummings et Macfarlane, 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, ce dernier émet un signal au cerveau pour déclencher le déplacement des selles et leur expulsion par l'anus (Krasteva et Georgieva, 2022).

II- Cancer Colorectal

II.1 - Définition

Les carcinomes colorectaux (CCRs) surviennent exclusivement dans le côlon ou le rectum. Ils peuvent également être appelés cancers du côlon ou du rectum, en fonction de leur point de départ, cependant nous avons tendance à les regrouper et 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, 2022).

Les CCRs 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 *et al.*, 2022).

II.2 Epidémiologie du cancer colorectal

Le CCR représente environ 10% des cas de cancers totaux avec environ 1 931 590 nouveaux cas diagnostiqués dans le monde chaque année et un taux de mortalité de 935 173 enregistrés rien qu'en 2020 (Figure 3).

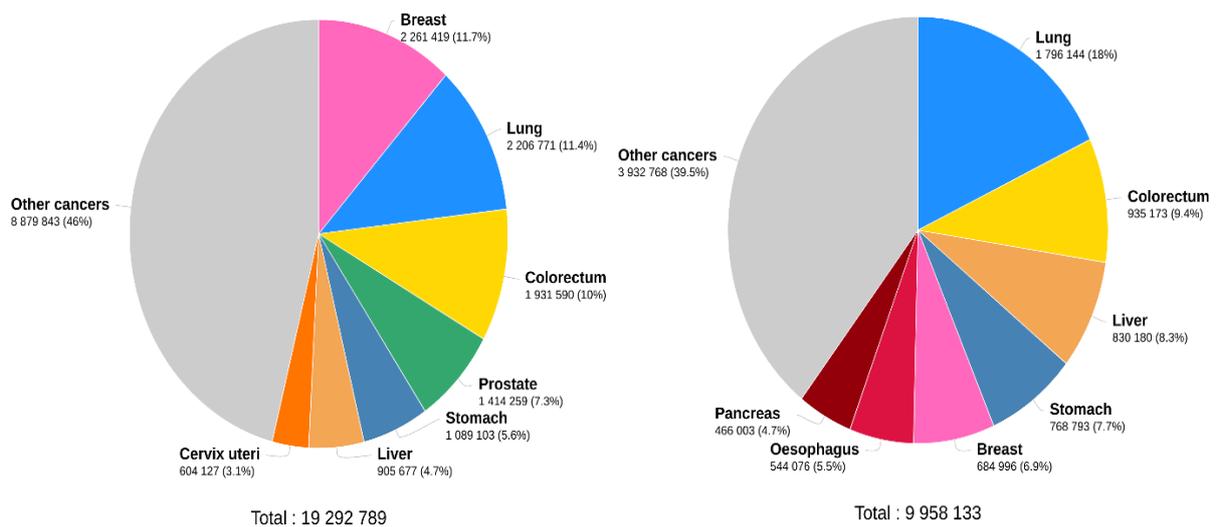


Figure 3: Epidémiologie du cancer colorectal au niveau mondiale en 2020 (a) nombre de nouveaux cas en 2020 ; (b) nombre de décès enregistré en 2020 (Globocan, 2020).

A l'échelle mondiale, il est prévu que dans les décennies à venir l'incidence du CCR va augmenter de manière significative, ce qui en fera de lui le cancer le plus fréquent d'ici 2070 avec 4,7 millions de nouveaux cas par an (Bulliard *et al.*, 2023).

Il est important de souligner qu'en 2020, l'Asie a été classée comme étant le continent le plus touché par les cancers colorectaux après avoir recensé les plus haut taux d'incidence et de mortalité (plus de 50%) (Figure 4) (Globocan, 2020).

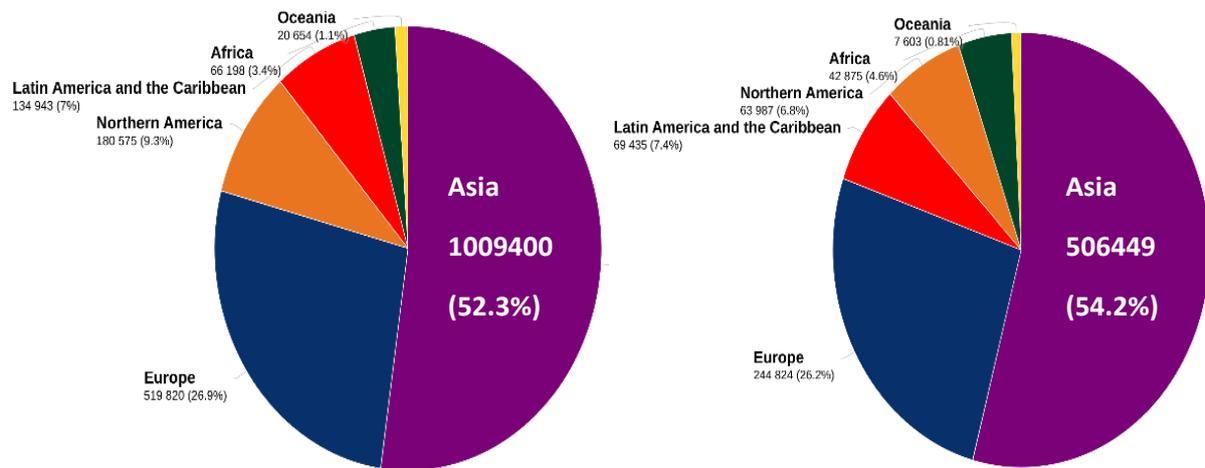


Figure 4:(a) l'incidence du CCR par continent en 2020 ; (b) la mortalité du CCR par continent en 2020 (Globocan, 2020).

En Algérie, d'après les données de Globocan recensé en 2020, le CCR occupait la deuxième position en terme d'incidence après le cancer du sein (Figure 5), ainsi que la première place parmi les pays nord africains avec un totale de 6 526 nouveaux cas enregistrés au cours de cette année (Figure 6).

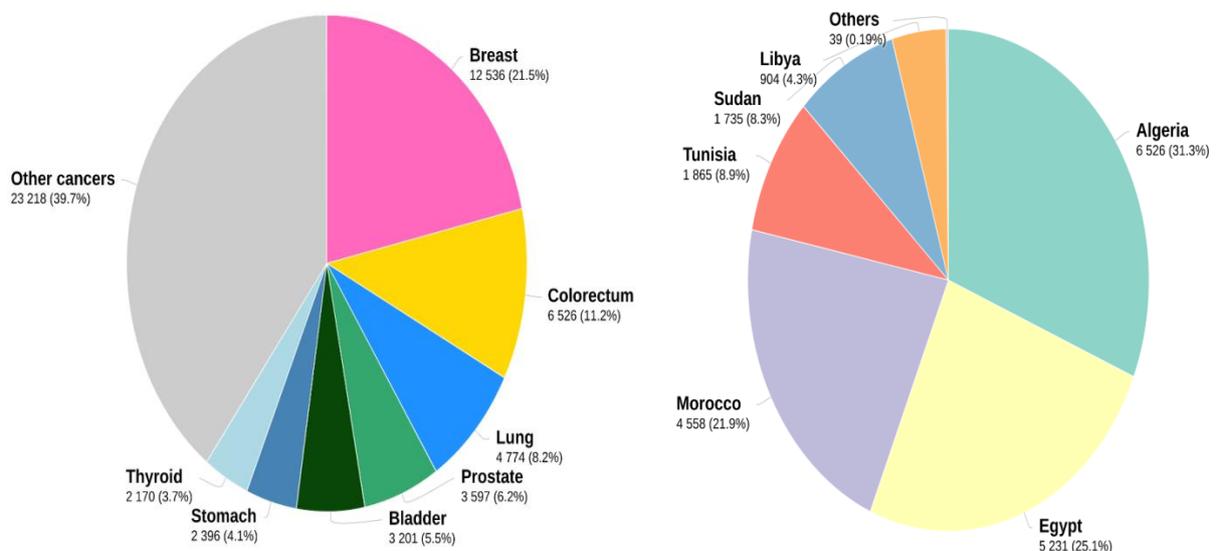


Figure 5: Nombre de nouveaux cas de cancer enregistré en Algérie en 2020 (Globocan, 2020).

Figure 6: L'incidence du cancer colorectal en Afrique du nord en 2020 (Globocan, 2020).

II.3 Facteurs de Risques du CCR

D'après les résultats des méta-analyses d'études observationnelles réalisées, plusieurs facteurs modifiables ou non modifiables sont impliqués dans le développement des CCR (László *et al.*, 2021) notamment l'âge et le sexe (Keum et Giovannucci, 2019), le tabagisme (Giovannucci et Martinez, 1996), la consommation élevée d'alcool (Rossi *et al.*, 2018), la consommation des viandes rouges (Chao *et al.*, 2005), le manque d'activité physique (Nair, 2017), le diabète de type 2 (Larsson *et al.*, 2005), l'obésité (Ma *et al.*, 2013 ; Soltani *et al.*, 2019), et enfin les prédispositions génétiques tel que la polypose adénomateuse familiale (PAF) et le syndrome de lynch (HNPCC) (Burt *et al.*, 1995).

Ces facteurs peuvent générer de multiples conséquences métaboliques et moléculaires susceptibles d'induire des aberrations génétiques et épigénétiques et de déclencher la carcinogenèse du côlon.

II.4 Classification Génétique du CCR

Les CCRs sont généralement classés en trois catégories:

a) **Les CCRs sporadiques**, représentent 80% soit la plus grande majorité des CCRs. Cette forme 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 (Kheirelseid *et al.*, 2013 ; Arvelo *et al.*, 2015).

b) **Les CCRs familiaux**, 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 (Kheirelseid *et al.*, 2013 ; Arvelo *et al.*, 2015).

c) **Les CCRs Héritaires**, plusieurs syndromes héréditaires ont été associés aux cancers colorectaux, et parmi les plus connus et diagnostiqués d'entre eux nous retrouvons:

-**La Polypose adénomateuse familiale (PAF)**, 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. La PAF se manifeste aussi bien chez les hommes que chez les femmes et 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.

La PAF est généralement transmise selon un mode autosomique dominant par une mutation germinale du gène APC (*adenomatous polyposis coli*), Cependant dans environ 25% des cas les mutations génétiques de ce gène sont "de novo" (Al-Sukhni *et al.*, 2008 ; Bogaert et Prenen, 2014).

-Le HNPCC (*hereditary non polyposis colorectal Cancer*) ou **syndrome de Lynch** est une maladie génétique autosomique dominante, caractérisée par un risque accru de cancer du côlon, elle constitue Environ 2 à 5 % de tous les cas de CCRs, soit la forme la plus courante des cancers colorectaux héréditaires (Kheirelseid *et al.*, 2013 ; Bogaert et Prenen, 2014).

III- 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.*, 2015).

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) (Pino et Chung, 2010).

III.1.1 L'instabilité chromosomique (CIN)

La CIN est observée dans 85% des cancers colorectaux sporadiques. Elle est caractérisée par l'accumulation d'anomalies chromosomiques structurelles 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.

Par conséquence, ces anomalies sont associées à des mutations fréquentes au niveau de certains oncogènes spécifiques (par exemple KRAS, PIK3CA, BRAF) et des gènes suppresseurs de tumeurs (SMAD4, TP53, APC), activant ainsi des voies critiques pour la tumorigenèse du CCR (**Figure 7**) (Bogaert et Prenen, 2014).

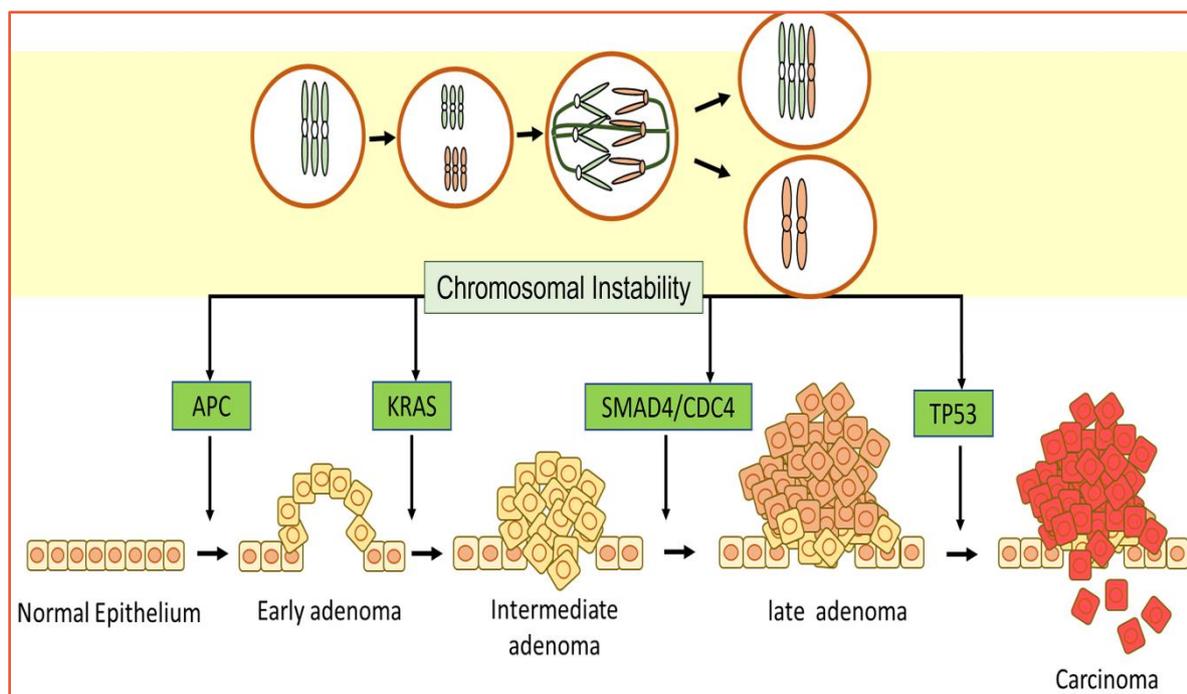


Figure 7: Rôle de la voie CIN dans la progression du cancer du côlon (Dey *et al.*, 2023).

III.1.2 L'instabilité microsatéllitaire (MSI)

L'instabilité des microsatellites a d'abord été discutée dans le syndrome de Lynch qui est une forme de prédisposition héréditaire aux cancers colorectaux, cette instabilité est liée à la présence d'une mutation sur l'un des gènes du système MMR de réparation des mésappariements d'ADN (MLH1, MSH2, MSH6, MLH3, PMS1, PMS2) (Lecomte et Goujon, 2014).

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, et notamment au niveau des microsatellites à cause de leur structure répétée difficiles à répliquer, conférant ainsi à la cellule cancéreuse un phénotype moléculaire dit MSI+, c'est-à-dire avec une instabilité des microsatellites (Figure 8) (Lecomte et Goujon, 2014).

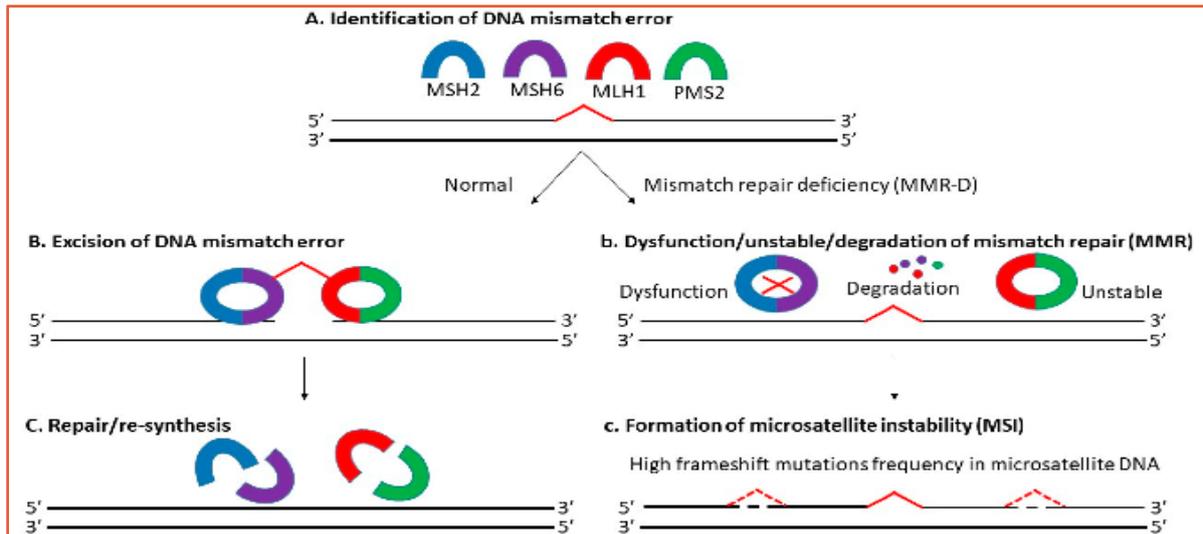


Figure 8: Système de réparation de l'ADN (MMR) et l'instabilité microsatéllitaire (MSI) (Tieng *et al.*, 2021).

III.1.3 L'instabilité épigénétiques (CIMP)

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 au niveau des îlots CpG a été récemment signalée dans les lésions précoces de la muqueuse du côlon. Cette hyperméthylation, induit une inactivation transcriptionnelle de certains gènes suppresseurs de tumeur (**Figure9**) (Bogaert et Prenen, 2014).

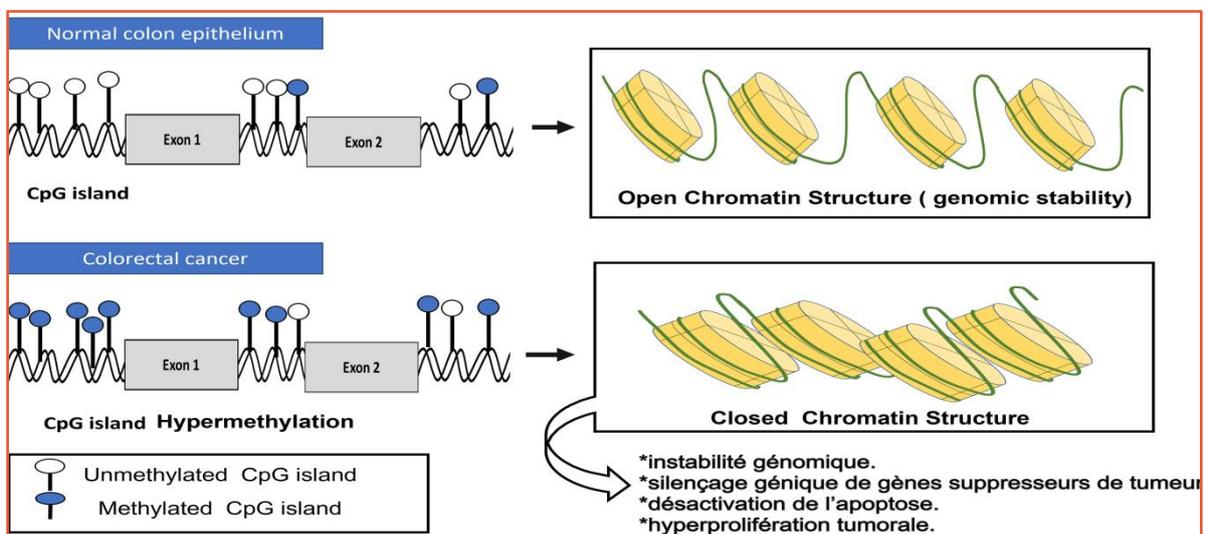


Figure 9: Hyperméthylation des îlots CpG dans le CCR (Dey *et al.*, 2023).

III.2 Les principales voies de signalisation impliquées dans le CCR

Malgré l'hétérogénéité moléculaire des CCRs, les conséquences en termes d'altération des voies de signalisation sont communes.

III.2.1 La Voie Wnt/APC/β caténine

Chez les individus normaux, la protéine APC joue un rôle central dans la voie de signalisation Wnt en régulant la dégradation de la β-caténine qui agit comme facteur de transcription des gènes intervenant dans la prolifération cellulaire (Bogaert et Prenen, 2014).

Lorsque le ligand Wnt, une glycoprotéine sécrétée, se lie à ses récepteurs Fzd (*Frizzled*), le complexe APC, Axine et GSK3β (*glycogène synthase kinase 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 CK1 (*caséine kinase 1*) et le complexe APC/Axin/GSK-3β exerce une régulation négative sur la 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, 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 10) (Bogaert et Prenen, 2014 ; Zhang et Wang, 2020).

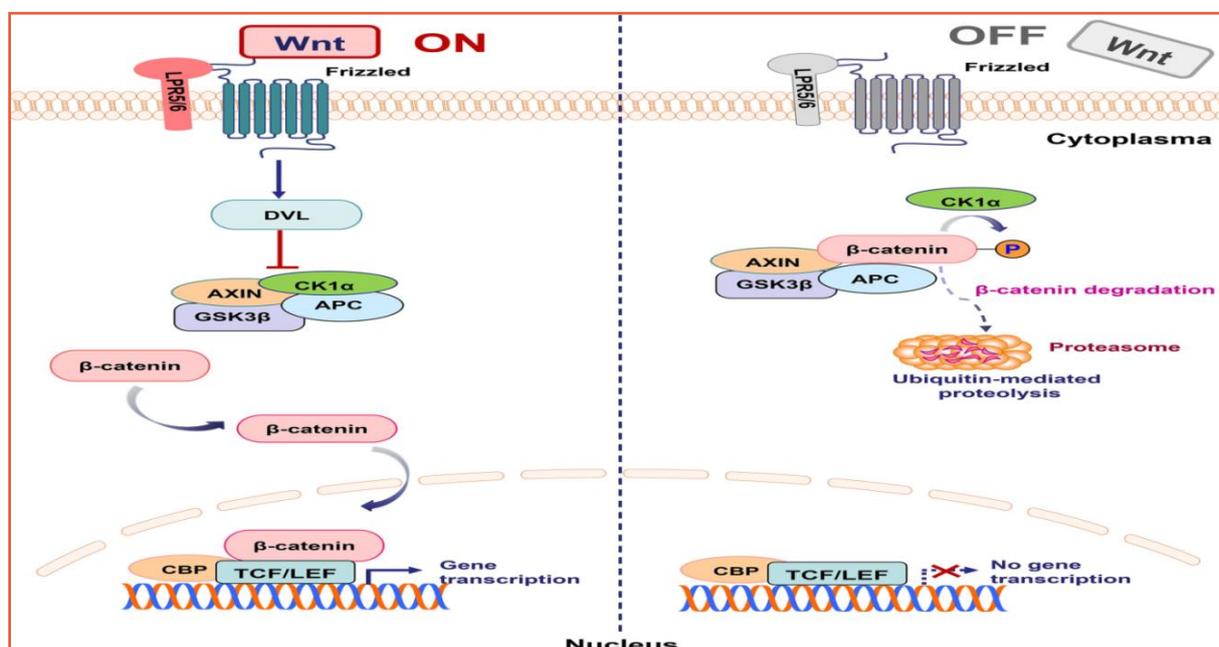


Figure 10: Représentation schématique de la voie de signalisation Wnt/b-caténine (Zhang et Wang, 2020).

III.2.2 La voie PI3K/AKT/PTEN

L'activation de la voie PI3K/AKT/PTEN débute par la liaison du facteur de croissance à son récepteur, induisant ainsi le recrutement de la PI3K (*Phosphoinositide 3-kinase*) au niveau de la membrane plasmique et son activation. La PI3K activé, convertit le PIP2 en PIP3 favorisant ainsi la liaison de l'AKT à ce dernier. Par la suite, l'AKT stimule plusieurs protéines cibles impliquées dans divers processus cellulaires tels que l'activation de la croissance cellulaire et l'inhibition de l'apoptose.

Le PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), quant à lui, est un gène suppresseur de tumeur, dont les altérations sont impliquées dans plusieurs CCRs sporadiques et héréditaires. Il est considéré comme un régulateur négatif de la voie PI3K/AKT en déphosphorylant et en régulant la baisse des niveaux de PIP3 (Figure 11) (De Rosa *et al.*, 2015).

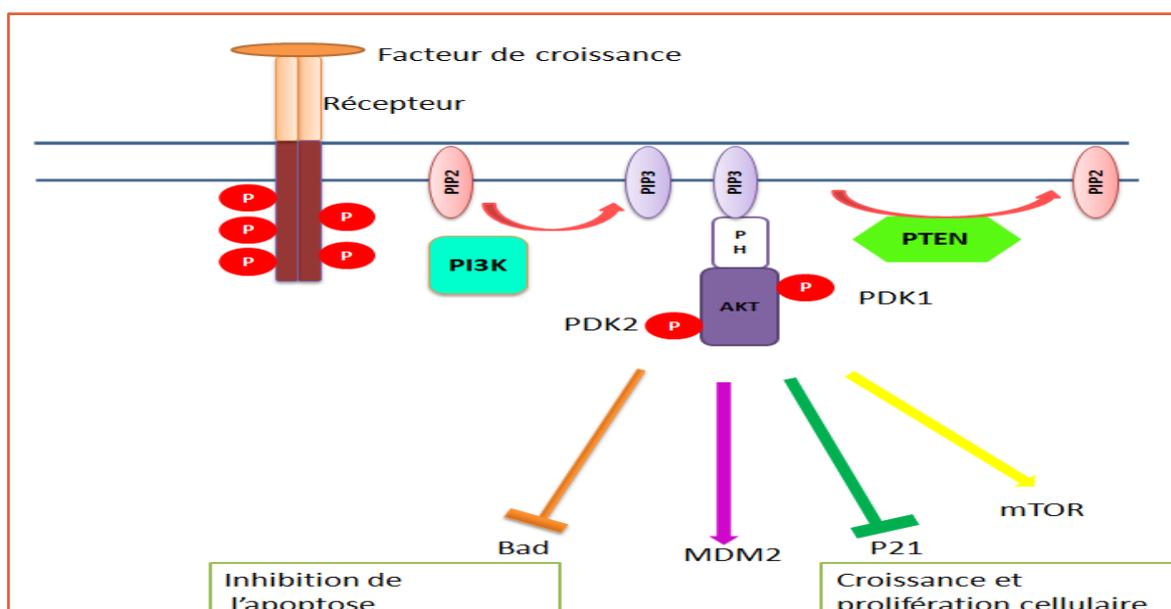


Figure 11: Représentation schématique de la voie de signalisation PI3K/ AKT/ PTEN (Vara *et al.*, 2004. modifiée).

III.2.3 La voie TP53

Définie comme le "gardien du génome", le TP53, est considéré comme l'un des gènes suppresseurs de tumeurs les plus connus.

La protéine p53 est régulée négativement par les MDM2 qui ciblent sa dégradation par ubiquitination. Cependant, dans les conditions où les cellules sont soumises à un niveau de stress élevé, les interactions entre les MDM2 et p53 sont perturbées, permettant à la p53 activée de contrôler la transcription de centaines de gènes impliqués dans le métabolisme de

l'ADN, l'apoptose, la régulation du cycle cellulaire, l'angiogenèse, la réponse immunitaire, la différenciation cellulaire, la motilité et la migration. Parmi les cibles les mieux étudiées de la p53, figurent les inhibiteurs du cycle cellulaire p21 et GADD4/5, mais aussi les BAX et FAS qui régulent l'activation des caspases et donc l'apoptose (**Figure 12**) (Pino et Chung, 2010).

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

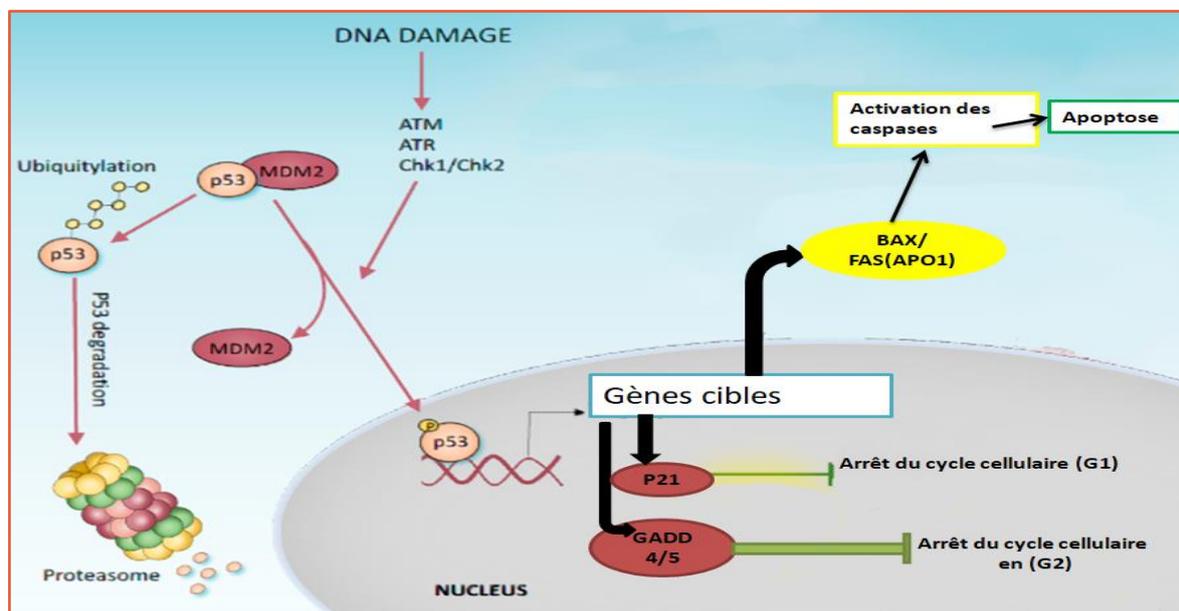


Figure 12: Représentation schématique de la voie de signalisation TP53 (Pitoli *et al.*, 2019).

III.2.4 La Voie KRAS/ MAPK

Le gène KRAS est un proto-oncogène situé sur le chromosome 12 appartenant 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 (Harrison et Benziger, 2011).

KRAS est une protéine de liaison 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 (Calvert et Frucht, 2002 ; De Roock *et al.*, 2011).

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

voie MAPK et PI3K jouant un rôle important dans le contrôle de la croissance et la survie cellulaires (inhibition de l'apoptose) (**Figure 13**) (Hyun et Shin, 2021).

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

Les ERK activées, phosphorylent des substrats cytosoliques et nucléaires notamment les JUN et ELK1, qui régulent des enzymes telles 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 facteurs d'échange de nucléotides guanine (GEF) comme le SOS catalysent les processus d'échange GDP-GTP favorisant ainsi la liaison des protéines RAS au GTP et donc leurs activations. Cependant les protéines activant la GTPase (GAP) tel que la NF1 catalysent l'hydrolyse et la désactivation du GTP et par conséquent la protéine KRAS devient inactive induisant l'arrêt de la transduction des signaux (Hyun et Shin, 2021 ; Zhu *et al.*, 2021).

Lorsque le *KRAS* est muté, le cycle intrinsèque KRAS GTP-GDP régulé par les GEF et les GAP devient perturbé, permettant à la protéine KRAS mutante de s'accumuler dans un état actif et activer ainsi de manière persistante la cascade de signalisation MAPK et PI3K en aval, entraînant la prolifération et la survie des cellules de manière continue (Zhu *et al.*, 2021).

Les mutations somatiques de KRAS sont présentes dans environ 40 % des CCRs 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 %) (Fearon, 2011).

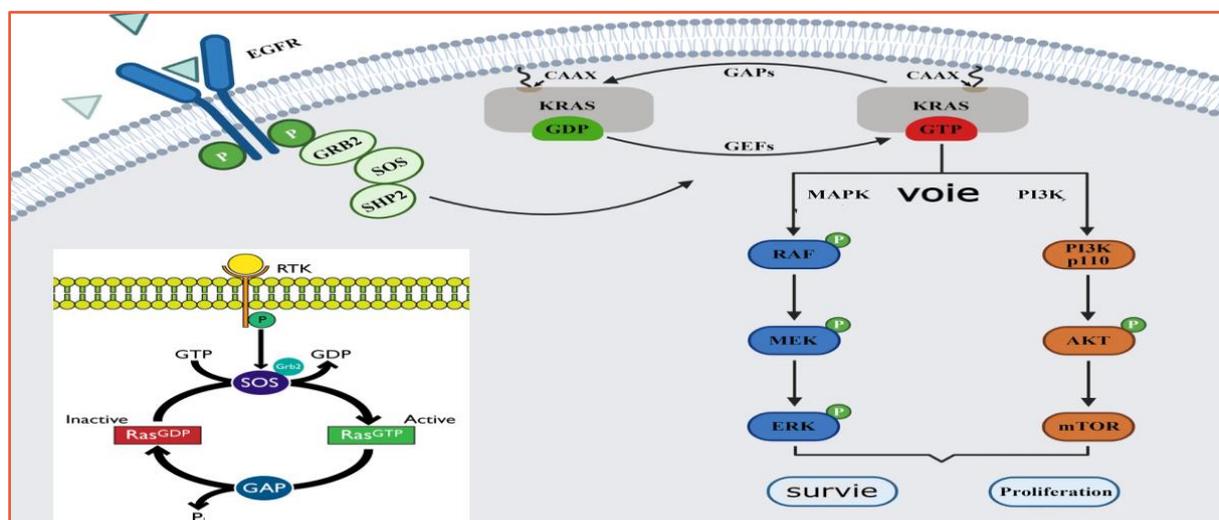


Figure 13: Représentation schématique de la voie de signalisation KRAS (Zhu *et al.*, 2021).

IV- Diagnostique du CCR

Compte tenu de la grande hétérogénéité des carcinomes colorectaux en termes de voies de tumorigenèses, il est crucial de mettre en place des stratégies de diagnostics précises et avancées afin d'améliorer la prise en charge clinique et de mieux prédire la réponse des patients aux traitements.

IV.1 Examens para-cliniques

Plusieurs examens et tests actuellement disponibles peuvent être réalisés notamment la coloscopie, la biopsie endoscopique ou polypectomie et les tests immunochimiques fécaux (TIF) (Swiderska *et al.*, 2014).

IV.2 Examen anatomopathologique

Il englobe une analyse macroscopique et microscopique des échantillons de tissus prélevés lors d'une biopsie ou d'une intervention chirurgicale, et permet l'identification des facteurs cliniques et histopathologiques importants tels que la taille de la tumeur, le type et le sous-type histologique, le degré de différenciation, la présence d'une invasion lymphovasculaire ou d'une atteinte des ganglions lymphatiques...etc. Cette évaluation approfondie a pour but de déterminer le stade de développement du cancer et le pronostic, et de ce fait l'élaboration d'un plan thérapeutique approprié pour le patient (Marzouk et Schofield, 2011).

IV.3 Le diagnostic moléculaire du CCR

L'élucidation des profils génétiques individuels pour les thérapies personnalisées est de nos jours considéré comme étant l'un des moyens par lesquels le CCR peut être traité de manière optimale.

Actuellement les tests de diagnostic moléculaires les plus couramment utilisés pour les CCRs comprennent les tests d'instabilité microsatéllitaire (MSI) et l'analyse mutationnelle *KRAS* et *BRAF* (Bedeir et Krasinskas, 2011). En ce qui concerne les méthodes de détection de ces mutations géniques, plusieurs techniques moléculaires effectuées sur des tissus fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) sont disponibles notamment la PCR allèle-spécifique qui détecte spécifiquement la forme mutée connue d'un gène (Tsang *et al.*, 2014) ; la PCR en temps réel utilisant une sonde fluorogène spécifique à la séquence d'ADN ciblée ; et enfin, le séquençage de l'ADN qui peut détecter toutes les mutations possibles du *KRAS* (Fleming *et al.*, 2012).

V- Traitement

La démarche à entreprendre suite à l'établissement du diagnostic, dépend entièrement du stade et de l'évolution du CCR.

V.1 La chirurgie

Il s'agit du traitement de référence à tous les stades de la carcinogenèse colorectal. L'ablation de la tumeur se réalise par excision locale lorsque celle-ci est superficielle, tandis qu'à des stades plus avancées, une résection partielle ou colectomie est effectuée.

V.2 La radiothérapie

La radiothérapie utilise des agents physiques, notamment les rayonnements à haute énergie qui endommagent le matériel génétique (ADN) des cellules et bloquent ainsi leur capacité à se diviser et à proliférer davantage (Baskar *et al.*, 2012).

V.3 La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer des médicaments cytotoxiques afin de détruire les cellules cancéreuses ou bloquer leurs division (McQuade *et al.*, 2017), et parmi les agents chimiothérapeutiques incorporés dans la pratique clinique de routine, nous retrouvons : **l'irinotécan** , un puissant inhibiteur de l'enzyme « topoisomérase I » qui facilite le déroulement de l'ADN pendant la réplication; **l'oxaliplatine**, un composé de platine qui provoque un arrêt mitotique par la formation d'adduits à l'ADN; et **le 5FU (5-Fluorouracil)**, un analogue de l'uracil qui bloque l'enzyme « thymidylate synthase » responsable de la synthèse des nucléotides thymine et donc empêcher ainsi la réplication de l'ADN (Segal et Saltz, 2009).

V.4 La thérapie ciblée

C'est le traitement utilisé pour les cancers métastatiques visant à inhiber directement la prolifération, la différenciation et la migration des cellules cancéreuses mais aussi modifier leurs microenvironnement tumoral (Xie *et al.*, 2020).

- **Thérapie anti-VEGF**

Le VEGF (*vascular endothelial growth factor*) est un puissant facteur de croissance pro-angiogénique souvent surproduit dans les cancers avancés, entraînant la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins qui alimentent la tumeur en nutriments et en oxygène favorisant ainsi la migration et l'invasion des cellules tumorales (Saif, 2013).

Le **bevacizumab** est un anticorps monoclonal humanisé recombinant, qui bloque les effets du VEGF en se liant à celui-ci et donc empêcher ainsi sa liaison au récepteurs tyrosine kinases (VEGFR1, VEGFR2 et VEGFR3) et leurs activation (**Figure 14**).

L'inhibition de la signalisation du VEGF ralentit ou arrête la progression tumorale en affectant plusieurs mécanismes, notamment la croissance de nouveaux vaisseaux et la modification du flux sanguin tumoral (Ellis, 2006).

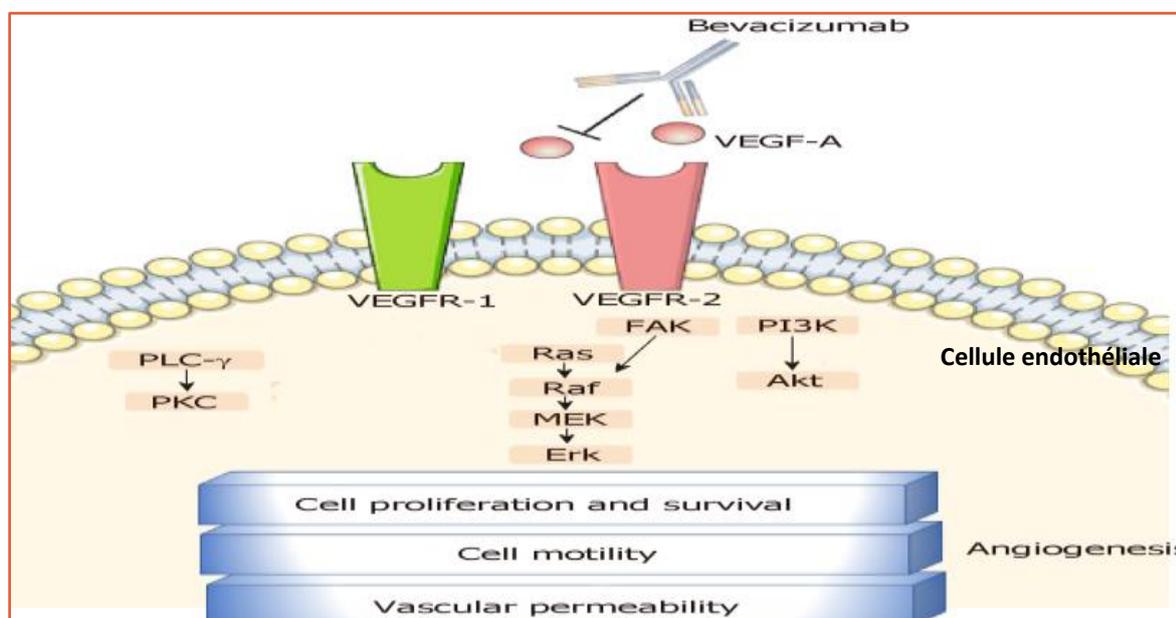


Figure 14: Mécanisme d'action du Bévacicumab dans le traitement du mCCR

(Kanat et Ertas, 2019).

- **Thérapie anti-EGFR**

Le récepteur du facteur de croissance épidermique (EGFR) (également appelé ERBB1/HER1) est un récepteur tyrosine kinase (RTK) transmembranaire qui joue un rôle crucial dans la survie cellulaire, la prolifération, et l'angiogénèse en activant des voies de signalisation en aval telles que RAS-RAF-MAPK, PI3K-PTEN-AKT et JAK/STAT (Zhao *et al.*, 2017).

Dans les cancers colorectaux avancés, une surexpression de l'EGFR a été observée chez près de 70 % des patients, ce qui a conduit à la conception de plusieurs médicaments anticancéreux ciblant son inhibition, notamment **le cetuximab et le panitumumab** qui sont deux anticorps monoclonaux (moAbs) dirigés contre l'EGFR (**Figure 15**). Cependant, il est important de noter que ces traitements anti-EGFR se sont avérés efficaces uniquement pour

un sous-ensemble de patients atteints de CCRm avec un statut KRAS sauvage (*RAS-WT*) (Harrison et Benziger, 2011 ; Zhao *et al.*, 2017), alors que ceux présentant des mutations dans les codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS ne sont pas enclins à répondre à la thérapie en raison d'une activation constante de la voie d'EGFR indépendamment du blocage pharmacologique du récepteur (Zhu *et al.*, 2021). Par conséquent, tous les patients atteints d'un mCCR doivent désormais être soumis à l'étude du statut mutationnel *KRAS* afin de planifier de manière appropriée le schéma thérapeutique dans la pratique clinique (Plesec et Hunt, 2009).

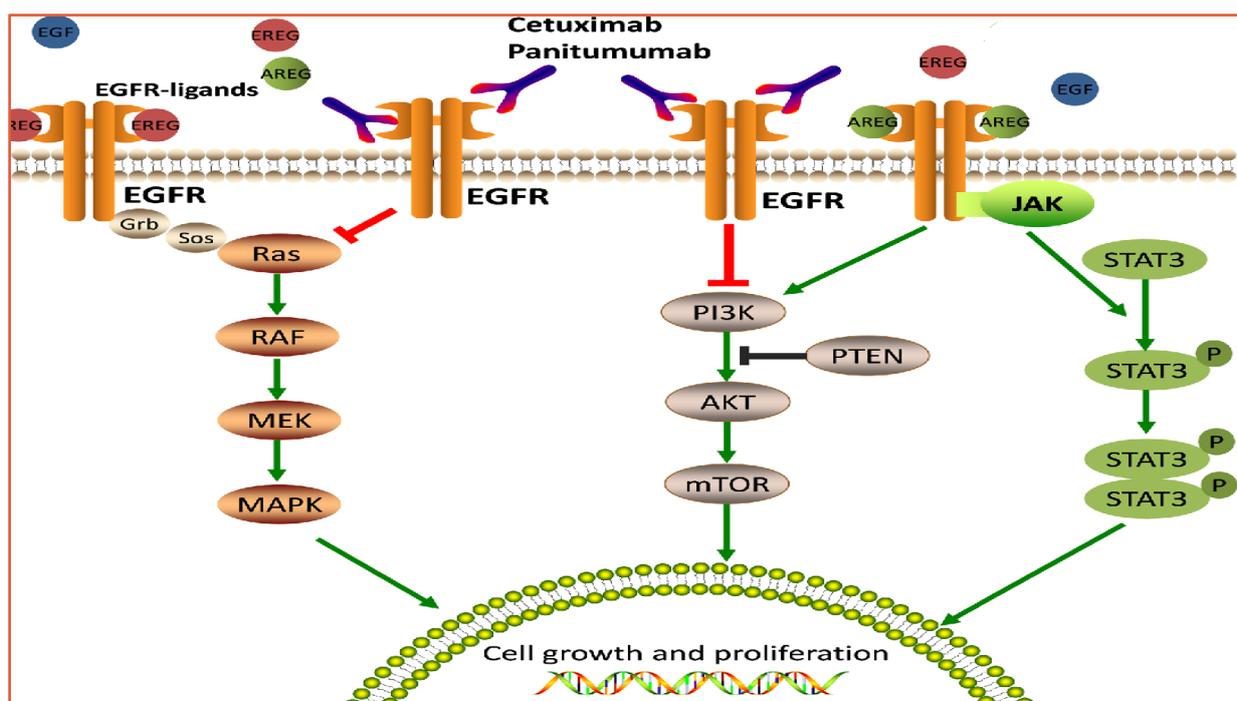


Figure 15: Mécanisme d'action des anti-EGFR dans le traitement de mCCR (Zhao *et al.*, 2017).

- **Thérapies ciblées en voie de développement**

Grace aux progrès moléculaires, des essais cliniques évaluent actuellement de nouveaux médicaments prometteurs qui inhibent les voies signalétiques majeurs de la carcinogénèse des CCR, et parmi eux nous retrouvons: les inhibiteurs de la voie PI3K/ AKT/ mTOR (**Figure 17**) qui ont principalement des effets cytostatiques avec arrêt en phase G1 *in vitro* et des effets anticancéreux favorables *in vivo* (Papadatos-Pastos *et al.*, 2015). Les inhibiteurs de la voie WNT (les inhibiteurs des PORCN, les antagonistes des ligands de la WNT et les anticorps monoclonaux de la FZD) (**Figure 16**) (Jung et Park, 2020). Et enfin il y'a les différents inhibiteurs des médiateurs de la voie KRAS (**Figure 18**) (Zhu *et al.*, 2021).

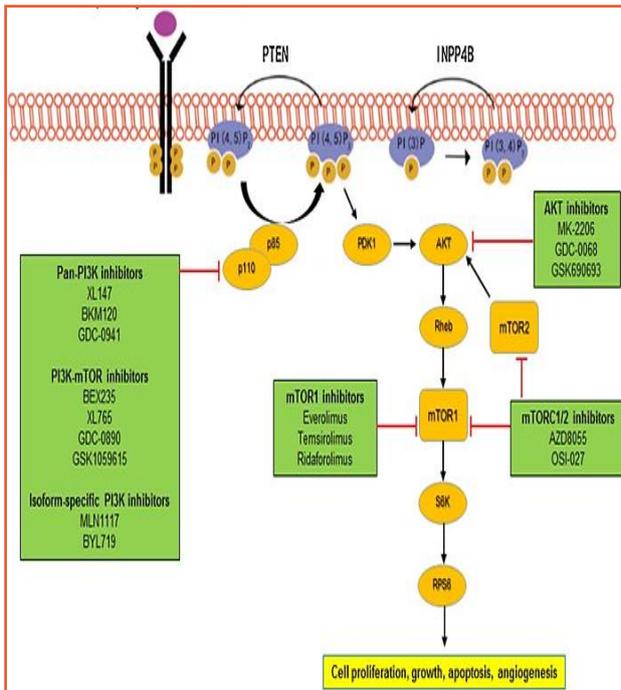


Figure 17: Inhibiteurs de la signalisation PI3K (Papadatos-Pastos et al., 2015).

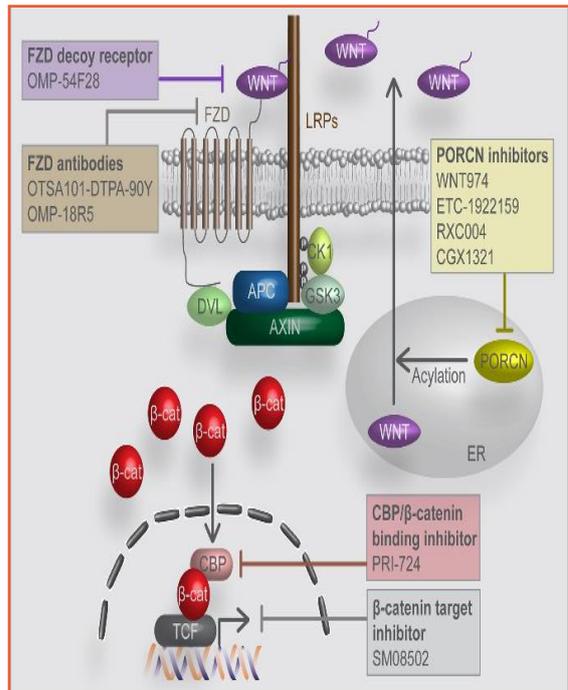


Figure 16: Inhibiteurs de la signalisation Wnt/ β –caténine (Jung et Park, 2020).

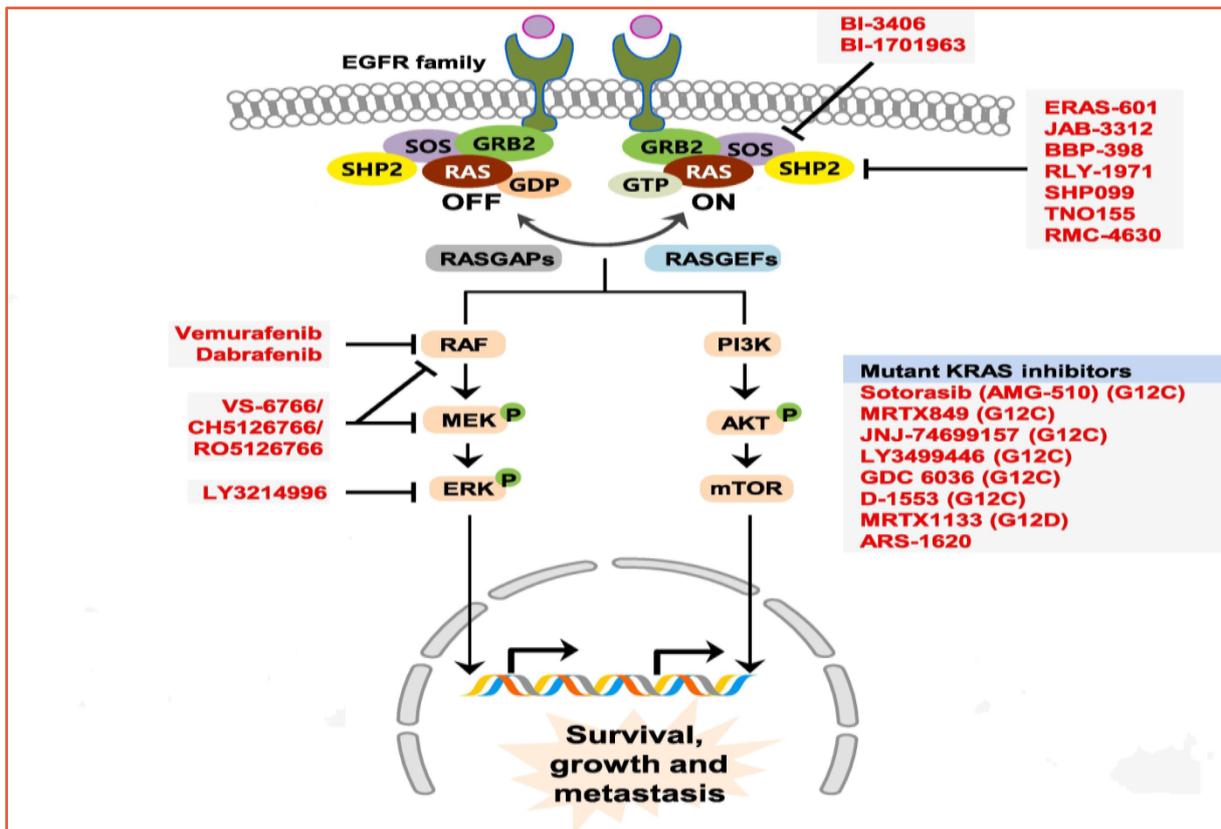


Figure 18: Inhibiteurs de la signalisation Kras (Nagasaka et al., 2021).

Chapitre II

Matériels et méthodes

• Objectif de l'étude

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

1- L'étude anatomopathologique du CCR.

2- L'optimisation d'un protocole précis pour l'extraction de l'ADN à partir des échantillons de CCRs fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE).

3- L'étude moléculaire qui se concentre sur l'évaluation du statut mutationnelle de « KRAS » en utilisant la technique de la PCR. Cette approche jouera un rôle crucial dans le choix thérapeutique des CCRs et la prise en charge des patients.

• 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 Béjaïa.

* laboratoire d'anatomie et cytopathologie de Sidi Ali Lebhar Annexe du CHU de Bejaïa.

* laboratoire de cancérologie moléculaire au niveau de l'université de Béjaïa (laboratoire de médecine).

I- Etude anatomopathologique

Matériels : Annexe 1.

I.1 Les pièces opératoires

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

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

I.2 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 (**Figure19, A, B**) ;
- 3-disséquer la pièce opératoire et prélever des fragments à partir du siège de la tumeur ainsi que des limites d'exérèse. Prélever aussi les ganglions et préciser leurs nombres ;
- 4-déposer les ganglions et fragments tissulaires dans des cassettes en plastique sur lesquelles est noté le numéro d'enregistrement accompagné d'une lettre d'alphabet pour chaque cassette (**Figure 19, C, D**).

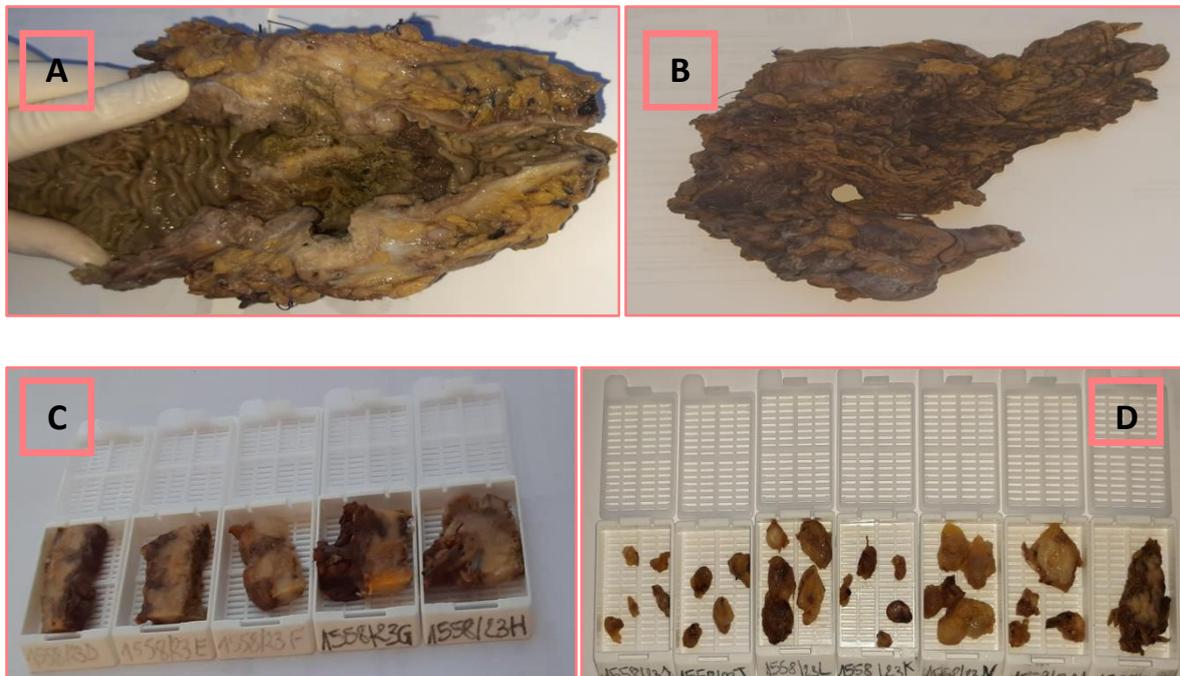


Figure 19: Pièce opératoire (A, B) de 48cm du colon transverse, prélèvements mis en cassette, Prélèvements de la masse tumorale (C), Ganglions lymphatique (D) (Photos originales).

I.3 La déshydratation

Afin de préparer les prélèvements tissulaires pour une bonne inclusion à la paraffine qui permettrait l'obtention de nettes coupes histologiques, 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 pendant 18 heures (**Figure20**). À la fin nous obtiendrons des tissus déshydratés et bien rigide.



Figure 20: introduction des cassettes dans un automate de déshydratation (Photo originale).

I.4 L'enrobage

L'enrobage, n'est rien d'autre que l'inclusion et l'imprégnation des prélèvements après leur déshydratation dans de la paraffine (**Figure 21**), au niveau de la station d'enrobage (**Annexe 2**). À la fin nous obtenons des blocs de tissus paraffinés (FFPE).

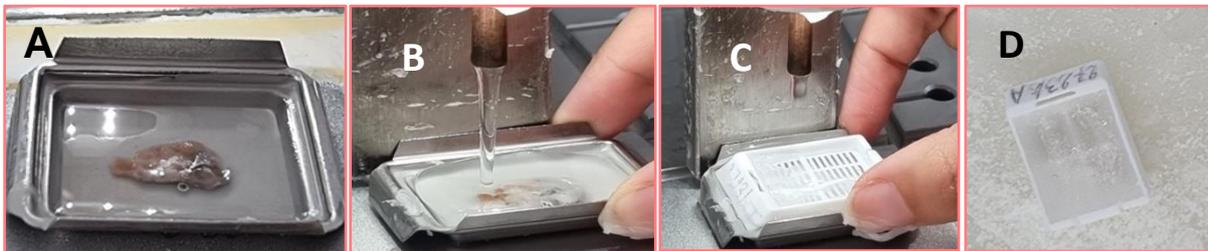


Figure 21: Les étapes de l'inclusion des tissus dans la paraffine (photos originales).

I.5 Confection des coupes

Après le dégrossissement, le microtome est ajuster afin d'avoir des coupes tissulaires de $3\ \mu\text{m}$ d'épaisseur (**Figure 22**).



Figure 22: les étapes de la réalisation des coupes histologiques (photos originales).

I.6 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 (**Figure 23**). Le mode opératoire détaillé est précisé dans **l'annexe 3**.

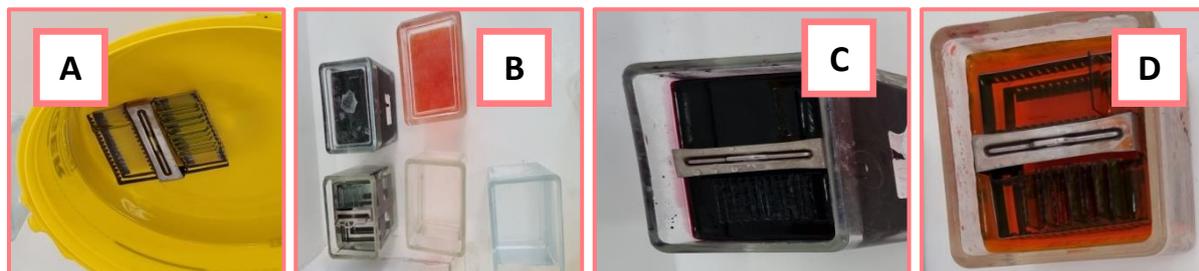


Figure 23:Coloration Hématoxyline-éosine (HE) (photos originales).
A. Déparaffinage avec du xylène, B. Réhydratation avec de l'éthanol, C. Coloration a l'Hématoxyline, D. Coloration a l'éosine.

I.7 Montage des lames

Le montage est un procédé primordial pour l'étape de l'observation au microscope, et cela consiste à : sous une haute, déposer une goutte d'Eukitt sur chacune des lames, puis les recouvrir par des lamelles trompées dans du xylène (**Figure 24**).



Figure 24: Montage des lames (photos originales).

I.8 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 et établir les facteurs histopronostiques nécessaires à la prise en charge thérapeutique. 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'anapath (**Annexe 4**).

II- Extraction de l'ADN à partir des tissus coliques fixés au formole et inclus en paraffine (FFPE)

II.1 Equipements : (Annexe 5).

- **Matériel biologique de l'étude**

Les échantillons utilisés dans cette étude sont des blocs de tissus tumoraux coliques fixés au formol et inclus en paraffine (FFPE) récupérés au sein du laboratoire d'anatomie et cytopathologie du CHU de Béjaia.

- **Préparations des réactifs**

Avant d'entamer les étapes d'extraction d'ADN, il a été impératif de préparer toutes les solutions requises du protocole tel que détaillé en (annexe 6).

II.2 Méthodes

L'extraction de l'ADN a été réalisée selon le protocole de (Boukhari, 2014) et (Pikor *et al.*, 2011) avec modifications.

En utilisant un microtome semi-automatique, nous avons découpé des sections de 10 μ m à partir des blocs FFPE. Par la suite, ces sections ont été délicatement placées à l'intérieur des tubes eppendorfs de 1,5 ml bien étiquetés.

A) Le déparaffinage

Le déparaffinage a été réalisé par un lavage au xylène comme suit : 800 μ l de xylène ont été ajoutés à chaque tube sous hotte (**Figure 25**), mélangé par retournement pendant 15 min puis centrifugé pendant 3 min à 14000 rpm, et enfin le surnageant a été éliminé sans perturber le culot cellulaire. Afin d'éliminer totalement la paraffine, ce lavage a été répété 3 fois.



Figure 25: A, Déparaffinage par lavage au xylène. B, centrifugation (photos originales).

B) La réhydratation

Elle a été réalisée en trois étapes en utilisant des concentrations décroissantes d'alcool éthanolique. Pour cela, 600 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés à chaque tubes, puis ces derniers ont été vortexés et centrifugés à 14000 rpm pendant 3 min, et le surnageant (l'éthanol) y a été éliminé. Les étapes précédentes ont été répétées avec de l'éthanol à 70% puis à 50%. Vers la fin, 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

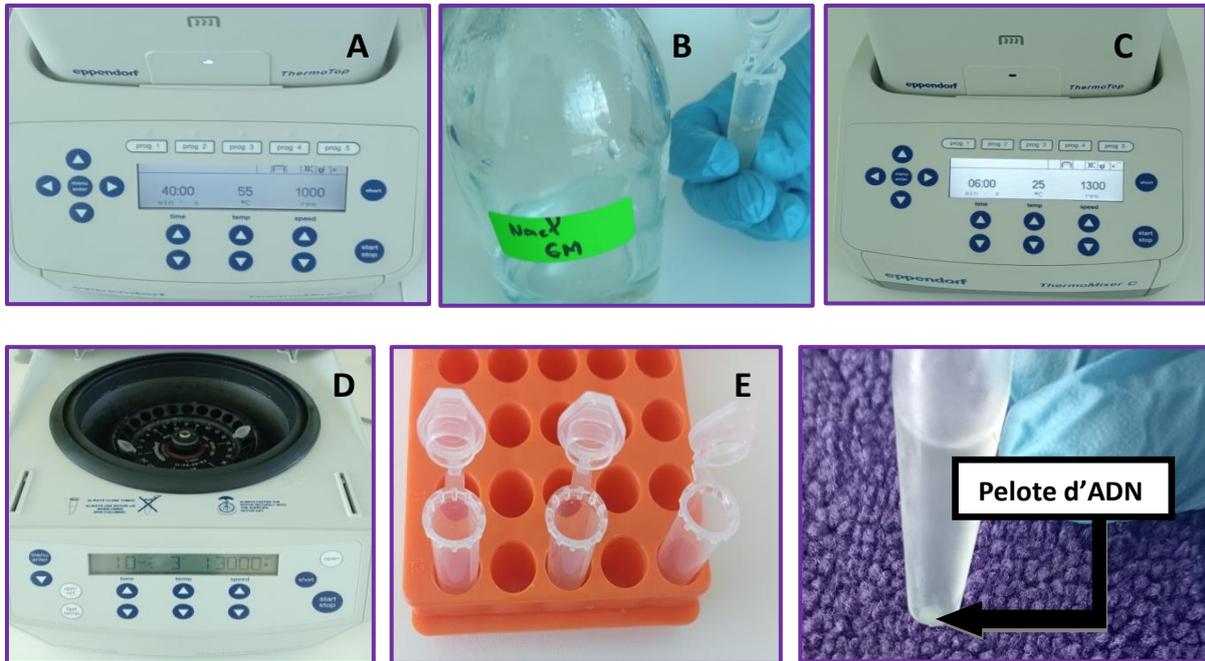
L'extraction de l'ADN a été effectuée à partir des cellules déparaffinées et réhydratées selon les étapes suivantes :

315 µl de tampon de lyse (10 mM Tris pH 7,5 / 100 mM EDTA, ph 8 / 50 mM NaCl) ont été ajouté ainsi que 5 à 10 µl de protéinase K (20 mg/ml) 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 chaque 5 à 10 min (**Figure 26, A**). Par la suite, 100 µl de NaCl (6 M) ont été ajoutés (**Figure 26, B**) puis vortexés pendant 6 min (**Figure 26, C**) et centrifugés (13000 rpm) durant 10 min (**Figure 26, D**). Le surnageant (presque 250 µl/tube), contenant l'ADN a été transféré dans un nouveau tube eppendorf de 1,5 ml.

D) Précipitation de l'ADN

200 µl d'isopropanol ont été ajoutés au surnageant puis le contenu a été retourné et secoué jusqu'à observation d'une pelote blanchâtre et compacte d'ADN. Les tubes ont été centrifugé 10 min à 13000 rpm afin de culoter la pelote d'ADN ensuite l'isopropanol a été éliminé.

300 µl d'éthanol 70 % a été ajouté au culot d'ADN puis centrifugé quelques secondes, à la fin le surnageant d'éthanol a été retiré, puis les culots d'ADN ont été séchés à température ambiante pendant 3 à 5 minutes pour éliminer toute trace d'éthanol (**Figure 26, E**). Ensuite, les échantillons d'ADN ont été réhydratés dans 30 µl d'eau distillée et incubés à 50°C pendant 10 minutes. Enfin, l'ADN a été 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 l'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 27, A). Pour cela, 2 μ L de l'échantillon d'ADN prélevé a été placé dans la cuvette du spectrophotomètre (Figure 27, B), ce dernier donne alors la concentration de l'ADN en μ g/mL, les rapports d'absorbance ainsi que la courbe de spectrophotométrie obtenue entre les longueurs d'onde 220nm et 320nm. Les rapports mesurés aux longueurs d'ondes 260 et 280 nm donne une information sur la pureté des échantillons d'ADN dosé.

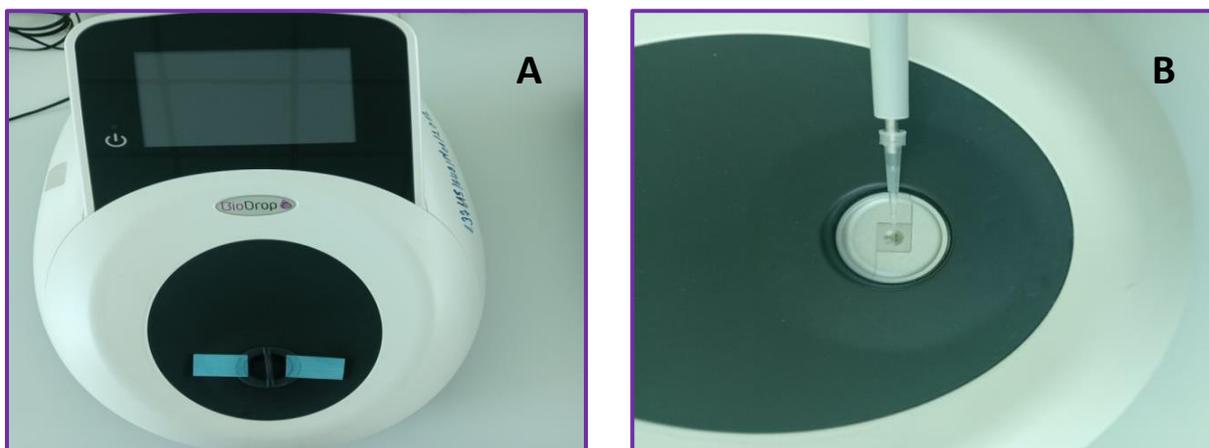


Figure 27: Spectrophotomètre Biodrop (Thermo Fisher Scientific) (photos originales).

III- Etude moléculaire

III.1 Amplification par 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 VilberLourmat 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 l'ACTB (*Actine bêta*) ont été choisies (**Tableau I**), et deux amorces KRAS (**Tableau I**) ont été sélectionnées à partir des études antérieures à savoir celles de (Solassol *et al.*, 2011 ; Sakai *et al.*, 2015) et (Suzuki *et al.*, 2015) puis confirmées à l'aide du logiciel Blast.

Tableau I: Les amorces utilisées pour l'amplification par PCR.

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 100 pmol/μl, les amorces reçus sous forme lyophilisée, ont été dissoutes dans un volume d'eau sans nucléases (nuclease free water de Ambion) conformément aux indications du fournisseur (**Annexe 7**).

La PCR a été effectuée en suivant les recommandations du protocole du kit de PCR Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity. Les composants suivants ont été ajoutés respectivement dans des tubes de PCR (0.2ml) :

- 1 μl d'ADN ;
- 2 μl d'amorce sens KRAS ou bien ACTB ;
- 2 μl d'amorce Anti-sens KRAS ou bien ACTB ;
- 45 μl du mix (kit de PCR).

L'amplification ciblée de l'ADN par PCR a été effectuée de manière automatisée par le thermocycleur SimpliAmp (Figure 28, A).

Les échantillons contenus dans les tubes de PCR ont été placés dans le bloc thermique du thermocycleur (Figure 28, B), puis le programme de PCR a été lancé (Figure 29).



Figure 28: (A) Thermocycleur SimpliAmp, (B) le bloc thermique (photos originales).



Figure 29: Programme de Cyclage de la PCR (photos originale).

III.2 Électrophorèse sur gel d'Agarose

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

100ml d'un gel d'agarose à 4 % (Annexe 8) 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 (annexe 9) et placé dans une chambre à électrophorèse.

Dans les puits, le mélange de 10 μ l de produits amplifiés avec 1 μ l de bleu de chargement ont été déposés soigneusement (**Figure 30**).

La migration a été initiée en faisant passer un courant de 100 volts (**Figure 30, C**).

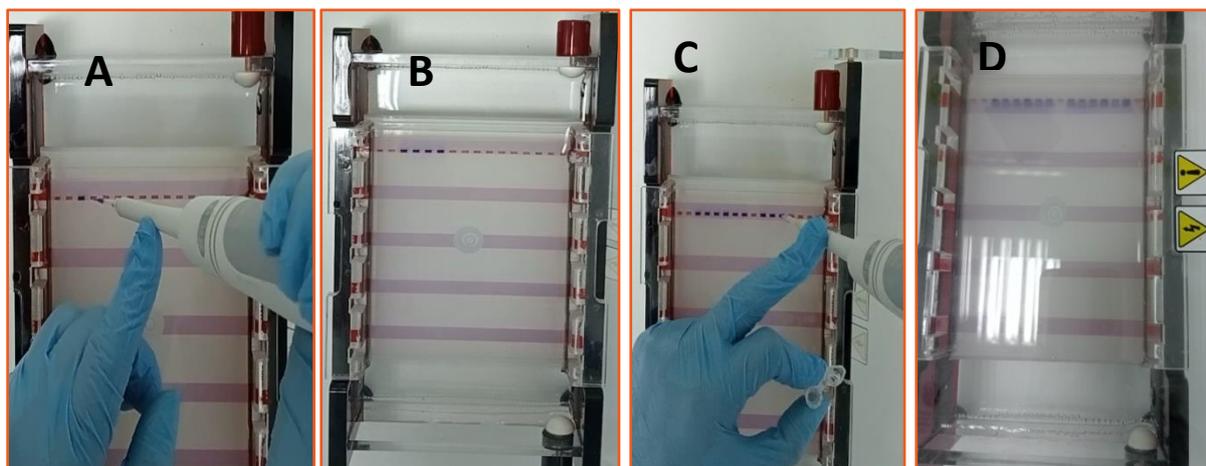


Figure 30: électrophorèse sur gel d'agarose (A, B, C) Dépôt des produits amplifiés dans les puits, (D) Initiation de la migration (photos originales).

III.3 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 (**Figure31**).

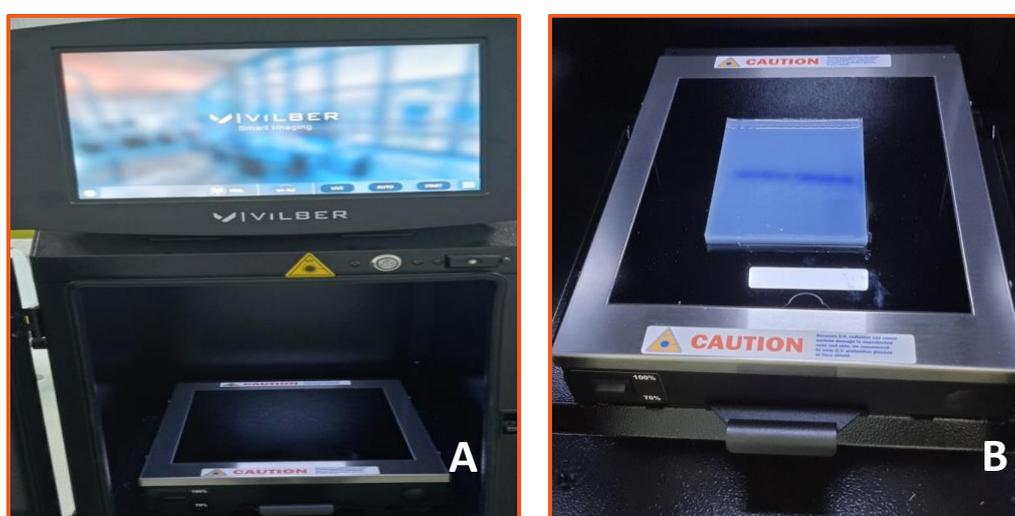


Figure 31: Visualisation des produits d'amplification. (A) Le système Vilber Lourmat UV Pads, (B) le gel d'agarose sous rayons UV (photos originales).

Chapitre III

Résultats et Discussion

I- Étude Histologique

Dans ce rapport, les résultats microscopiques de 3 patients diagnostiqués avec un CCR ont été présentés.

I.1 Aspects histologiques du CCR

- **Adénocarcinome bien différencié**

Les cellules cancéreuses bien différenciées (**Figure 32. A**) présentent une morphologie et un comportement similaires aux cellules saines du tissu d'origine, c'est-à-dire qu'elles ressemblent encore beaucoup aux cellules glandulaires normales du côlon (**Figure 32. B,C**).

Les adénocarcinomes colorectaux bien différenciés ont tendance à être moins agressifs et se propagent lentement.

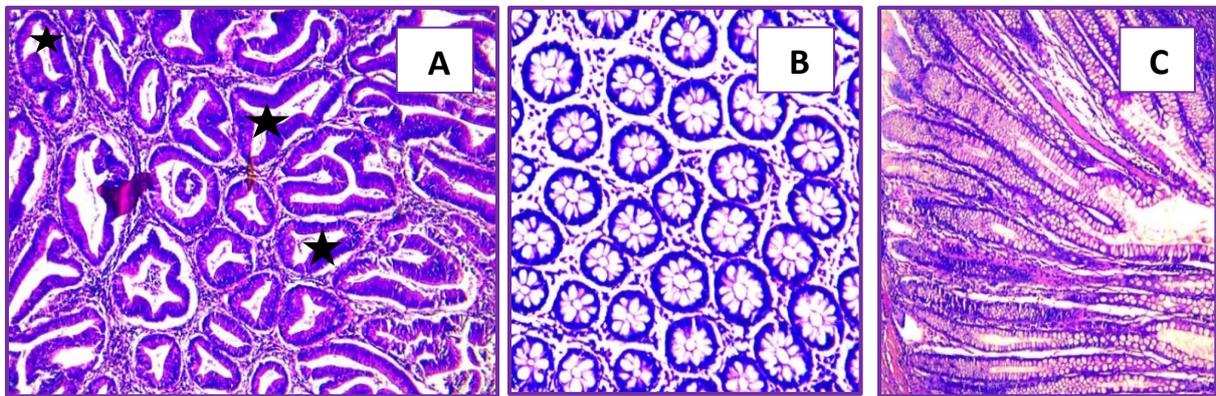


Figure 32: A. Aspect histopathologique d'un adénocarcinome Bien différencié (HE, Gx10) ([photo originale](#)). ★ Cellules cancéreuses (aspect canalaire).

(B, C) Aspect histologiques d'une muqueuse colique saine (HE, Gx20) ; B. coupes transversales, C. coupes longitudinales ([photos originales](#)).

- **Adénocarcinome moyennement différencié**

Les adénocarcinomes colorectaux moyennement différenciés sont une forme de cancer colorectal qui se situe entre l'adénocarcinome bien différencié et l'adénocarcinome peu différencié (où les cellules cancéreuses ont perdu presque toutes leurs caractéristiques normales). Ils se caractérisent par un aspect cribriforme et une altération progressive de l'architecture glandulaire normale de la muqueuse colique (**Figure 33**), accompagnée d'une prolifération tumorale à cet emplacement.

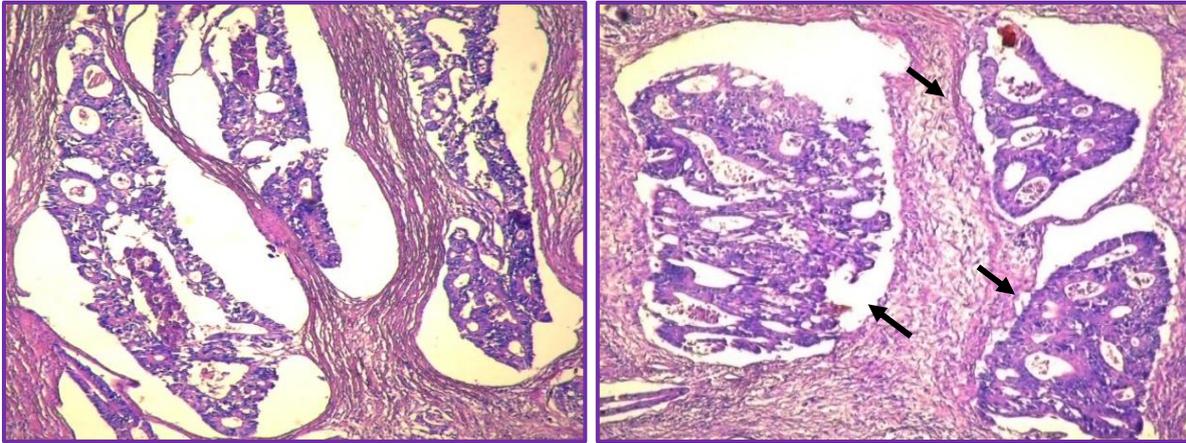


Figure 33: Aspect histopathologique d'un adénocarcinome moyennement différencié (HE, Gx10) (photos originales). → Aspect cribriforme de l'adénocarcinome moyennement différencié.

• Adénocarcinome mucineux

L'adénocarcinome mucineux est caractérisé par la production excessive du mucus (Figure 34) par les cellules cancéreuses, ce qui peut donner à la tumeur une apparence gélatineuse et visqueuse. La détection de ce type de cancer nécessite généralement une analyse histologique en raison de l'aspect particulier de la tumeur.

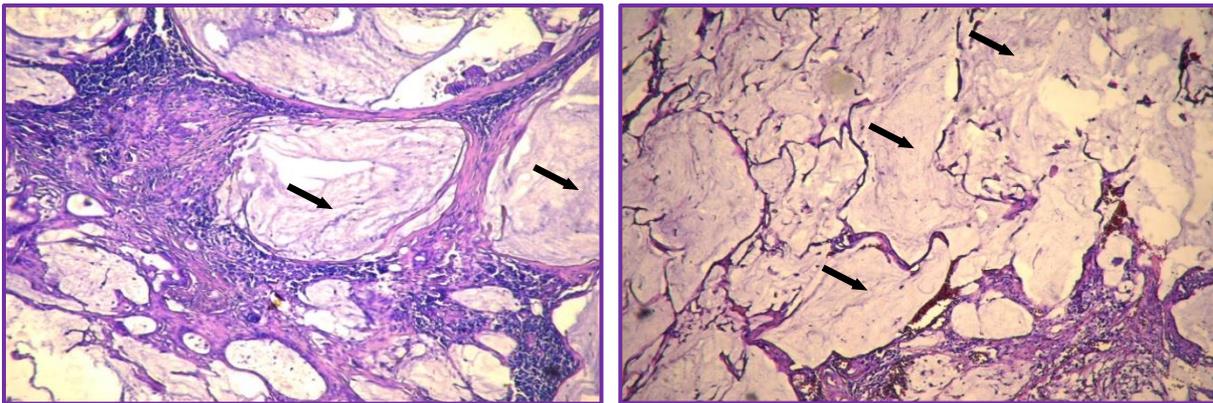


Figure 34: Aspect histopathologique d'un adénocarcinome mucineux (HE, Gx20) (photos originales). → Plaque de muqueuse.

I.2 Emboles vasculaires

La présence d'emboles vasculaires (Figure 35) témoigne de l'intrusion des cellules tumorales dans les vaisseaux sanguins et/ ou lymphatiques, augmentant ainsi le risque de la dissémination métastatique des cellules cancéreuses dans l'organisme.

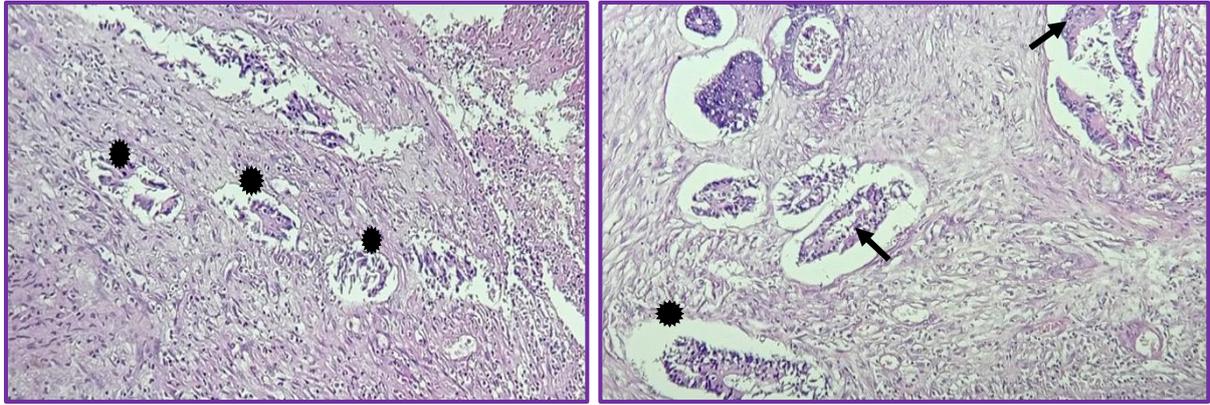


Figure 35: Aspect histopathologique d'emboles vasculaires (HE, G 10x20) (photos originales).

● Emboles intra-lymphatique ; → Cellules tumorales.

I.3 Engainements péri-nerveux

Dans l'éventualité où des cellules tumorales sont retrouvées autour des nerfs, nous parlerons d'engainements péri-nerveux. Ces engainements péri-nerveux sont généralement fréquents et représentent un facteur de risque significatif de récurrence (figure 36).

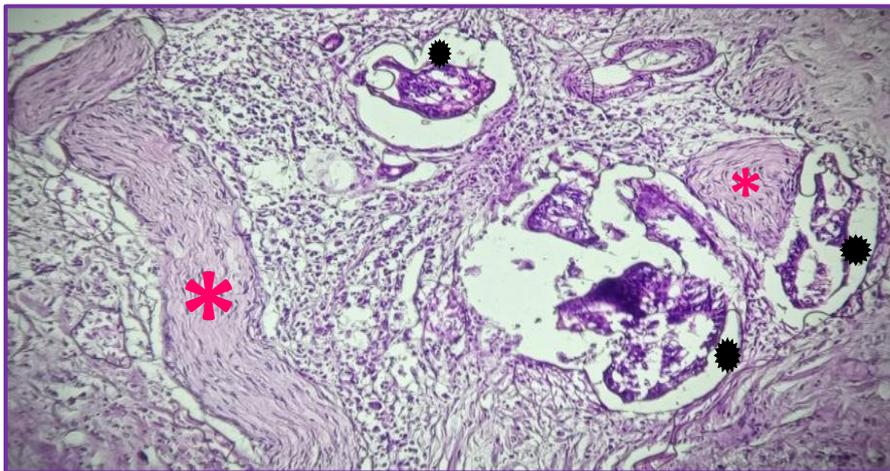


Figure 36: Aspect histopathologique d'engainements péri-nerveux (HE, G 10x20) (photo originale).

● Cellules tumorales entourant le tube nerveux ; * nerf.

I.4 Les ganglions lymphatiques

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 (Figure 37, B), et rendant ainsi les chances de survie plus difficiles et complexes.

En l'absence de cellules cancéreuses dans les ganglions lymphatiques, cela indique que le cancer est encore localisé au côlon et qu'il ne s'est pas métastaser (Figure 37, A).

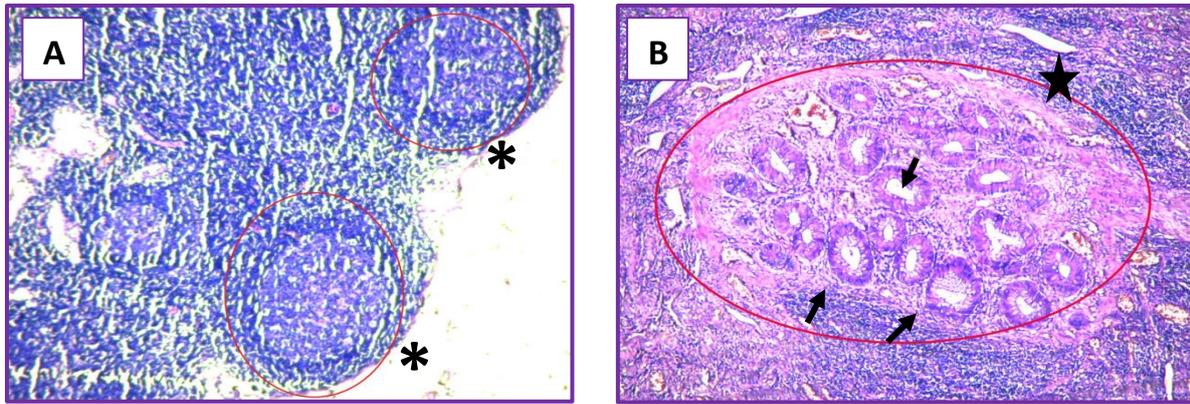


Figure 37: * A. Aspect histopathologique d'un ganglion lymphatique sain (HE, Gx10) ; ★ B. Aspect histopathologique d'un ganglion lymphatique métastatique (HE, Gx10) (photos originales).
→ Cellules cancéreuses.

I.5 Atteinte de la séreuse

Etant donné que la séreuse représente la couche la plus externe du colon, la présence de cellules tumorales à cet endroit signifie généralement que le cancer colorectal a atteint un stade avancé et qu'il s'est propagé au-delà de la muqueuse, en envahissant les couches plus profondes de la paroi du côlon (Figure 38).

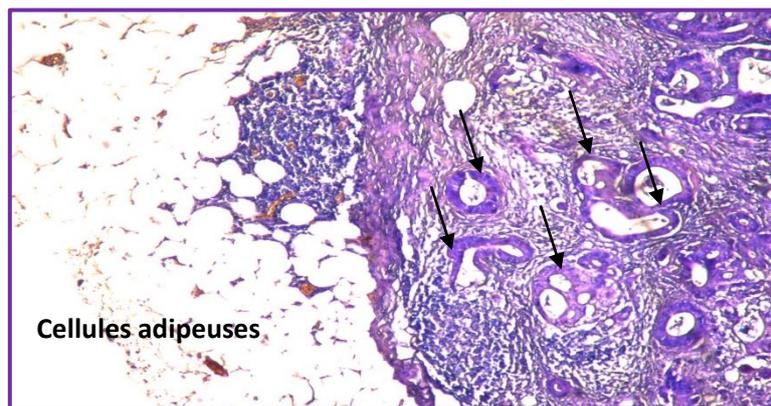


Figure 38: Aspect histopathologique d'une séreuse infiltrée (HE, Gx10) (photos originales).
→ Cellules tumorales.

Lorsque l'adénocarcinome ne dépasse pas le muscle et en l'absence de métastases ganglionnaires, d'embolies et d'engainements, la chirurgie seule est largement suffisante et le patient n'aura recours à aucune chimiothérapie. Cependant, dans le cas de présence de tous ces facteurs en plus de l'atteinte de la séreuse, ceci témoigne d'un mauvais pronostic, par conséquent, le médecin oncologue va essayer d'adopter la meilleure thérapie pour le patient.

II- 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 39) ont démontré l'absence d'ADN dans tous les échantillons FFPE testés.

En effet, aucun pic n'a été observé à 260nm (Figure 39, A, D), et des concentrations très faibles ont été obtenues avec des ratios insignifiants.



Figure 39: Les résultats de spectrophotométrie -(A, E) Absence de pique à 260nm ; -(A, B, C, D, E, F) Concentrations en ADN très faibles ; -(B, F) Ratios 260/280 anormalement élevés (photos originales).

D'après une série d'études menées à cet égard, il a été démontré que le processus d'extraction de l'ADN à partir des échantillons de tissus fixés au formol 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'acide nucléique présente dans l'échantillon initial.
- La fixation des tissus par le formol : d'après l'étude menée par (Jun et Mai, 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 d'ADN les plus délétères qui créent des blocages

durant la transcription et la traduction, conférant ainsi à l'ADN une résistance accrue lors des procédures d'extraction ultérieures.

-En outre, selon l'étude de (Guyard *et al.*, 2017), 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 avec ceux de l'étude faite par (Arreaza *et al.*, 2016) et par (Yi *et al.*, 2020). De ce fait, cela nous amène à déduire que plus la durée de fixation est longue, plus cela entraînerait une détérioration accrue, et 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 contaminants qu'elle peut contenir, en effet 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, par conséquent plusieurs kits commerciaux ont été développés et conçus spécifiquement pour optimiser les conditions d'extraction d'ADN à partir des tissus FFPE. Une étude réalisée par (Kocjan *et al.*, 2015), répertorie 69 kits commerciaux uniquement dédiés aux prélèvements FFPE issus de 43 compagnies différentes.

Malgré tous ces désavantages inhérents à l'utilisation des échantillons de tissus FFPE, cependant il est essentiel de souligner que ces spécimens demeurent une source de matériel biologique très importante et précieuse pour les diagnostic moléculaire et donc la détection des mutations au sein des tumeurs, et cela revient à leurs diverses caractéristiques à savoir :

-La disponibilité : selon (Gaffney *et al.*, 2018), les échantillons FFPE sont largement disponibles dans de nombreux laboratoires et instituts pathologiques.

-La préservation tissulaire : d'après (Egum *et al.*, 2022), la fixation au formol préserve la morphologie et l'architecture des tissus ainsi que des cellules, ce qui en fait une bonne source pour l'extraction d'acides nucléiques.

-La conservation à long terme: (Obi *et al.*, 2023) rapportent que les tissus FFPE sont relativement stables et peuvent être conservés à des températures ambiantes pendant des décennies sans risque de décomposition.

- Enfin, la rentabilité du stockage et du transport: en accord avec les recherches menées par (Dietrich *et al.*, 2013 ; Kokkat *et al.*, 2013 ; Gao *et al.*, 2020), la stabilité des tissus FFPE les

rend moins couteux pour le déplacement et le stockage comparé aux tissus frais congelés qui requièrent un maintien constant à des températures extrêmement basses par des congélateurs nécessitant des moniteurs d'alarme et des systèmes de secours de CO₂ ou un réapprovisionnement en azote liquide.

Dans la perspective d'améliorer les résultats de l'extraction de l'ADN, nous avons entrepris une réflexion afin d'identifier les éventuelles faiblesses du protocole initial et d'explorer des pistes d'optimisation.

Notre première réflexion s'est axée sur la possibilité que les prélèvements ont été effectués de manière erronée: soit en prenant trop de paraffine et en ne délimitant pas assez bien la zone tumorale, soit en prélevant une quantité insuffisante de tissus.

Afin d'y remédier, deux ajustements ont été apportés au protocole initial :

1-Sélectionner uniquement la zone tumorale et éliminer l'excès de paraffine à l'aide d'un bistouri après une coupe au microtome en premier lieu (**optimisation 1**).

2-Augmenter la quantité de tissus prélevée par la réalisation de carottes, comme décrit par (Pikor *et al.*, 2011) en bricolant un ustensile adapté (**optimisation 2**).

La deuxième réflexion s'est portée sur l'éventualité que le problème résiderait dans l'étape de lyse. Des doutes ont émergé quant à la durée d'incubation, qui variait d'un auteur à l'autre ainsi qu'à la quantité de protéinase K utilisée que nous avons réduite au minimum pour des raisons de disponibilité. 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 conformément aux recommandations de (Pikor *et al.*, 2011) (**optimisation 2**).

Les résultats obtenus résumés dans la (**Figure 40**) ont révélé une amélioration significative tant en termes de qualité que de rendement des extractions (présence d'ADN et absence de contaminant), ce qui se traduit par une efficacité remarquable de l'extraction de l'ADN aussi bien dans l'optimisation 1 que 2.



Figure 40: Les résultats de spectrophotométrie -Présence de pics à la longueur d'onde 260nm ;
 -Concentrations en ADN Satisfaisantes ; -Ratios 260/280 Optimales (photos originales).
 A. Optimisation 01 ; (B, C, D) optimisation 02.

L'évaluation de la pureté et de la qualité de l'ADN repose sur l'analyse des valeurs des rapports 260/280 obtenues par mesure spectrophotométrique. Ces valeurs sont indicatives des éventuels contaminants présents dans les échantillons examinés. Globalement, un ratio 260/280 compris entre 1,8 et 2,0 est considéré comme indiquant une bonne qualité de l'ADN.

En comparant les résultats des ratios que nous avons obtenus (compris entre 1,81 et 1,93) avec ceux rapportés par d'autres études antérieures notamment celles menées par (Chung *et al.*, 2012 ; Heydt *et al.*, 2014 ; Gailey *et al.*, 2015) et (Patel *et al.*, 2017), nous pouvons déduire que les valeurs sont remarquablement semblables, ce qui témoigne d'une qualité adéquate et satisfaisante de l'ADN.

En ce qui concerne les concentrations d'ADN qui variaient de 69 ng/ μ l à 213 ng/ μ l, en les comparant avec les données de la littérature à savoir :

(Hu *et al.*, 2014) qui ont enregistré un rendement situé entre 0.95- 109.1 ng/ μ L ; (Heydt *et al.*, 2014) présentant des valeurs échelonnées de 1 à 130 ng/ μ L ; (Franczak *et al.*, 2019) ayant obtenus une fourchette de 0.1 - 64.7 ng/ μ L ; (Muscarella *et al.*, 2019) qui ont observé des concentrations variant entre 100 et 400ng/ μ L ; (Amemiya *et al.*, 2021) avec une plage de 5,2-171 ng/ μ L ; et enfin, (Jeroch *et al.*, 2023) avec un minimum de 0,484 ng/ μ L et un maximum de 216 ng/ μ L .

Nous pouvons conclure que les échantillons FFPE contenaient suffisamment d'ADN pour envisager des amplifications par PCR en aval, et que les optimisations apportées au protocole ont permis d'en extraire une quantité optimale.

En plus de ces résultats satisfaisants que nous avons obtenus, les optimisations nous ont aussi révélé l'importance de la méthode de prélèvement. En effet, afin d'extraire de l'ADN, nous avons prélevée 01 coupe de 10 μ m à partir de chaque bloc de tissus FFPE, et en comparant avec les travaux antérieurs, notamment ceux de (Kerick *et al.*, 2011 ; Potluri *et al.*, 2015 ; Dang *et al.*, 2016 ; Atanesyan *et al.*, 2017 ; Franczak *et al.*, 2019) et (Amemiya *et al.*, 2021), une observation a émergé : tous les protocoles adoptaient l'usage de plusieurs sections consécutives (de 02 à 15 sections) d'épaisseurs différents allant de 5 jusqu'à 20 μ m maximum et en disséquant toujours la zone tumorale d'intérêt. Concernant les prélèvements sous forme de carottes, toutes les études à savoir celles de (Franklin *et al.*, 2010 ; Chung *et al.*, 2012) ainsi que (Austin *et al.*, 2016) réalisaient soit 1 ou 2 carottes, ce qui est en parfaite concordance avec les optimisations que nous avons entreprises. Il est à noter que la majorité des protocoles favorisaient l'utilisation des sections plutôt que les carottes.

Enfin, les différents essais ont également déterminé l'importance de l'étape de la lyse cellulaire. En effet au cours de cette phase, la procédure implique l'ajout de la protéinase K (dont le rôle est la dégradation et l'inactivation des protéines par l'hydrolyse des liaisons peptidiques internes) au lysat tissulaire, et pour cela trois paramètres affectant la récupération de l'ADN doivent être pris en considération :

***Les concentrations :** les concentrations de la protéinase K rajoutées diffèrent d'un protocole à un autre, et cela revient à la quantité du tissu FFPE utilisé.

Généralement ces concentrations varient de 15 à 70µl avec la majorité des protocoles manuelles (sans kit) notamment celui de (Lu *et al.*, 2018) qui optent pour l'utilisation de 20µl.

***Les durées d'incubation :** la période d'incubation avec la protéinase K dépend principalement du type et de la quantité d'échantillon. En ce qui concerne les coupes des tissus FFPE, la majorité des études à savoir celles de (Santis *et al.*, 2011 ; Atanesyan *et al.*, 2017) et (Einaga *et al.*, 2017) réalisent une incubation durant toute une nuit en vue d'une lyse complète des tissus.

Cependant, un certain nombre de protocoles préconisent que la durée de digestion avec la protéinase K doit être supérieure à une nuit afin d'améliorer l'efficacité de l'extraction de l'ADN. Effectivement, selon (Potluri *et al.*, 2015), l'augmentation de la durée de digestion jusqu'à 72 heures s'est avérée améliorer la quantité et la qualité (pureté) d'ADN récupéré. et d'après (Sengüven *et al.*, 2014), les périodes de digestion peuvent être prolongées jusqu'à 5 jours jusqu'à ce que les tissus soient complètement dissous.

***Les Températures d'incubation :** la température de digestion des tissus FFPE est de 55-56°C dans la plupart des publications notamment celles de (Kerick *et al.*, 2011 ; Santis *et al.*, 2011) et (Atanesyan *et al.*, 2017).

III- Etude moléculaire

III.1 PCR et électrophorèse sur gel d'agarose

Dans le but de déterminer le statut mutationnel du KRAS chez les patients atteints de CCR, tous les échantillons d'ADN extraits à partir des tissus FFPE colique de ces malades ont été soumis à une amplification par PCR en utilisant deux amorces spécifiques pour le KRAS et deux autres pour l'ACTB. Par la suite les produits des amplifications ont été soumis à une migration électrophorétique.

La validation de l'efficacité et la réussite de la PCR peut être confirmée dans le cas d'observation de bandes distinctes correspondant aux produits amplifiés de différentes tailles (164-245pb pour le KRAS et 250pb pour l'ACTB).

D'après les résultats de l'électrophorèse (**Figure 41**) que nous avons obtenus, ces derniers montrent l'absence de l'amplification de l'ADN, en effet aucune bande n'a été visualisée.

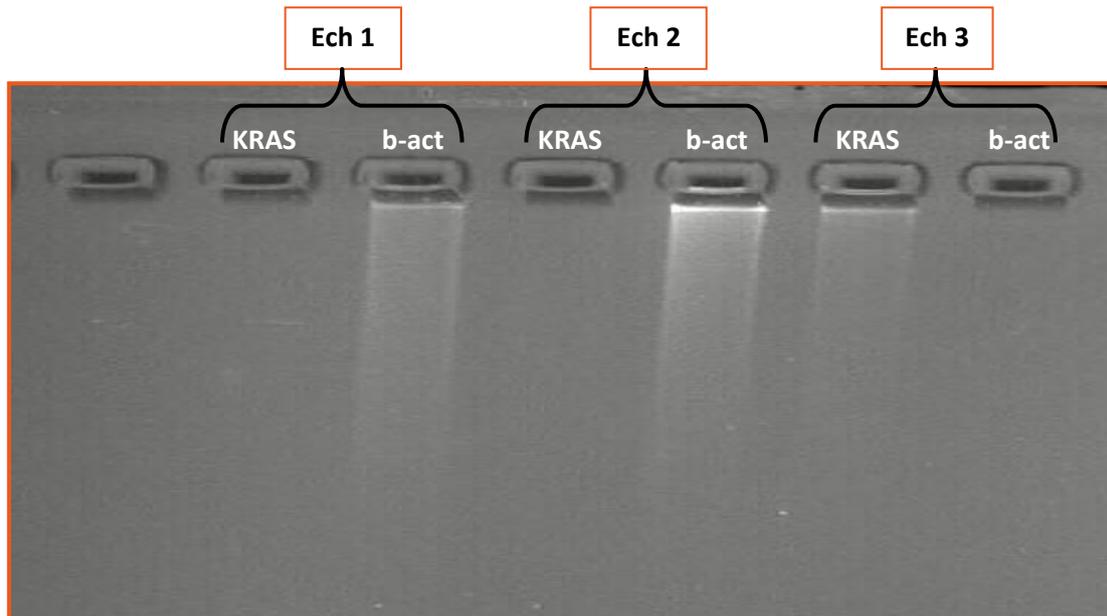


Figure 41: La migration des produits de PCR sur un gel d'agarose à 4% ([photo originale](#)).

Ech1 : Echantillon FFPE (2022) d'un patient atteint d'un adénocarcinome colique moyennement différencié, extraction d'ADN par l'optimisation 1. **Ech2** : Echantillon FFPE (2022) d'un patient atteint d'un adénocarcinome colique moyennement différencié, extraction d'ADN par l'optimisation 2. **Ech3** : Echantillon FFPE (2021), extraction d'ADN par l'optimisation 2.

Après une recherche bibliographique étendue à ce sujet, plusieurs hypothèses pourraient expliquer cette absence d'amplification de l'ADN, notamment :

1/ Des conditions inappropriées : selon ([Polz et Cavanaugh, 1998](#)), des paramètres de réaction inappropriés, telles que des températures incorrectes, des durées inadéquates ou des réactions mal adaptées peuvent empêcher l'amplification de l'ADN.

De ce fait, il est possible que les températures d'hybridation employées dans notre programme de PCR, ne soient pas adaptées aux deux paires d'amorces utilisées en considérant leurs températures de fusion (TM) de l'ordre de (57.9/ 57.3 pour Kras et 59.8/ 57.9 pour l'Actb) et qui sont assez éloignées de la température choisie pour les cycles d'hybridation (50 °C). D'après ([Solassol et al., 2011](#)) l'amplification du KRAS par PCR avec les mêmes amorces que nous avons utilisées, comprenait une hybridation à 60°C, alors que ([Suzuki et al., 2015](#)) a maintenu cette étape à 55 °C.

2/ Une éventuelle erreur dans la concentration des amorces utilisés étant donné qu'elles peuvent jouer un rôle crucial dans le succès ou l'échec de l'amplification.

Résultats et Discussion

D'après les concentrations d'amorces que nous avons employées, se distinguant des autres études, notamment celle de (Miyamae *et al.*, 2010) qui ont fait usage de 500 nmol/L de chaque amorce, il est envisageable de déduire que le choix des concentrations des amorces doit être déterminé d'une manière spécifique en vue d'obtenir une amplification optimale.

3/ Une dernière hypothèse tout à fait plausible, est que le problème résiderait plutôt dans le gel de migration qui pourrait être trop concentré (4%), et aurait pu entravé la migration des produits ; ce qui concorde avec les études bibliographiques qui ont visualisés les produits d'amplification du gène KRAS sur des gels d'agarose à des concentrations plus faibles, par exemple Miyamae *et al* (2010) ont utilisé 2% du gel d'agarose, tandis que Liu *et al* (2013) ont opté pour un gel à 1,2 %.

Pour cela, la concentration du gel d'agarose utilisé a été réduite de 4 à 1% ; 200 nM d'amorces ont été utilisé selon les recommandations du kit de PCR et le programme de cyclage de la PCR a été modifié comme suit : 1 cycle de: 94°C pendant 1 minute (dénaturation) ; 35 cycles de: 94°C pendant 30 seconds (Dénaturation) ; 57.3°C pendant 30 seconds (hybridation) et 72°C pendant 1 minute (Elongation).

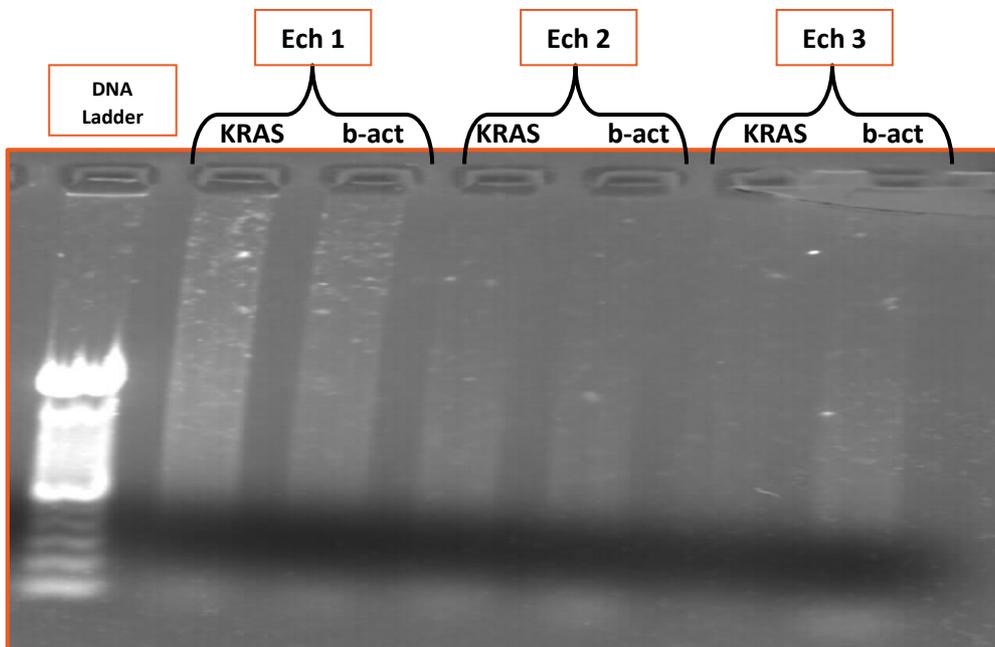


Figure 1: Les produits d'amplification obtenus après optimisation d'électrophorèse (photo originale).

Ech1 : Echantillon FFPE (2022) d'un patient atteint d'un adénocarcinome colique moyennement différencié, extraction d'ADN par l'optimisation 1. **Ech2** : Echantillon FFPE (2022) d'un patient atteint d'un adénocarcinome colique moyennement différencié, extraction d'ADN par l'optimisation 2.

Ech3 : Echantillon FFPE (2021), extraction d'ADN par l'optimisation 2.

Les résultats obtenus suite aux modifications apportées représentés dans la (**figure 42**) ont été jugés comme non concluants, ce qui nous a incités à persévérer dans notre recherche afin d'identifier d'autres éventuels facteurs susceptibles de contribuer à l'échec de l'amplification. Parmi ces facteurs :

1/ Une concentration trop élevée des échantillons d'ADN pourrait affecter la PCR de différentes manières, soit par un effet d'inhibition et/ou une Saturation de la réaction.

il est très pertinent d'envisager cette possibilité, particulièrement lorsque nous comparons notre protocole où la PCR a été réalisée dans un mélange contenant des concentrations d'ADN élevées (au minimum 69 ng/ μ l), avec les recherches antérieures notamment celles menées par ([Dedhia et al., 2007](#) ; [Arcila et al., 2011](#) ; [Liu et al., 2013](#)) et ([Nguyen et al., 2022](#)) qui ont amplifié seulement 100 ng d'ADN génomique, et ([Funabashi et al., 2012](#)) ayant opté pour l'utilisation d'une quantité d'ADN plus modeste de l'ordre 20 ng.

2/ la possibilité d'une éventuelle défaillance du kit de PCR (mauvaise conservation ou expiration de certains réactifs) pourrait selon ([Polz et Cavanaugh, 1998](#)) entraîner un échec de la PCR.

3/ la qualité de l'ADN extrait; la présence de divers types de dommages d'ADN lié a la fixation par le formole et qui sont susceptibles d'inhiber la PCR ont été identifiés dans les tissus FFPE.

A/La fragmentation de l'ADN

Il a été démontré dans plusieurs études notamment celle de ([Patel et al., 2017](#)) que les acides nucléiques récupérés à partir du tissu FFPE sont généralement fragmentés, et ces fragments représentent un mauvais substrat pour les tests enzymatiques tels que la (PCR), en influençant directement la quantité de matrices disponibles pour l'amplification.

B/Les sites Abasique

Le formol est généralement tamponné pour maintenir un niveau de pH neutre, et lors de sa réaction avec l'oxygène atmosphérique il est facilement oxydé en acide formique. Cette formation d'acide formique réduit le pH du formol.

Les liaisons *N*-glycosidiques entre les bases puriques et le squelette glucidique sont susceptibles à l'hydrolyse à faible pH, générant des sites abasiques dans l'ADN. Étant donné que les ADN polymérase (notamment la Taq polymérase) ont généralement une faible efficacité de contournement au niveau des sites abasiques, ceci empêcherai l'amplification des matrices d'ADN (Bonin et al., 2003 ; Do et Dobrovic., 2015).

C/ La désamination

L'altération chimique la plus fréquemment rencontrée dans l'ADN FFPE est due à la désamination spontanée de la cytosine. Dans les cellules vivantes, cela est réparé par les glycosylases, cependant, de tels événements s'accumulent dans les tissus fixés au formol en raison de l'inactivation de l'enzyme par la fixation.

La cytosine(C) désaminée donne de l'uracile(U), qui s'apparie avec l'adénine au lieu de la guanine(G), et dans le cas de la cytosine méthylée (5-méthylcytosine), sa désamination conduit à la thymine(T) qui s'apparie également avec l'adénine(A). L'un ou l'autre cas conduit à l'altération de l'appariement des bases (**Figure 43**) (Steiert et al., 2023).

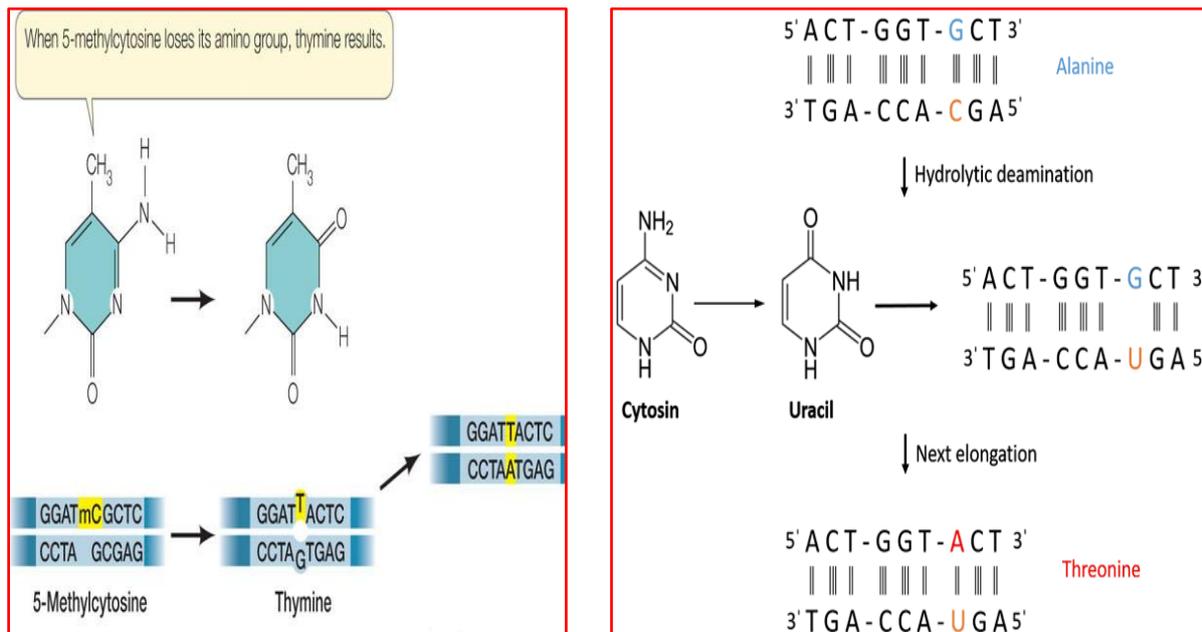


Figure 43: La désamination de la cytosine et la 5-méthyle cytosine.

D/Les réticulation induites par le Formaldéhyde

Le formaldéhyde, principal composant du formol, est un produit chimique qui crée diverses réticulations tel que les adduits protéine-protéine, protéine-ADN, ADN-formaldéhyde, ADN-Histone et les réticulations d'ADN interbrins (**Figure 44**).

Ces adduits d'ADN affaiblissent la force de liaison de l'ADN double brin en réduisant le nombre de liaisons hydrogène, entraînant ainsi une dénaturation partielle de l'ADN (Do et Dobrovic, 2015).

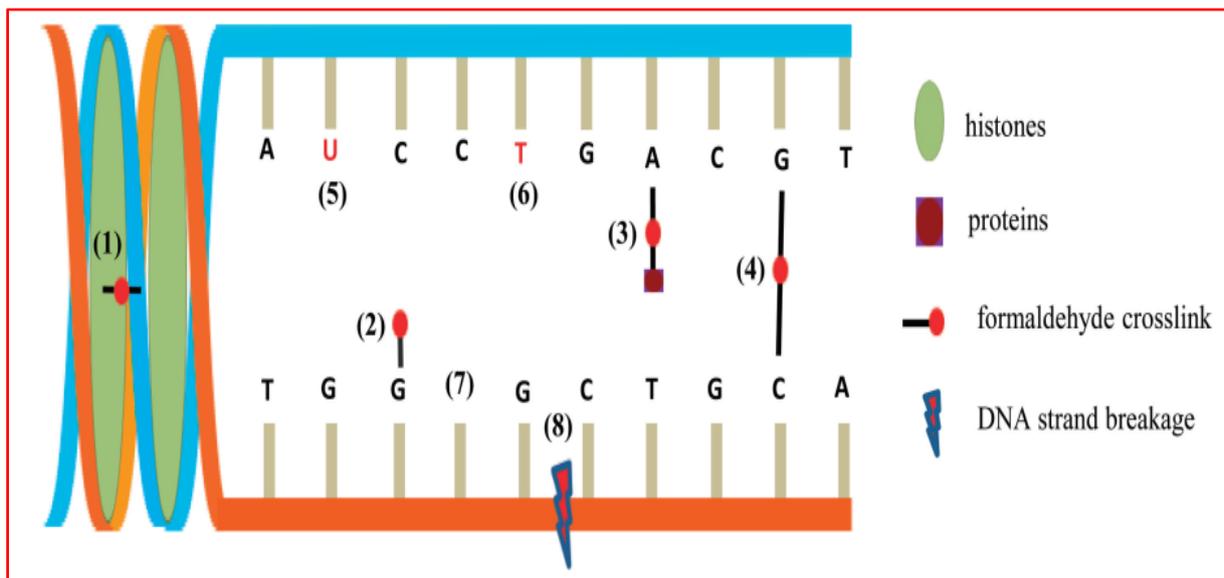


Figure 44: Les Différentes réticulations induites par le formaldéhyde retrouvées dans les tissus FFPE (Do et Dobrovic, 2015). **1** : adduit ADN-Histone. **2** : adduit ADN-formaldéhyde. **3** : adduit protéine-ADN. **4** : adduit ADN-ADN. **5** : désamination de la cytosine. **6** : désamination de la 5m-cytosine. **7**: site Abasique. **8** : fragmentation de l'ADN.

Conclusion

Les mutations KRAS sont largement fréquentes (40%) dans Les cancers colorectaux avancés, par conséquent, leurs dépistage est d'une importance primordiale pour faciliter le diagnostique, orienter les choix thérapeutiques et améliorer la prise en charge des patients.

Au cours de notre étude portant sur les CCRs, nous avons réussi à extraire de l'ADN à partir d'échantillons de tissus FFPE grâce à des optimisations minutieuses qui ont démontré l'importance de la sélection précise de la zone tumorale lors du prélèvement, la réduction de la présence de paraffine, et l'utilisation adéquate de concentrations, de températures et de durées d'incubation avec la protéinase K.

Par la suite, bien que les tentatives ultérieures de détection des mutations Kras par PCR ont été infructueuses, due à divers limitations dont le kit de PCR utilisé qui reste à notre avis l'origine majeure, cependant nos résultats prometteurs en matière d'optimisation d'un protocole d'extraction, ouvrent la voie à de futures recherches visant à améliorer cette détection au niveau de la wilaya de Béjaia, et par conséquent, permettre le profilage individuel du cancer et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la carcinogenèse des CCR.

En raison de l'épuisement de nos réserves d'ADN et de protéinase K qui rendent impossible toute nouvelle extraction, et dans la perspective d'une future suite a notre étude, plusieurs stratégies d'optimisations peuvent être envisagées notamment :

- Déterminer les conditions de cyclage idéaux ainsi que les concentrations optimales des amorces pour chaque réaction de PCR spécifique en effectuant des tests préliminaires avec différentes températures et concentrations en amorces.
- Réduire les concentrations élevées d'ADN par des dilutions appropriées, et tester les échantillons à différentes concentrations.
- Effectuer une électrophorèse avant d'entamer l'amplification de l'ADN afin de vérifier son intégrité et d'éviter le gaspillage du matériel (tissus).
- Explorer de nouveaux kits de PCR.
- Tester sur des échantillons de tumeurs fraîches pour comparer la faisabilité.
- Enfin, il serait encore plus bénéfique d'étendre cette approche aux autres gènes notamment le BRAF, le TP53, l'APC et le PTEN pour un diagnostique des CCR plus optimale.

Références bibliographiques

Références Bibliographiques

A

- *Alan, S., & Lowe, J.S. (2006). HISTOLOGIE Humaine 3ème édition. ELSEVIER. ISBN-10 : 2842997514.
- *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.
- *Amemiya, K., Hirotsu, Y., Nagakubo, Y., Mochizuki, H., Higuchi, R., Tsutsui, T., ... & Omata, M. (2021). Actionable driver DNA variants and fusion genes can be detected in archived cytological specimens with the Oncomine Dx Target Test Multi-CDx system in lung cancer. *Cancer Cytopathology*, 129(9), 729-738.
- *Anecka, A., Adamczyk, A., & Gasińska, A. (2015). Comparison of eight commercially available kits for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Analytical biochemistry*, 476, 8–10.
- *Arcila, M., Lau, C., Nafa, K., & Ladanyi, M. (2011). Detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal carcinoma: Roles for high-sensitivity locked nucleic acid-PCR sequencing and broad-spectrum mass spectrometry genotyping. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 13(1), 64-73.
- *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. *Ecancermedalscience*, 9.
- *Atanesyan, L., Steenkamer, M. J., Horstman, A., Moelans, C. B., Schouten, J. P., & Savola, S. P. (2017). Optimal fixation conditions and DNA extraction methods for MLPA analysis on FFPE tissue-derived DNA. *American journal of clinical pathology*, 147(1), 60-68.
- *Austin, M. C., Smith, C., Pritchard, C. C., & Tait, J. F. (2016). DNA yield from tissue samples in surgical pathology and minimum tissue requirements for molecular testing. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 140(2), 130-133.

B

- *Bedeir, A., & Krasinskas, A. M. (2011). Molecular diagnostics of colorectal cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 135(5), 578-587.
- *Baskar, R., Lee, K. A., Yeo, R., & Yeoh, K. W. (2012). Cancer and radiation therapy: current advances and future directions. *International journal of medical sciences*, 9(3), 193–199.
- *Bessaguet, F., de Bandt, J. P., & Desmoulière, A. (2022). L'intestin grêle et le gros intestin. *Actualités Pharmaceutiques*, 61(613), 53-58.
- *Bogaert, J., & Prenen, H. (2014). Molecular genetics of colorectal cancer. *Annals of gastroenterology*, 27(1), 9.

Références Bibliographiques

*Bonin, S., Petrera, F., Niccolini, B., & Stanta, G. (2003). PCR analysis in archival postmortem tissues. *Molecular pathology : MP*, 56(3), 184–186.

*Boukhari, D. (2015). Recherche des polymorphismes nucléotidiques des gènes de réparation par recombinaison homologue (RAD51, XRCC2 et 3) et risque de cancer du sein chez les femmes algériennes (Doctoral dissertation, Université Mohamed Khider-Biskra).

*Bulliard, J. L., Alhomoud, S., & Hahnloser, D. (2023). Colorectal cancer: Burden, epidemiology and priority interventions. In *Noncommunicable Diseases* (pp. 106-111). Routledge.

*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.

*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.

*Chen, Y., Sang, C., Bian, Z., Zhang, Y., Jiang, E., Zhou, X., Chen, T., Tang, H., & Wang, C. (2021). The Scale, Collections, and Biospecimen Distribution of Grade A Tertiary Hospital Biobanks in China: A National Survey. *Frontiers in medicine*, 7, 560600.

*Chung, J. Y., Yi, J. M., Xie, R., Brown, V., Lee, O., Ahuja, N., ... & Hewitt, S. M. (2012). A pressure cooking-based DNA extraction from archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Analytical biochemistry*, 425(2), 128-134

*Cummings, J. H., & Macfarlane, G. T. (1991). The control and consequences of bacterial fermentation in the human colon. *The Journal of applied bacteriology*, 70(6), 443–459.

D

*Dang, J., Mendez, P., Lee, S., Kim, J. W., Yoon, J. H., ... & Kim, I. J. (2016). Development of a robust DNA quality and quantity assessment qPCR assay for targeted next-generation sequencing library preparation. *International journal of oncology*, 49(4), 1755-1765.

*Dedhia, P., Tarale, S., Dhongde, G., Khadapkar, R., & Das, B. (2007). Evaluation of DNA extraction methods and real time PCR optimization on formalin-fixed paraffin-embedded tissues. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 8(1), 55.

Références Bibliographiques

*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.

*Dey, A., Mitra, A., Pathak, S., Prasad, S., Zhang, A. S., Zhang, H., Sun, X. F., & Banerjee, A. (2023). Recent Advancements, Limitations, and Future Perspectives of the use of Personalized Medicine in Treatment of Colon Cancer. *Technology in cancer research & treatment*, 22, 15330338231178403.

*Dietrich, D., Uhl, B., Sailer, V., Holmes, E. E., Jung, M., Meller, S., & Kristiansen, G. (2013). Improved PCR performance using template DNA from formalin-fixed and paraffin-embedded tissues by overcoming PCR inhibition. *PLoS One*, 8(10), e77771.

*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

*Egum, S., Prabhu, V., Mohanty, V., Upadhyaya, K. K., & Abdulla, R. (2022). Unveiling the arcanum of formalin-fixed paraffin-embedded archival tissue blocks: A valuable resource for genomic DNA extraction. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, 26(2), 289.

*Einaga, N., Yoshida, A., Noda, H., Suemitsu, M., Nakayama, Y., Sakurada, A., ... & Esumi, M. (2017). Assessment of the quality of DNA from various formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues and the use of this DNA for next-generation sequencing (NGS) with no artifactual mutation. *PloS one*, 12(5), e0176280.

*Ellis, L. M. (2006, October). Mechanisms of action of bevacizumab as a component of therapy for metastatic colorectal cancer. In *Seminars in oncology* (Vol. 33, pp. S1-S7). WB Saunders.

F

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

*Fleming, M., Ravula, S., Tatishchev, S. F., & Wang, H. L. (2012). Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *Journal of gastrointestinal oncology*, 3(3), 153-173.

*Franczak, C., Dubouis, L., Gilson, P., Husson, M., Rouyer, M., Demange, J., ... & Harlé, A. (2019). Integrated routine workflow using next-generation sequencing and a fully-automated platform for the detection of KRAS, NRAS and BRAF mutations in formalin-fixed paraffin embedded samples with poor DNA quality in patients with colorectal carcinoma. *PLoS One*, 14(2), e0212801.

Références Bibliographiques

*Franklin, W. A., Haney, J., Sugita, M., Bemis, L., Jimeno, A., & Messersmith, W. A. (2010). KRAS mutation: comparison of testing methods and tissue sampling techniques in colon cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(1), 43-50.

*Funabashi, K. S., Barcelos, D., Visoná, I., e Silva, M. S., de Franco, M. F., & Iwamura, E. S. M. (2012). DNA extraction and molecular analysis of non-tumoral liver, spleen, and brain from autopsy samples: the effect of formalin fixation and paraffin embedding. *Pathology-Research and Practice*, 208(10), 584-591.

G

*Gaffney, E. F., Riegman, P. H., Grizzle, W. E., & Watson, P. H. (2018). Factors that drive the increasing use of FFPE tissue in basic and translational cancer research. *Biotechnic & histochemistry : official publication of the Biological Stain Commission*, 93(5), 373–386.

*Gailey, M. P., Stence, A. A., Jensen, C. S., & Ma, D. (2015). Multiplatform comparison of molecular oncology tests performed on cytology specimens and formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Cancer cytopathology*, 123(1), 30-39.

*Gallot, D. (2009). Anatomie chirurgicale du côlon. Elsevier, Techniques chirurgicales – Appareil digestif, 40-535.

*Gao, X. H., Li, J., Gong, H. F., Yu, G. Y., Liu, P., Hao, L. Q., Liu, L. J., Bai, C. G., & Zhang, W. (2020). Comparison of Fresh Frozen Tissue With Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue for Mutation Analysis Using a Multi-Gene Panel in Patients With Colorectal Cancer. *Frontiers in oncology*, 10, 310.

*Giovannucci, E., & Martinez, M. E. (1996). Tobacco, colorectal cancer, and adenomas: a review of the evidence. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*, 88(23), 1717-1730.

*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

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

*Heydt, C., Fassunke, J., Künstlinger, H., Ihle, M. A., König, K., Heukamp, L. C., Schildhaus, H. U., Odenthal, M., Büttner, R., & Merkelbach-Bruse, S. (2014). Comparison of pre-analytical FFPE sample preparation methods and their impact on massively parallel sequencing in routine diagnostics. *PloS one*, 9(8), e104566.

Références Bibliographiques

*Hlubek, F., & Jung, A. (2011). Fast protocol for DNA extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissues. In *Guidelines for molecular analysis in archive tissues* (pp. 41-43). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

*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.

*Hu, Y. C., Zhang, Q., Huang, Y. H., Liu, Y. F., & Chen, H. L. (2014). Comparison of two methods to extract DNA from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues and their impact on EGFR mutation detection in non-small cell lung carcinoma. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, *15*(6), 2733-2737.

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

J

*Jeroch, J., Riedlinger, T., Schmitt, C., Ebner, S., Winkelmann, R., Wild, P. J., & Demes, M. (2023). A Comparison of Two Different FFPE Tissue Dissection Methods for Routine Diagnostics in Molecular Pathology: Manual Macrodissection versus Automated Microdissection Using the Roche “AVENIO Millisect” System. *Cancers*, *15*(12), 3249.

*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

*Kanat, O., & Ertas, H. (2019). Existing anti-angiogenic therapeutic strategies for patients with metastatic colorectal cancer progressing following first-line bevacizumab-based therapy. *World journal of clinical oncology*, *10*(2), 52.

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

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

*Kerick, M., Isau, M., Timmermann, B., Sülmann, H., Herwig, R., Krobisch, S., ... & Schweiger, M. R. (2011). Targeted high throughput sequencing in clinical cancer settings: formaldehyde fixed-paraffin embedded (FFPE) tumor tissues, input amount and tumor heterogeneity. *BMC medical genomics*, *4*, 1-13.

*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.

Références Bibliographiques

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

*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.

*Kokkat, T. J., Patel, M. S., McGarvey, D., LiVolsi, V. A., & Baloch, Z. W. (2013). Archived formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) blocks: A valuable underexploited resource for extraction of DNA, RNA, and protein. *Biopreservation and biobanking*, 11(2), 101–106.

L

*Lecomte, T., & Goujon, G. (2009). Le syndrome HNPCC/Lynch. *La Lettre de l'Hépatogastroentérologue*, Vol XII - n°6 : 210-214.

*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.

*Lee, K. H., Lee, T. H., Choi, M. K., Kwon, I. S., Bae, G. E., & Yeo, M. K. (2020). Identification of a clinical cutoff value for multiplex KRASG12/G13 mutation detection in colorectal adenocarcinoma patients using digital droplet PCR, and comparison with sanger sequencing and PNA clamping assay. *Journal of clinical medicine*, 9(7), 2283.

*Liu, Y., Wu, B. Q., Zhong, H. H., Hui, P., & Fang, W. G. (2013). Screening for EGFR and KRAS mutations in non-small cell lung carcinomas using DNA extraction by hydrothermal pressure coupled with PCR-based direct sequencing. *International journal of clinical and experimental pathology*, 6(9), 1880–1889.

*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.

*Mancini, I., Santucci, C., Sestini, R., Simi, L., Pratesi, N., Cianchi, F., ... & Orlando, C. (2010). The use of COLD-PCR and high-resolution melting analysis improves the limit of detection of KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(5), 705-711.

Références Bibliographiques

*Marzouk, O., & Schofield, J. (2011). Review of Histopathological and Molecular Prognostic Features in Colorectal Cancer. *Cancers*, 3(2), 2767–2810

*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.

*Miyamae, Y., Shimizu, K., Mitani, Y., Araki, T., Kawai, Y., Baba, M., ... & Takeyoshi, I. (2010). Mutation detection of epidermal growth factor receptor and KRAS genes using the smart amplification process version 2 from formalin-fixed, paraffin-embedded lung cancer tissue. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 12(2), 257-264.

N

*Nagasaka, M., Potugari, B., Nguyen, A., Sukari, A., Azmi, A. S., & Ou, S. H. I. (2021). KRAS Inhibitors—yes but what next? Direct targeting of KRAS—vaccines, adoptive T cell therapy and beyond. *Cancer Treatment Reviews*, 101, 102309.

*Nair, S. U. M. A. (2017). Colorectal cancer and its risk factors among patients attending a tertiary care hospital in Southern Karnataka, India. *Asian J Pharm Clin Res*, 10(4), 109-112.

*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.

*Nguyen, H. T., Tatipamula, V. B., Do, D. N., Huynh, T. C., & Dang, M. K. (2022). Retrieving high-quality genomic DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues for multiple molecular analyses. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 52(1), 48–55.

O

*Obi, E. N., Tellock, D. A., Thomas, G. J., & Veenstra, T. D. (2023). Biomarker Analysis of Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Clinical Tissues Using Proteomics. *Biomolecules*, 13(1),96.

P

*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.

*Patel, P. G., Selvarajah, S., Guérard, K. P., Bartlett, J. M. S., Lapointe, J., Berman, D. M., Okello, J. B. A., & Park, P. C. (2017). Reliability and performance of commercial RNA and DNA extraction kits for FFPE tissue cores. *PloS one*, 12(6), e0179732.

Références Bibliographiques

*Pikor, L. A., Enfield, K. S., Cameron, H., & Lam, W. L. (2011). DNA extraction from paraffin embedded material for genetic and epigenetic analyses. *JoVE (Journal of Visualized Experiments)*, (49), e2763.

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

*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.

*Plessec, T. P., & Hunt, J. L. (2009). KRAS mutation testing in colorectal cancer. *Advances in anatomic pathology*, 16(4), 196-203.

*Polz, M. F., & Cavanaugh, C. M. (1998). Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Applied and environmental Microbiology*, 64(10), 3724-3730.

*Potluri, K., Mahas, A., Kent, M. N., Naik, S., & Markey, M. (2015). Genomic DNA extraction methods using formalin-fixed paraffin-embedded tissue. *Analytical biochemistry*, 486, 17-23.

R

*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

*Saif, M. W. (2013). Anti-VEGF agents in metastatic colorectal cancer (mCRC): are they all alike?. *Cancer Management and Research*, 103-115.

*Sakai, K., Yoneshige, A., Ito, A., Ueda, Y., Kondo, S., Nobumasa, H., Fujita, Y., Togashi, Y., Terashima, M., De Velasco, M. A., Tomida, S., & Nishio, K. (2015). Performance of a novel KRAS mutation assay for formalin-fixed paraffin embedded tissues of colorectal cancer. *SpringerPlus*, 4(1), 7

*Santis, G., Angell, R., Nickless, G., Quinn, A., Herbert, A., Cane, P., ... & Tobal, K. (2011). Screening for EGFR and KRAS mutations in endobronchial ultrasound derived transbronchial needle aspirates in non-small cell lung cancer using COLD-PCR. *PLoS One*, 6(9), e25191.

*Segal, N. H., & Saltz, L. B. (2009). Evolving treatment of advanced colon cancer. *Annual review of medicine*, 60, 207-219.

*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), 494–499.

Références Bibliographiques

*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.

*Soltani, G., Poursheikhani, A., Yassi, M., Hayatbakhsh, A., Kerachian, M., & Kerachian, M. A. (2019). Obesity, diabetes and the risk of colorectal adenoma and cancer. *BMC endocrine disorders*, 19(1), 1-10.

*Steiert, T. A., Parra, G., Gut, M., Arnold, N., Trotta, J. R., Tonda, R., ... & Forster, M. (2023). A critical spotlight on the paradigms of FFPE-DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, gkad519.

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

*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

*Swiderska, M., Choromańska, B., Dąbrowska, E., Konarzewska-Duchnowska, E., Choromańska, K., Szczurko, G., Myśliwiec, P., Dadan, J., Ladny, J. R., & Zwierz, K. (2014). The diagnostics of colorectal cancer. *Contemporary oncology (Poznan, Poland)*, 18(1), 1–6.

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.

*Tsang, A. H. F., Cheng, K. H., Wong, A. S. P., Ng, S. S. M., Ma, B. B. Y., Chan, C. M. L., ... & Wong, S. C. C. (2014). Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, 20(14), 3847.

V

*Vara, J. Á. F., Casado, E., de Castro, J., Cejas, P., Belda-Iniesta, C., & González-Barón, M. (2004). PI3K/Akt signalling pathway and cancer. *Cancer treatment reviews*, 30(2), 193-204.

X

*Xie, Y. H., Chen, Y. X., & Fang, J. Y. (2020). Comprehensive review of targeted therapy for colorectal cancer. *Signal transduction and targeted therapy*, 5(1), 22.

Références Bibliographiques

Y

*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.

*Zhao, B., Wang, L., Qiu, H., Zhang, M., Sun, L., Peng, P., Yu, Q., & Yuan, X. (2017). Mechanisms of resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Oncotarget*, 8(3), 3980–4000.

*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

Références Numériques :

The Global Cancer Observatory <<<https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-pie>>>

Annexes

Annexes

Annexes 1 : Matériels et produits utilisé pour l'étude anatomopathologique.

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 : Eukitt.

Annexe 2 : Les étapes d'enrobage détaillées.

- Préchauffé légèrement à 60°C des moules métalliques ;
- Ouvrir les cassettes contenant les fragments tissulaires qui sont bien rigides, et avec l'aide d'une pince prélevé ces derniers ;
- Déposer les échantillons dans les moules puis faire couler de la paraffine fondu dessus ;
- Appuyer sur les fragments avec les doigts pour bien les étaler et donc ainsi les fixer, et rajouter dessus de la paraffine fondue encore une fois, par la suite recouvrir avec les cassettes et déposer les moules sur la plaque froide.



Annexes

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

Téléphone : 034 18 36 80/03 Fax : 034 18 3731 Email : Anapath-bejaia06@outlook.fr

Adresse : annexe de Sidi Ali Lebhar .CTWS. Bejaia

Annexes

Annexe 5 : Matériels et réactifs utilisé pour l'extraction de l'ADN à partir des tissus FFPE.

Matériels utilisés	réactifs
-haute. -Plaque Agitatrice. -Barreaux magnétiques. -PH mètre. -Balance. -Centrifugeuse. -Vortex. -Incubateur. -Spectrophotomètre Biodrop -Micropipettes.. -Embouts. -Tubes Eppendorf 1.5mL. -La verrerie (Flacons, Eprouvettes, fioles joggé, verres de montre, pissettes, portoirs, Bêchers).	-Tris base. -EDTA. -Nacl. -SDS. -Hcl. -NaOH. -Xylène. -Ethanol (100% / 75% / 50%). -Protéinase K. -Eau distillé. -Isopropanol 100%.

Annexe 6 : Calculs réalisés en vue de la préparation de toutes les solutions requises pour l'extraction de l'ADN.

Solutions	Préparation
1/ Alcools	-Les dilutions d'alcool ont été préparées en appliquant l'équation suivante : $C1 \quad x \quad V1 \quad = \quad C2 \quad x \quad V2$ Donc: $V1 = C2 \times V2 / C1$ <p>*Alcool 70% Préparer l'éthanol 70% en ajoutant 27.09 ml d'eau distillé a 72.91 ml d'alcool 96% afin d'avoir un volume finale de 100ml.</p> $96 \% \quad x \quad V1 \quad = \quad 70 \% \quad x \quad 100ml$ $V1 = 72.91 \text{ ml alcool } 96\% + 27.09 \text{ ml eau distillé} = 100ml$ <p>*Alcool 50 % Préparer en mélangeant 52.08 ml d'alcool 96% à 47.92 ml d'eau distillé.</p>

Annexes

<p>2/ Nacl 6M</p>	<p>* Masse molaire de NaCl : $M = 58.44 \text{ g/mol}$</p> <p>Afin de préparer un volume de 30 ml de Nacl a 6M :</p> $C = n/V$ $n = C \times V$ $M = 58.44 \text{ g/mol}$ $V = 30 \text{ ml} = 0.03 \text{ L}$ $C = 6 \text{ M}$ <p>Donc :</p> $n = 6 \times 0.03 = 0.18 \text{ mol}$ $n = m/M$ $m = n \times M$ $m = 0.18 \text{ mol} \times 58.44 \text{ g/mol}$ <p>-m = 10.5192 g -de ce fait, mélangé 10.5192 g de Nacl avec 30 ml d'eau distillé.</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 nous avons commencé par préparer des solutions stocks pour chaque composant du Tapon.</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> $n = c \times v$ $n = 0.1 \text{ M} \times 0.05 \text{ L} = 0.005 \text{ mol}$ $m = n \times M$ $m = 0.005 \text{ mol} \times 121.14 \text{ g/mol} = 0.6057 \text{ g}$ <p>*donc, la solution stock sera composé de : 0.6057 g de Tris + 50 ml d'eau distillé</p> <p>*pour cela : diluer 0.6057 grammes de Tris dans 40 ml d'eau distillé, puis ajuster le PH avec du Hcl tout en agitant sur une plaque agitatrice.</p> <p>Quand le Tris va atteindre un PH = 7.5, rajouter les 10 mL d'eau distillé restante afin d'obtenir un volume finale de 50 ml.</p>

Annexes

<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>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, la solution stock sera composé de : 4.3836 g d'EDTA + 50 ml d'eau distillé</p> <p>*Ajouter 4.3836 grammes d'EDTA à 50 ml d'eau distillé, puis ajuster le PH avec 02 pastilles de Naoh, l'équivalent de 1g, tout en agitant sur une plaque agitatrice.</p> <p>Lorsque l'EDTA atteint le PH 8, elle se dissout complètement.</p> <p>C- 100mL de solution de stock Nacl (0.1 M) :</p> <p>*Masse molaire du Nacl : $M = 58.44 \text{ g/mol}$</p> <p>$n = c \times v$ $n = 0.1 \text{ M} \times 0.1 \text{ L} = 0.01 \text{ mol}$ $m = n \times M$ $m = 0.01 \text{ mol} \times 58.44 \text{ g/mol} = 0.5844 \text{ g}$</p> <p>*donc, la solution stock sera composé de : 0.5844 g de Nacl + 100 ml d'eau distillé</p> <p>*donc : diluer 0.5844 grammes de Nacl dans 100 ml d'eau distillé tout en agitant sur une plaque agitatrice.</p> <p>2/Après avoir fini la préparation des solutions stocks, on procède au mélange des 03 réactifs afin d'obtenir 100mL de Tampon de Lyse.</p> <p>-dans le but de préparer 100mL de ce Tampon, il faudrait d'abord déterminer les volumes à rajouter de chaque Solution Stock pour obtenir les concentrations indiquées dans le protocole. et cela as été réalisé en appliquant la loi suivante :</p> <p>$C1 \times V1 = C2 \times V2$</p> <p>*Tris C1 : concentration stock Tris (1M) =100 mM V1 : volume stock Tris qu'on prendra ??</p>
---	---

Annexes

C2 : concentration du Tris avec lequel on travail (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 du EDTA avec lequel on travail (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 travail (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 le tampon de lyse est composé de :

50 mL de Nacl + 33.33 mL EDTA + 10 mL Tris = 93.33 mL

$100 - 93.33 = 6.67$

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

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

Annexes

Annexe 7 : Le rapport reçu de la part du fournisseur des Amorces.

eurofins		Oligonucleotide Synthesis Report										Seite 1 von 2
Meriem Zaouch-Mehelleb Pharmacie Wallace Pharmacie		Order ID: 8447869/11108447869-1		Order Date: 26.05.2023 13:40:32		Eurofins Genomics Anzinger Straße 7a D-85560 Ebersberg						
		Customer ID: 1353410		Lab No: 5242								
		Your Order ID (PO#): 2		No of Oligos: 6/6								
No	Oligo Name	Sequence (5'->3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Conc. [pmol/µl]	Vol. for 100 pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Barcode IDO	QC Report
1	F-ACTB	CATGTACGTTGCTATCC AGGC	15.53	450.94	70.49		705	59.8	6397.15	52%		QCReport Free
2	R-ACTB	CTCCTTAATGTCACGCA CGAT	17.75	512.11	80.76		808	57.9	6341.12	48%		QCReport Free
3	F-Kras	AAGGCCTGCTGAAAATG ACTG	11.32	299.60	46.24		462	57.9	6479.25	48%		QCReport Free

No	Oligo Name	Sequence (5'->3')	Yield [OD]	Yield [µg]	Yield [nmol]	Conc. [pmol/µl]	Vol. for 100 pmol/µl	Tm [°C]	MW [g/mol]	GC-Content	Barcode IDO	QC Report
4	R-Kras	GTCCTGCACCAGTAATA TGC	16.38	463.43	76.26		763	57.3	6076.96	50%		QCReport Free

Annexe 8 : Préparation de 100 ml d'un gel d'agarose à 4%.

- Mélanger 04 gramme d'agarose avec 100ml de TAE 1X.
- Préchauffer au micro-onde pendant 1 min.

Annexe 9 : Préparation du tampon de migration TAE 1x.

- Préparer d'abord un Tampon de TAE 5x selon les étapes suivantes :
- Mélanger 24.25g de Tris base avec 5.7 ml d'Acide Acétique et 10 ml d'EDTA (0.5M, PH=8) puis compléter avec de l'eau distillé jusqu'à l'obtention d'un volume de 500ml.
- Pour avoir 01 Litre du Tampon TAE 1X il suffit de diluer par un facteur de 5 le TAE 5X, donc prendre 200 mL du TAE 5X et rajuster le volume jusqu'à 1000mL avec de l'eau distillé.

Résumé

Le cancer colorectal (CCR) est une maladie caractérisée par une grande hétérogénéité moléculaire, ce qui rend son diagnostic d'une importance capitale pour orienter les choix thérapeutiques ultérieurs.

Dans cette étude, nous avons entrepris une analyse anatomopathologique des CCR visant à déterminer leurs types histologiques, leurs degré d'infiltration, ainsi que les facteurs histopronostiques essentiels pour la prise en charge médicale notamment la présence d'embolies vasculaires, d'engainements périnerveux et de métastases ganglionnaires.

Par ailleurs, Parmi les altérations moléculaires fréquemment observées dans les CCRs, les mutations du gène KRAS sont prédominantes, affectant environ 40 % des cas de CCR métastatique (CCRm). Dans cette optique, nous avons réussi à extraire de l'ADN à partir d'échantillons de tissus FFPE, grâce à des optimisations minutieuses qui ont mis en évidence l'importance cruciale de la sélection précise de la zone tumorale lors des prélèvements, de la réduction de la paraffine, ainsi que de l'utilisation appropriée de la protéinase K, en terme de concentrations, températures, et durées d'incubation.

Par la suite, dans le cadre de la détection de ces mutations KRAS, nous avons réalisée une PCR pour assurer une amplification spécifique de la séquence de l'exon 2 du gène, connue pour être la région la plus fréquemment muté. Cependant les résultats de cette PCR se sont avérés non concluants, ce qui pourrait être expliqué par plusieurs hypothèses à savoir des concentrations inadéquates en amorces et en ADN, une éventuelle fragmentation de l'échantillon d'ADN, ainsi qu'un kit de PCR présentant des défaillances.

Mots-Clés : Cancer Colorectal, Etude anatomopathologique, Extraction d'ADN, KRAS, PCR.

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is a disease characterized by a significant molecular heterogeneity, making its diagnosis of a critical importance in guiding future therapeutic choices.

In this study, we performed an anatomopathological analysis of CRCs to determine their histological types, degree of infiltration, and histopronostic factors that are essential for the medical care of the disease, including the presence of vascular emboli, perineural sheathing and lymph node metastases.

Moreover, among the molecular alterations frequently observed in CRC, KRAS gene mutations are predominant, affecting around 40% of metastatic CRC (mRCC). With this in mind, we succeeded in extracting DNA from FFPE tissue samples through meticulous optimizations that highlighted the crucial importance of a precise selection of the tumor area during sampling, paraffin reduction, as well as the appropriate use of proteinase K in terms of concentrations, temperatures, and incubation times.

Then, in order to detect these KRAS mutations, we performed a PCR to ensure a sequence-specific amplification of the exon 2 of the gene, known to be the most frequently mutated region. However, the results of this PCR turned out to be non-conclusive, which could be explained by several hypotheses such as inadequate primer and DNA concentrations, a potential fragmentation of the DNA sample, and a deficient PCR kit.

Key words: Colorectal cancer, anatomopathological study, DNA extraction, KRAS, PCR.

ملخص

يعتبر سرطان القولون و المستقيم (CRC) مرض يتميز بتنوع جزيئي كبير، مما يجعل تشخيصه أمرا حاسما لتوجيه العلاجات اللاحقة. في هذه الدراسة قمنا بتحليل تشريحي لأورام CCR بهدف تحديد أنواعها النسيجية ودرجة اختراقها، بالإضافة إلى العوامل الهيستوبرونستية الأساسية للعناية الطبية، بما في ذلك وجود الصمات الوعائية، الأغماد المحيطة بالأعصاب و انتشار في العقد اللمفاوية.

بالإضافة لذلك من بين التغيرات الجزيئية الشائعة في CCR، تعتبر طفرات جين KRAS الأكثر انتشارا، حيث تأثر على حوالي 40 % من حالات mCCR النقلي. بهذا السياق، نجحنا في استخراج الحمض النووي من عينات أنسجة FFPE من خلال تحسينات دقيقة كشفت عن أهمية اختيار منطقة الورم أثناء أخذ العينات، تقليل كمية الشمع، واستخدام البروتيناز K بشكل مناسب من حيث التراكيز، درجات الحرارة و أوقات التفاعل.

بعد ذلك، في سياق اكتشاف هذه الطفرات KRAS أجرينا PCR بهدف تضخيم محدد لتسلسل الاكسون 2 الذي يعتبر المنطقة الأكثر تحولا بشكل شائع. ومع هذا، كانت النتائج غير حاسمة، ويمكن تفسير ذلك من خلال عدة فرضيات من بينها، تراكيز غير مناسبة للحمض النووي و البادئات، واحتمال تجزئة ADN، بالإضافة الى وجود خلل في مجموعة PCR.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم ، الدراسة التشريحية ، استخراج الحمض النووي ، KRAS ، PCR.