

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université des Frères Mentouri Constantine  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Animale

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
كلية علوم الطبيعة والحياة  
قسم بيولوجيا الحيوان

Mémoire présenté en vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie  
Filière : Sciences Biologiques  
Spécialité : *Génétique*

N° d'ordre :  
N° de série :

Intitulé :

---

Etude de l'association entre le polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 et le  
risque du cancer colorectal

---

Présenté et soutenu par : KHEBBAB Inès  
BOUFLIGHA Asma

Le 10/07/2019

Jury d'évaluation :

**Président :** Dr GHERZOULI- FERTOUL Razika (MCA-Université des Frères Mentouri, Constantine 1).  
**Encadreur :** Dr SEDRATI- ZAAF Khadidja (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).  
**Examineur :** Dr ZIADA-BOUCHAAR Hadia (MCB- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

Année universitaire  
2018 - 2019



## DÉDICACES

*Aux deux êtres qui me sont très cher, ceux qui ont fait que je sois ici aujourd'hui... Eh oui, ma maman Samira et mon papa Saïd, vous qui m'avez élevé et éduqué... vous qui avez toujours été là pour moi et n'avez jamais cessé de croire en moi, aucun mot ni aucune langue ne pourrait exprimer ma profonde gratitude à votre égard.*

*A mes très chères sœurs : Meriem ,Amina*

*A mes très chères nièces et neveux :Cheith ,Dani-Ouways , Dana-Sidra.*

*A toute ma famille .*

*A mon binôme Asma et sa famille .*

*A tous mes amis,*

*A tous ceux qui ont veillé à mon instruction*

*A tous ceux que j'aime et qui m'aiment*

*Avec l'expression de tous mes sentiments et mon respect, Je dédie ce modeste travail.*

*Inès*

***A mon très cher papa « smail » A mon adorable  
maman « zabida »***

*Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond amour, estime et respect que j'ai pour vous, Je ne trouverai jamais de mots pour vous 'exprimer mon profond attachement et ma reconnaissance pour l'amour, la tendresse et pour l'éducation que vous m'avez inculquée et surtout pour tous les sacrifices que vous avez consenti. Ce travail est votre œuvre, vous qui m'avez donné tant de choses et continuez à le faire. Une vie entière ne suffirait à vous rendre cet amour. Si j'en suis arrivée là, ce n'est que grâce à vous. J'ai la fierté d'être votre fille.*

*Que Dieu vous protège et vous prête longue vie. Je vous 'aime très fort.*

***A mon mari « zaki »***

*Nul mot ne saurait exprimer la profondeur de mes sentiments et l'estime que j'ai pour toi. Ton amour pour moi est un don de Dieu. Tu m'as toujours soutenue, comprise et réconfortée. Tu es et tu resteras toujours ma source d'inspiration. Merci pour ta tendresse, ton attention, ta patience et tes encouragements. Merci pour tout. Puisse Dieu nous combler de bonheur, de santé et nous procurer longue vie.*

***A mes sœurs : Meyada, Nabila et Soria***

***A mes frères : Zinou , Hakou et Nabil***

***A toute ma famille boufligha et ma belle-famille kheris***

*Aucun langage ne saurait exprimer mon respect et ma considération pour votre soutien et encouragements. Je vous dédie ce travail en reconnaissance de l'amour que vous m'offrez quotidiennement et votre bonté exceptionnelle. Que Dieu le Tout Puissant vous garde et vous procure santé et bonheur.*

***A mon binôme Inès ; A mes amies surtout oumnia***

*En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur. Que notre amitié reste éternelle.*

**ASMA**

## *Remerciement*

*Louange à Allah tout puissant qui nous a guidées pour l'accomplissement de ce modeste travail.*

*Nous remercions notre professeur Mme SATTA Dallila de l'université des frères Mentouri Constantine 1 pour sa précieuse aide et de n'avoir négligé aucun effort pour nous apporter soutien et recommandation. Ses précieux conseils et ses qualités de rigueurs scientifiques ont largement contribué à notre formation.*

*Nous remercions Monsieur Rezgoune Mouhamed Larbi pour son soutien, ses conseils, sa générosité pendant tout le parcours universitaires.*

*Nos remerciements s'adressent particulièrement à notre encadreur Mme SEDRATI Khadija qui a bien voulu diriger ce sujet. Pour son aide, sa disponibilité et ses encouragements jusqu'à la finalisation de ce travail. Qu'il daigne recevoir nos sentiments de gratitude et de profond respect.*

*Nous remercions les membres du jury Mme GHARZOULI Razika et Mme ZIADA Hadia d'avoir accepté d'examiner ce travail et participer à la commission de jury afin de le juger. Qu'ils en soient louablement gratifiés.*

*Nous remercions l'ensemble de nos enseignants pour la qualité de l'enseignement tout au long de notre cursus universitaire.*

*Au terme de notre cycle d'études, il nous paraît opportun de nous acquitter d'un devoir noble, celui de remercier tous ceux qui ont contribué par leur assistance tant morale que physique à notre cursus universitaire et à la réalisation de ce mémoire.*

*Nous remercions toutes les personnes qui nous ont aidées de près ou de loin pour la réalisation de notre travail.*

**Remerciement et dédicaces**

**Liste des abréviations**

**Liste des figures**

**Liste des tableaux**

## **Table des matières**

**Introduction.....1**

### **I. Partie bibliographique**

#### **Chapitre1 : Le cancer colorectal**

<b>1. Définition.....</b>	<b>2</b>
<b>2. Epidémiologie.....</b>	<b>2</b>
<b>3. Les différents types de cancer colorectal.....</b>	<b>3</b>
<b>3.1 Les adénocarcinomes .....</b>	<b>3</b>
<b>3.2 Les cancers colorectaux rares.....</b>	<b>4</b>
<b>3.3 Les métastases colorectales.....</b>	<b>4</b>
<b>4. La progression et diffusion de la maladie.....</b>	<b>4</b>
<b>4.1 Les adénomes .....</b>	<b>5</b>
<b>4.2 Les syndromes du CCR héréditaires.....</b>	<b>6</b>
<b>5. La classification des tumeurs selon le mode de progression .....</b>	<b>7</b>
<b>6. La génétique du cancer colorectal .....</b>	<b>8</b>
<b>6.1 L'instabilité chromosomique (CIN) .....</b>	<b>9</b>
<b>6.2 L'instabilité génétique ou microsatellitaire (MSI) .....</b>	<b>10</b>
<b>6.3 Hyperméthylation des îlots CpG .....</b>	<b>11</b>
<b>7. Les symptômes.....</b>	<b>12</b>
<b>8. Le Diagnostic.....</b>	<b>13</b>
<b>8.1 Clinique.....</b>	<b>13</b>
<b>8.2 Coloscopique .....</b>	<b>13</b>
<b>8.3 Autres examens.....</b>	<b>13</b>
<b>9. Le pronostic.....</b>	<b>14</b>
<b>10.Le traitement .....</b>	<b>15</b>

#### **Chapitre2 : La protéine p53**

<b>1. Historique .....</b>	<b>16</b>
<b>2. Le gène p53 .....</b>	<b>16</b>



3. La protéine p53.....	17
4. Les Fonctions de la p53.....	18
4.1 La régulation du cycle cellulaire .....	18
4.2 L'apoptose .....	19
4.3 La réparation de l'ADN .....	19
5. Les mutations et polymorphisme de la p53.....	20
5.1 Les mutations de la p53 .....	20
5.2 Les Polymorphisme de la p53.....	21
6. l'impact du polymorphisme Arg72Pro sur la protéine .....	23
7. Le Fonctionnement de la protéine.....	23
8. La relation entre le polymorphisme Arg72Pro et le CCR.....	24

## II. Patients et méthodes

1. La population d'étude.....	25
2. La méthodologie.....	25
2.1 Recueil de l'ADN.....	25
2.2 L'amplification de l'ADN par PCR.....	26
2.3 Le contrôle des produits par PCR.....	27
2.4 La digestion enzymatique des produits de PCR.....	28
2.5 L'électrophorèse des produits de digestion.....	29
2.6 L'étude statistique analytique.....	29
2.6.1 Le Calcul de l'odds Ratio.....	29
2.6.2 Le Choix de la <i>p-value</i> .....	30

## III. Résultats

1. Le profil électrophorétique du polymorphisme Arg72Pro ...	31
2. L'étude analytique du profil génotypique .....	31
2.1 Dans la population témoins.....	32
2.2 Dans la population des patients.....	33

2.3 La Comparaison entre témoins et malades.....	35
3. L'Analyse statistique des résultats.....	36
IV. Discussion.....	38
V. Conclusion.....	40

**Références bibliographique**

**Annexe**

**Résumé**

# *Abréviations*

## Abréviations

ACE: Antigène Carcino-embryonnaire

APC : Polypose Adénomateuse Coli.

BAX : *Bcl2 associated X protein.*

BET: Bromure d'éthidium

CCR: Cancer Colorectal.

CIMP: *CpG Island Methylator PhenotypeCF.*

CIN : *Chromosomal instability.*

FNS : Formule Numération Sanguine

IC : Intervalle De Confiance

INCa : Institut National Du Cancer

LDH : Lactate Déshydrogénase

MMR : *Miss Match Repair.*

MSI : *Microsatellite Instability*

NES : *Nuclear Export Signal*

NLS : *Nuclear Localisation Signal*

P value : Valeur de Probabilité

P53 : Protéine 53.

PAF : Polypose Adénomateuse Familiale

Pb : Paire De Base

PCR : Polymérase Chain Reaction .

RFLP : *Restriction Fragment Length Polymorphism.*

SNP: *Single Nucléotide Polymorphismes.*

SV 40 : *Virus simien 40.*

TAD : *Transcription Activation Domaine*

TBE: Tris Borate EDTA

TNM: Tumor, Nodes, Metastases.

*Liste des  
figures*

Figure 01 : L'incidence du CCR dans le monde selon une distribution hommes et femmes .....	<b>3</b>
Figure 02 : Carcinogénèse colique selon le modèle de volgstein .....	<b>6</b>
Figure 03 : stades du CCR selon l'institut national du cancer.....	<b>7</b>
Figure 04 : Répartition des différents types de cancers colorectaux.....	<b>9</b>
Figure 05 : Phénotype MSI mis en évidence par amplification de 5 marqueurs .....	<b>10</b>
Figure 06 : Mécanismes d'inactivation de la transcription.....	<b>11</b>
Figure 07 : Structure du gène p53.....	<b>17</b>
Figure 08 : Structure de la p53 .....	<b>17</b>
Figure 09 : Régulation du cycle cellulaire.....	<b>19</b>
Figure 10 : Activité de la p53.....	<b>20</b>
Figure 11 : Fréquence des cancers dans le monde et relation avec le taux de mutation du gène de la p53 .....	<b>20</b>
Figure 12 : Fréquence des transversions G:C → T:A (A) et des transitions G:C → A:T (B).	<b>22</b>
Figure 13 : Différents polymorphismes du gène p53.....	<b>23</b>
Figure 14 : Contrôle des produits PCR de la p53.....	<b>28</b>
Figure 15 : Site de restriction de l'enzyme <i>Bsh1236I</i> .....	<b>28</b>
Figure 16 : Profil électrophorétique sur gel d'agarose des fragments issus par le clivage du BSH1236I présentant différents génotypes de p53.....	<b>31</b>
Figure 17 : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins.....	<b>32</b>
Figure 18 : Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins.....	<b>33</b>
Figure 19 : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.....	<b>34</b>

Figure 20 : Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.....	<b>34</b>
Figure 21: Comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades.....	<b>35</b>
Figure 22 : Comparaison des fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malade.....	<b>36</b>



*Liste des  
tableaux*

Tableau 01 : Comparaison des systèmes de stadification de TNM et de Dukes pour le CRC.....	<b>8</b>
Tableau 02 : Mélange réactionnel de PCR.....	<b>26</b>
Tableau 03 : Mix de digestion.....	<b>29</b>
Tableau 04 : Tableau de contingence.....	<b>29</b>
Tableau 05 : Fréquence allélique et génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoin.....	<b>32</b>
Tableau 06 : Fréquence allélique et génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malade.....	<b>33</b>
Tableau 07 : Fréquence génotypique du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades.....	<b>36</b>

# *Introduction*

Le cancer colorectal (CCR) est considéré comme une tumeur maligne provenant de la paroi interne du gros intestin. Chez les hommes, le cancer colorectal est le troisième cancer en importance (746 000 cas, 10,0% du total) et le deuxième chez les femmes (614 000 cas, 9,2% du total) dans le monde (Ferlay et *al.*,2013 ; Bray et *al.*,2013)

Des études épidémiologiques ont établi que le CCR est associé à des facteurs familiaux et héréditaires, à l'âge ainsi qu'à des facteurs de risque liés à l'environnement et au mode de vie, tels que l'obésité, l'inactivité physique, la consommation d'alcool et le tabagisme ainsi que d'autres facteurs génétiques (Hagggar et Boushey.,2009 ;Tsong et *al.*,2007 ;Zisman et *al.*,2006)

Parmi ces derniers, le gène suppresseur de tumeur p53 qui représente un puissant candidat à moduler le risque de cancer est l'un des gènes les plus fréquemment muté dans tous les types de cancers (Dans 50 % des cancers humains) (Hollstein et *al.*,1991).

Le gène p53 situé sur le chromosome 17p13, codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53. En effet, cette protéine est un facteur de transcription qui joue un rôle central dans la réponse à divers types de stress en régulant l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence, l'apoptose ou encore la réparation de l'ADN (Levine et *al.*, 2006).

Plusieurs polymorphismes du gène p53 ont été décrits ; parmi eux le polymorphisme Arg72Pro qui entraîne une substitution d'une Pro en Arg. La variante Arg est connue pour être un inducteur de l'apoptose plutôt que la variante Pro. (Pim et Banks.,2004 ; Whibley et *al.*,2009)

Par conséquent, l'absence de proline induisait un cancer. Plusieurs études ont montré l'association du risque de CCR avec l'allèle Pro.

Dans ce contexte nous avons opté pour les objectifs suivants :

- maîtriser les outils et les techniques de base de biologie moléculaire telle que la PCR-RFLP.
- étudier la distribution du polymorphisme Arg72Pro du gène p53 dans un échantillon de la population algérienne.
- établir une relation entre le polymorphisme du codon 72 du gène p53 et la survenue du cancer colorectal.

*Partie*  
*bibliographique*

## I. Le cancer colorectal

### 1. Définition

Le cancer colorectal (CCR) est une tumeur maligne qui prend naissance et se développe dans le côlon (la partie la plus longue du gros intestin) et /ou le rectum (les derniers centimètres du gros intestin avant l'anus) (ESMO and Le Fonds Anticancer, 2014).

Le côlon et le rectum font partie du gros intestin et de l'appareil digestif. Le côlon absorbe l'eau et les éléments nutritifs et achemine les résidus (selles, ou matières fécales) au rectum. Les cancers du côlon et du rectum sont regroupés dans la catégorie cancer colorectal puisque ces organes sont faits des mêmes tissus et qu'il n'y a pas de limite claire entre eux (ESMO and Le Fonds Anticancer, 2014).

### 2. Epidémiologie

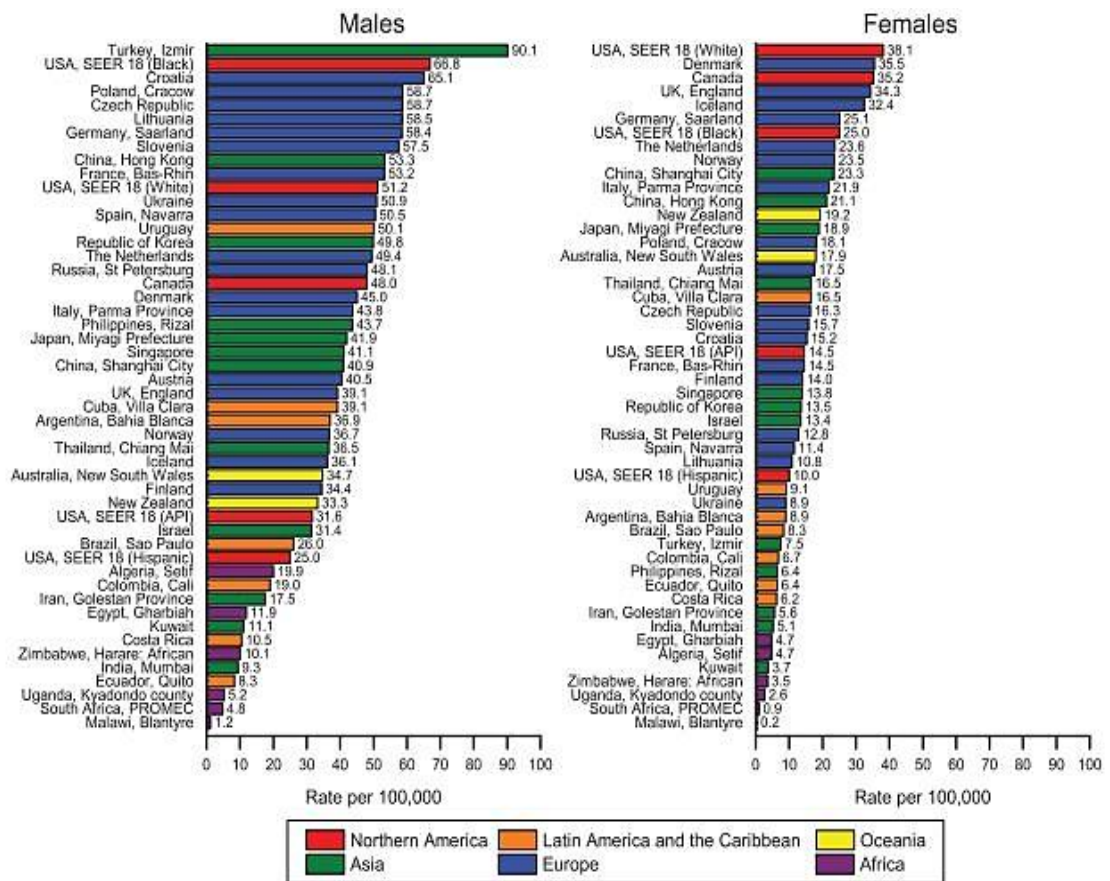
Le CCR est le troisième cancer le plus répandu dans le monde, avec 1,2 million de nouveaux cas estimés (Ferlay et *al.*,2013). Dans le monde, le taux d'incidence du cancer colorectal varie considérablement entre les différentes régions du monde, Les pays à forte incidence (> 40/100 000 habitants) sont les États-Unis, le Canada, l'Australie, la Nouvelle-Zélande et certaines régions d'Europe (République tchèque et Slovaquie); alors que les pays à faible incidence, avec des taux relativement diminués, sont essentiellement l'Inde, l'Égypte et le centre-est de l'Afrique (Jemal et *al.*,2016).

Outre, le CCR voit son incidence et sa mortalité diminuer régulièrement. Le taux de survie nette à 5 ans est de 63 % en 2015. Il constitue la deuxième cause de décès par cancer en France et représente près de 12 % de l'ensemble des décès par cancer, en particulier chez les 65 ans et plus. Toutefois, la mortalité diminue régulièrement depuis 1980. (Anne-Marie Bouvier.,2009).

En Algérie la fréquence du CCR est en constante augmentation et se place actuellement à la tête des cancers digestifs. Selon le registre du cancer de Sétif, durant la période de 2006 jusqu'à 2010, l'incidence standardisée du cancer en Algérie était estimée à 106.4/100.000 chez l'homme et à 110.3/100.000 chez la femme (Abid., 2009).

En 2014, selon le Pr. Hamdi Cherif, le nombre de nouveaux cas était de 41250 (18710 chez l’homme et 22540 chez la femme) soit des taux d’incidence brute de 99.2 et 112.7 et d’incidence standardisée de 118.4 et 136.0 respectivement chez l’homme et la femme.

L’incidence brute, en 2011, était plus élevée, estimée à 127,5/100.000 habitants chez l’homme et à 165.4/100.000 chez la femme (Abid., 2009).



**Figure 01:** L’incidence du CCR dans le monde selon une distribution hommes et femmes, select registries, 2003–2007. (Torre et al.,2016 )

### 3. Les différents types de cancers colorectaux

#### 3.1 Les adénocarcinomes

Plus de 90 % des cancers colorectaux sont des adénocarcinomes.

Il existe plusieurs types d’adénocarcinomes. Les plus fréquents (95 %) sont les adénocarcinomes lieberkühniens. Il existe d’autres formes rares comme les adénocarcinomes mucineux ou colloïdes et les adénocarcinomes dits à cellules en bague à chaton.

### 3.2 Les cancers colorectaux rares

Dans moins de 5 % des cas, d'autres tumeurs malignes se développent au niveau du côlon ou du rectum ; il s'agit notamment :

- **Des tumeurs carcinoïdes** : les tumeurs carcinoïdes représentent 1,5 % des cancers colorectaux. Elles se développent à partir de cellules nerveuses digestives, qui sécrètent des hormones ou des neurotransmetteurs.
- **De lymphomes** : les lymphomes sont des tumeurs qui se développent dans les organes lymphoïdes et notamment dans les ganglions lymphatiques.
- **De sarcomes** : les sarcomes regroupent différents types de tumeurs qui se développent à partir des os ou des tissus mous qui relient, soutiennent et entourent tous les organes du corps (muscles, tendons, graisse, etc.).
- **De mélanomes**: un mélanome est une tumeur qui se développe à partir de cellules appelées mélanocytes. Les mélanocytes sont présents essentiellement dans la peau, mais également dans les muqueuses de la bouche, du rectum (canal anal) ou des organes génitaux.

### 3.3 Les métastases colorectales

Les métastases sont des tumeurs cancéreuses qui proviennent d'un cancer situé dans un autre organe du corps. On parle aussi de tumeur secondaire.

Le côlon et le rectum sont parfois envahis par des métastases issues de cancers situés dans l'ovaire, la prostate, l'estomac ou le sein.

Le traitement de ces métastases dépend des traitements reçus pour le cancer d'origine, du nombre de métastases et de l'atteinte ou non d'autres organes.

## 4. La progression et diffusion de la maladie

Les étapes du développement d'un CCR correspondent schématiquement aux différents stades cliniques.



Un état précancéreux du côlon ou du rectum est caractérisé par des changements subis par les cellules qui les rendent plus susceptibles d'évoluer en cancer. Cet état n'est pas encore un cancer, mais il risque fortement de se transformer en cancer colorectal.

Les états précancéreux du côlon ou du rectum les plus courants sont les suivants :

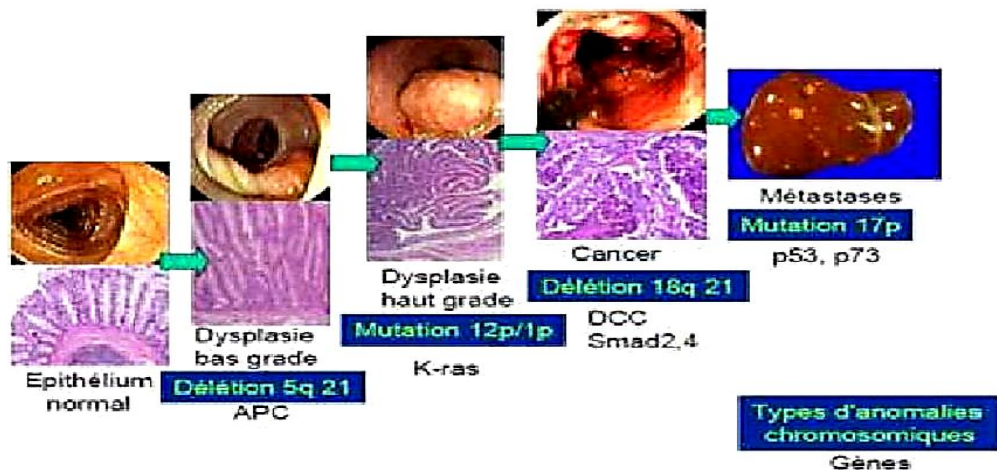
- Les adénomes.
- Les syndromes du cancer colorectal héréditaire.

#### **4.1 Les adénomes :**

Le point de départ est la muqueuse tapissant l'intérieur du colon-rectum au sein de laquelle se développe tout d'abord une lésion tumorale précancéreuse, bénigne, due à une prolifération de cellules de la muqueuse colorectale appelée adénome. Il se présente visuellement comme un polype, pédiculé ou sessile. La prévalence de l'adénome dans la population est élevée : de 7 % à 45 ans jusqu'à 33 % après 65 ans chez les hommes (Faivre., 2001).

Les adénomes avancés qui sont définis par leur taille (> 1 cm) et le degré de dysplasie (dysplasie de haut grade) dont le risque de transformation cancéreuse est plus élevé que pour les adénomes non avancés. La transformation cancéreuse de l'adénome passe par un stade de carcinome in situ, localisé à la muqueuse, pour évoluer vers le stade de carcinome infiltrant la paroi de l'intestin (phase invasive). Cette progression correspond aux niveaux croissants de la classification de Vienne des néoplasies intra-épithéliales et des cancers superficiels (Dixon.,2002).

La probabilité qu'au moins un adénome subisse une transformation adénocarcinomateuse est plus élevée si le nombre d'adénome est supérieur à 3, si sa taille est supérieure à 1 cm, Ou s'il possède un contingent villositaire supérieur à 25 % (Strum.,2016). La durée de la séquence adénome-cancer est estimée à plus de 10 ans en moyenne (Dancourt & Faivre., 2004). (Figure 02).



**Figure 02 :** Carcinogénèse colique selon le modèle de Vogelstein [Fearon & Vogelstein 1990], reproduit de [Lucie Vignot, thèse de médecine 2013].

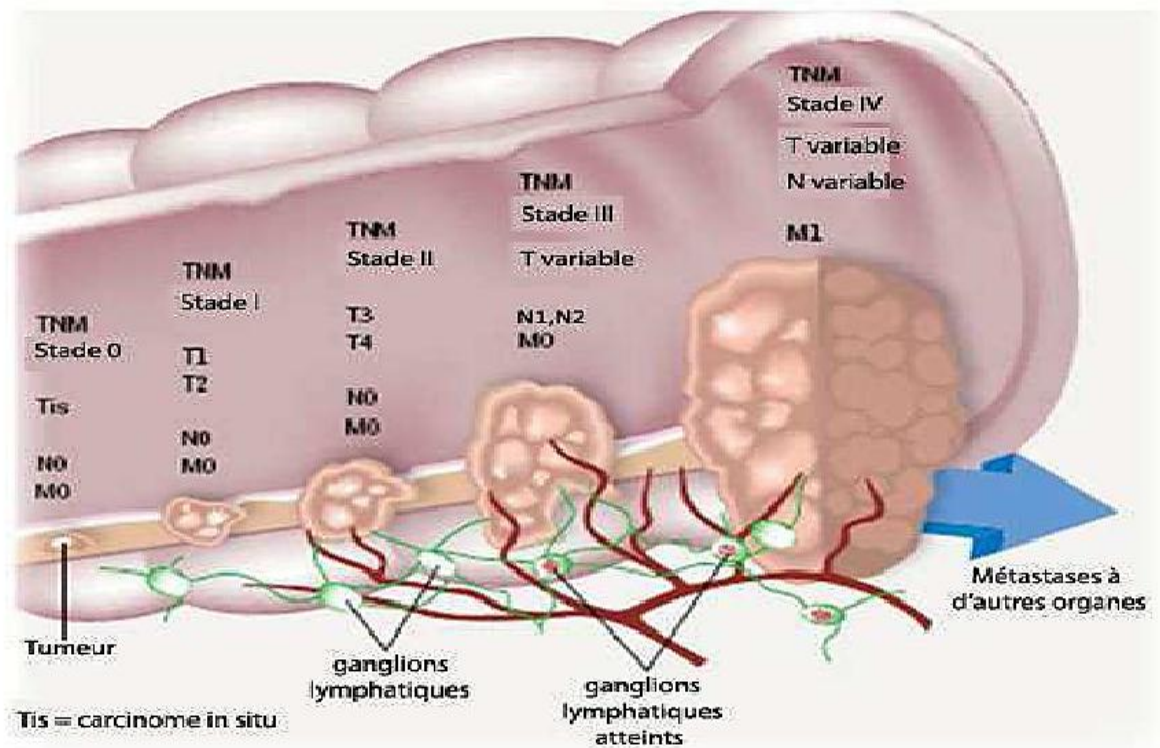
#### 4.2 Les syndromes du cancer colorectal héréditaire :

Les syndromes rares du cancer colorectal héréditaire qui suivent sont des états précancéreux du côlon ou du rectum. Ils engendrent la formation de nombreux polypes dans le côlon et le rectum. Ces syndromes sont causés par un gène muté, ou modifié, qui peut être transmis des parents à leurs enfants. Ils font augmenter le risque de cancer colorectal.

- **Le syndrome de Lynch** est aussi appelé cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC). C'est le type le plus courant de syndrome du cancer colorectal héréditaire. Chez la plupart des personnes atteintes du syndrome de Lynch, le nombre de polypes (petites masses présentes sur la muqueuse) n'est pas inhabituel. Si elles en ont, ils apparaissent à un plus jeune âge que chez la population générale et ils sont plus susceptibles de devenir cancéreux.
- **La polypose adénomateuse familiale (PAF)** engendre la formation de centaines, voire de milliers, de polypes sur le revêtement du côlon et du rectum.
- **Le syndrome de Peutz-Jeghers** engendre la formation de nombreux hamartomes, ou polypes hamartomateux, dans le tube digestif, dont le côlon et le rectum.
- **Le syndrome de polypose juvénile** engendre la formation d'hamartomes dans le tube digestif, dont le côlon et le rectum. Ces hamartomes apparaissent habituellement avant l'âge de 20 ans. Chez certaines personnes atteintes de ce syndrome, seuls quelques hamartomes prennent naissance dans le tube digestif. D'autres ont plus de 100 hamartomes.

### 5. La classification histologique des cancers colorectaux :

La classification TNM (T=taille de la tumeur primaire, N= atteinte éventuelle des ganglions lymphatiques (*nodes* en anglais), M= présence éventuelle de métastases) de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) permet de caractériser les stades de progression tumorale maligne. (Figure 03)



**Figure 03** : Les stades du CCR selon le National Cancer Institute reproduit de [Lucie Vignot, thèse de médecine 2013].

Le stade des cancers colorectaux au moment du diagnostic est généralement exprimé par un chiffre romain allant de 0 à IV. La signification de ces cinq stades est expliquée dans le tableau 01.

Stage	TNM designation			Dukes' designation
0	Tis	N0	M0	—
I	T1	N0	M0	A
	T2	N0	M0	
II	T3	N0	M0	B
	T4	N0	M0	
III	Any T	N1	M0	C
	Any T	N2, N3	M0	
IV	Any T	Any N	M1	D

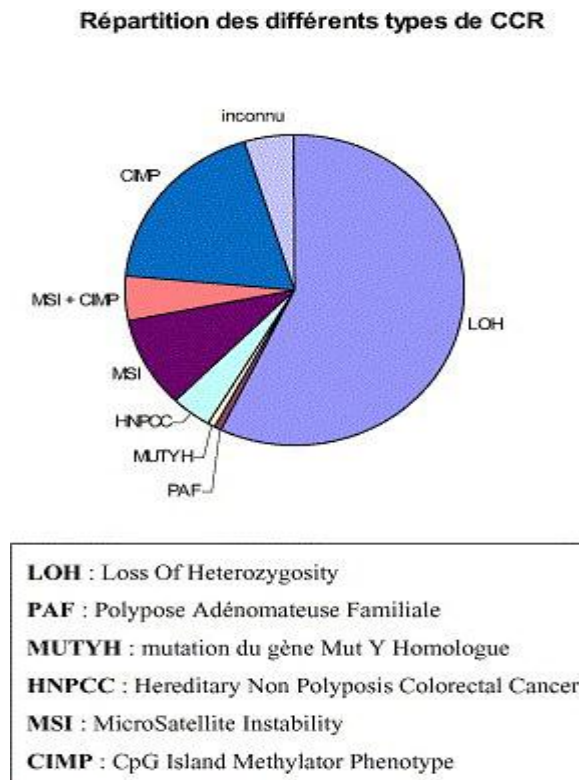
**Tableau 01** : Comparaison des systèmes de stadification de TNM et de Dukes pour le CCR (Winawer et *al.*,1997).

- Le stade 0 correspond aux carcinomes in situ
- le stade I aux cancers avec une extension uniquement locale et limitée aux couches superficielles
- le stade II à une extension locale plus profonde
- le stade III à une dissémination locorégionale avec atteinte ganglionnaire
- le stade IV à une extension métastatique à distance

L'identification du stade au moment de la prise en charge d'un patient est très importante puisque le pronostic d'une part et le choix du traitement optimal d'autre part en dépendent.

## 6. La génétique du cancer colorectal

Le CCR est en effet, le premier des cancers héréditaires. Les études de jumeaux et de familles ont permis d'évaluer qu'environ 30% des CCR appartiennent à une forme génétique (Lichtenstein et *al.*,2000; Grady.,2003) ( Figure 04).



**Figure 04:** Répartition des différents types de cancers colorectaux (Ferron et *al.*, 2005)

Trois mécanismes différents ont été individualisés dans la cancérogenèse colorectale :

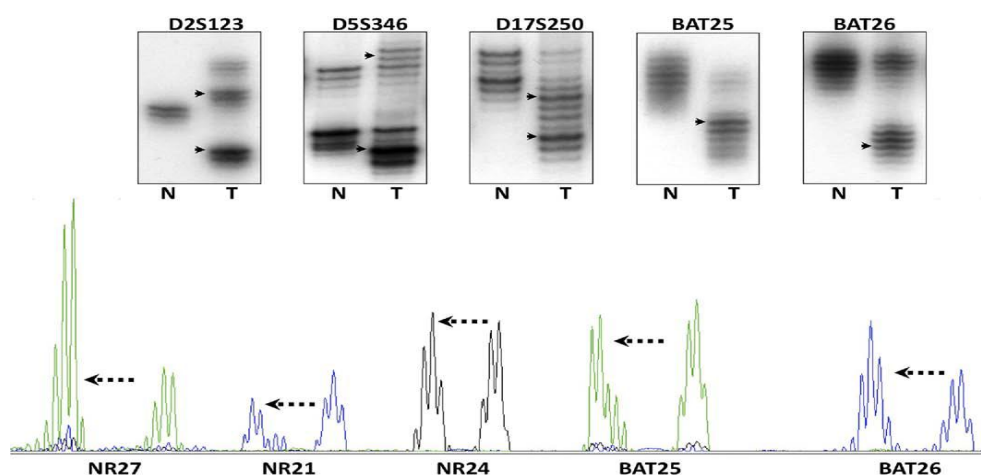
- L'instabilité chromosomique (CIN, *Chromosomal Instability*)
- L'instabilité génétique ou microsatellitaire (MSI : *Microsatellite Instability*)
- Hyperméthylation des îlots CpG (CIMP : *CpG Island Methylator Phenotype*).

### 6.1 L'Instabilité chromosomique (phénotype CIN):

Elle rend compte d'environ 80% des cancers sporadiques (Laurent-Puig et *al.*, 2010) et est caractérisée par des pertes alléliques sur les bras courts des chromosomes 17, 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22. Ces anomalies sont le plus souvent associées à des mutations sur les gènes *APC* ou *p53* qui entraînent une inactivation complète de ces gènes suppresseurs de tumeur. On retrouve fréquemment une aneuploïdie cellulaire. L'origine de cette instabilité est encore mal connue, mais il a été montré que des mutations sur le gène *APC*, aboutissant à la formation d'un codon stop, peuvent favoriser la CIN. En effet une des fonctions de la protéine *APC* est de maintenir la polymérisation des microtubules du noyau cellulaire (Fodde et *al.*, 2001).

## 6.2 L'instabilité génétique (phénotype MSI):

Ce mécanisme est retrouvé dans environ 15% des CCR (Laurent-Puig et *al.*,2010) et se caractérise par une instabilité des locus microsatellitaires liée à un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN, tâche normalement dévolue au système MMR (*Mismatch Repair*) composé en autres gènes hMLH1, hMLH3, hMSH2, hMHS6, hPMS1, hPMS2... Ces séquences microsatellitaires sont très fréquentes dans l'ensemble du génome et sont particulièrement à risque d'être mal répliquées par l'ADN polymérase. Le système MMR peut être inactivé en cas de mutation germinale associée à une mutation somatique (Syndrome de Lynch) ou par méthylation du promoteur de hMLH1 qui inactive sa transcription (forme sporadique). Le phénotype MSI est identifié par PCR en testant des séquences microsatellitaires de longueur connues et en comparant la taille des produits d'amplification entre le tissu sain et le tissu tumoral (Figure 05).



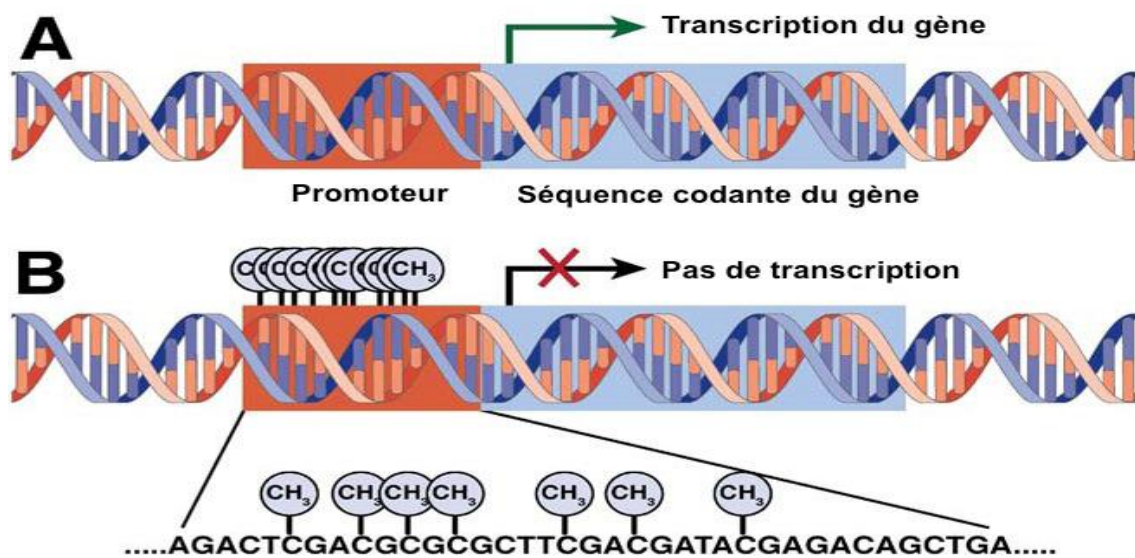
**Figure 05:** Phénotype MSI mis en évidence par amplification de 5 marqueurs (d'après (Boland et *al.*,2010).

Contrairement aux tumeurs avec un phénotype CIN, les cellules MSI sont le plus souvent diploïdes et on retrouve moins fréquemment des mutations sur *APC* ou *p53* (Olschwang et *al.*,1997). L'inactivation du système MMR conduit à l'accumulation de mutations secondaires qui vont inactiver de nombreux gènes aboutissant à la transformation de la cellule. Les gènes *BAX*, *TGFR2*, les

facteurs de transcription TCF-4 ou E2F4 sont souvent retrouvés mutés dans les cancers MSI+ (Duval et *al.*,2002).

### 6.3 Hyperméthylation de l'ADN (phénotype CIMP):

Des dinucléotides CpG regroupés en îlots sont retrouvés dans les régions promotrices pour la moitié des gènes. Ces îlots CpG peuvent inactiver un gène en empêchant sa transcription si leur cytosine est méthylée (Figure 06).



**Figure 06 :** Mécanisme d'inactivation de la transcription (d'après (Leggett et *al.*,2010)).

Le mécanisme du phénotype CIMP n'est pas encore élucidé mais certains gènes semblent particulièrement sensibles pour le définir. En effet les gènes hMLH1, RUNX3, IGF2, CACNA1G, NEUROG1 et SOCS1 ont été retrouvés méthylés sur leur promoteur en cas de phénotype CIMP et pourrait devenir le panel de gènes à étudier. Actuellement il n'existe aucune définition consensuelle du phénotype CIMP (nombre de gènes à étudier, nombre de promoteurs méthylés).

Dans le CCR, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs peuvent ainsi être inactivés conduisant à ce phénotype CIMP (CpG Island Methylation Phenotype) (Issa.,2004). La méthylation du gène hMLH1 responsable d'une inactivation du système MMR et donc d'un

phénotype MSI rentre également dans ce cadre expliquant la possibilité de tumeur MSI+/CIMP+. La plupart des CCR sporadiques présentant un phénotype MSI surviennent chez des individus âgés, sont associés à des mutations de BRAF et à un phénotype CIMP+. Ces cas dérivent le plus souvent de la voie des adénomes festonnés.

## 7. Les symptômes

Le CCR passe généralement inaperçu dans ses premiers stades de croissance. Il se développe souvent en silence, sans provoquer de symptômes particulier. Il peut rester longtemps imperceptible. Néanmoins, certains signes peuvent être révélateurs (Hunt et *al.*, 2013) :

- ✓ Des changements dans les habitudes fécales qui durent depuis quelques semaines (constipation ou diarrhée, par exemple).
- ✓ Du sang dans les selles. Parfois les saignements sont invisibles à l'œil nu. Seuls des examens de recherche de sang dans les selles permettent alors de les détecter.
- ✓ Des malaises abdominaux, tels des gaz intestinaux, des crampes ou des douleurs au ventre.
- ✓ La sensation que les intestins ne se vident jamais complètement ou d'avoir constamment envie de déféquer.
- ✓ Une altération de l'état de santé général (perte d'appétit, amaigrissement, fatigue...).

Au fur et à mesure que la tumeur grossit, ces symptômes peuvent s'aggraver et entraîner des complications telles qu'une occlusion intestinale ou une péritonite :

- **Une occlusion intestinale**: la tumeur bouche complètement le côlon, empêchant le passage des selles et des gaz. Ceux-ci s'accumulent alors dans le côlon, qui augmente de volume. Une occlusion intestinale peut se manifester par des douleurs abdominales plus ou moins importantes, un gonflement du ventre, des vomissements et une absence de selles et de gaz. Elle nécessite une intervention médicale urgente. En effet, si le côlon continue à se distendre, il peut se perforer, ce qui représente un risque vital pour le patient
- **Une péritonite**, infection grave de la membrane qui entoure tous les organes de l'abdomen (péritoine). Cette infection peut survenir lorsque le côlon s'est perforé. Elle nécessite une intervention chirurgicale en urgence.



## 8. Le diagnostic

Le problème du diagnostic se pose après un dépistage positif ou si les patients présentent des symptômes intestinaux. (Parente.,2010)

### 8.1 Clinique :

Le diagnostic commence le plus souvent par une consultation chez le médecin traitant. Si celui-ci soupçonne des troubles qui nécessitent des examens complémentaires ou si le test de recherche de sang dans les selles réalisé dans le cadre du dépistage organisé se révèle positif, il oriente son patient vers un gastroentérologue, médecin spécialiste du système digestif.

La consultation avec le gastroentérologue comprend un entretien et un examen physique complet qui consiste à palper différentes parties de l'abdomen afin de rechercher d'éventuelles anomalies. Le médecin pratique également un toucher rectal pour détecter d'éventuelles grosseurs dans le rectum.

### 8.2 Coloscopie :

Le but du diagnostic est de révéler la présence d'anomalies préneoplasiques. Grâce à la coloscopie, la tumeur devient visible. Un morceau de celle-ci est prélevée (biopsie) en vue d'une analyse. A partir de cet examen une stratégie thérapeutique et un suivi adapté seront mis en place. La coloscopie est un élément de diagnostic important car elle va confirmer ou non le diagnostic.

Dans 30% des cas la coloscopie détecte un polype qui peut être retiré évitant ainsi qu'il ne devienne cancéreux un jour. Un cancer est découvert dans 10% des cas (INCa., 2008).

### 8.3 Autres examens :

- ❖ Examen biologique : Il consiste en un dosage de l'ACE (Antigène Carcino-embryonnaire), fait systématiquement lors du bilan initial d'un cancer colorectal, une
- ❖ évaluation de la fonction rénale (clairance à la créatinine), hépatique et un dosage des plaquettes, FNS (Formule Numération Sanguine) et bilan lipidique LDH (Lactate déshydrogénase).

- ❖ Imagerie : Le bilan initial prévoit une échographie hépatique et une radiographie pulmonaire ou un scanner thoraco-Abdo-pelvien. L'imagerie va permettre de localiser les métastases.

Le diagnostic a plusieurs objectifs (Smyrk et *al.*,2008) :

- Confirmer la présence d'un cancer
- Identifier le type de cancer dont il s'agit
- Trouver l'emplacement où le cancer a pris naissance
- Déterminer l'étendue du cancer (son stade)
- Élaborer un plan de traitement adapté.

## 9. Le pronostic

Le pronostic est l'évaluation de l'issue possible de la maladie. Un très bon pronostic signifie par exemple que les chances de guérir sont élevées. De nombreux facteurs, liés à la personne et aux caractéristiques de la maladie, influencent le pronostic d'un cancer colorectal. **Le facteur le plus important est le stade de la maladie au moment du diagnostic** : comme pour la plupart des cancers, les chances de guérison sont meilleures si le cancer est découvert à un stade précoce.

Globalement pour tous les CCR, la survie relative à 5 ans est de 57 %. Le pronostic est étroitement lié au stade auquel le cancer est diagnostiqué. Lorsque la tumeur est superficielle (stade 1), la survie à cinq ans est de l'ordre de 90 %, tandis qu'elle est de 5 % en cas de métastase. D'où l'intérêt de détecter ces cancers le plus tôt possible. (Lopez et *al.*,2016).

Selon les statistiques américaines du National Cancer Institute, la survie relative à 5 ans d'une personne atteinte d'un CCR par rapport à la population générale de même âge est de 65,1 % et le pronostic est d'autant plus défavorable que le diagnostic est établi à un stade avancé de la maladie. En cas de tumeurs localisées, selon la stadification américaine, la survie relative à 5 ans est égale à 90 % alors que celle des tumeurs métastasées est égale à 13,5 % (National Cancer Institute 2006-2012).

**10. Le traitement**

Il va dépendre de la localisation, du stade, de l'histologie et de l'état général du patient. Différents traitements sont mis en place, selon l'objectif visé qui est soit un traitement curatif ou bien un traitement palliatif. Le traitement choisit doit permettre d'éviter les complications et de préserver la qualité de vie du patient. (Parente.,2010).

Si le cancer est limité au colon ou rectum et qu'il n'y a pas de métastase ni d'envahissement ganglionnaire, la chirurgie est pratiquée pour retirer la partie atteinte. La chimiothérapie est effectuée si la tumeur est agressive.

Si des cellules cancéreuses ont atteints un ou plusieurs ganglions lymphatiques proches du côlon et qu'il n'y a pas de métastases, la chirurgie sera complétée d'une chimiothérapie adjuvante.

Enfin si le cancer a atteint d'autres organes, deux chirurgies peuvent être réalisées, Une pour la tumeur primitive et une pour les métastases. La chimiothérapie est réalisée soit entre les deux chirurgies soit en traitement principal si la chirurgie n'est pas envisageable. (INCa.,2010)

La protéine p53, a été découverte en 1979 par Linzer et Levine. En 1989, Baker a mis en évidence son rôle anti-oncogène. Entre 1993 et 1996, plus de 4300 études de recherches ont été publiées sur cette protéine. Son rôle prépondérant dans le contrôle du cycle cellulaire, et la protection contre la prolifération en réponse aux stress génotoxique lui a valu le surnom de « gardien du génome » ou « suppresseur de tumeur ».

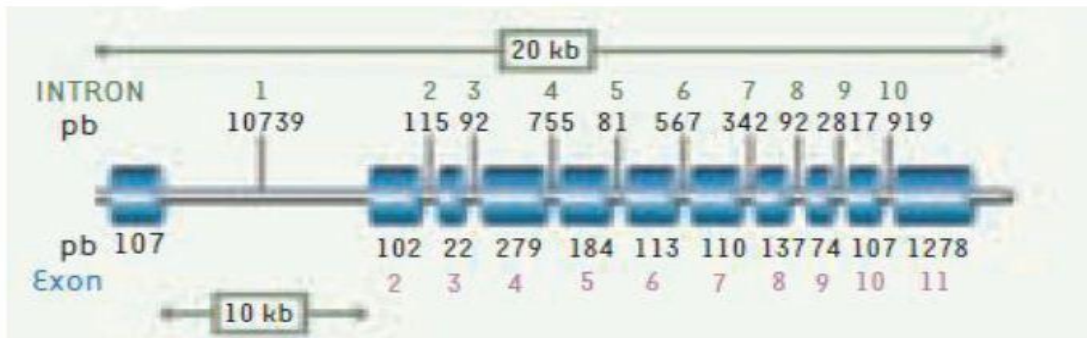
### 1. Historique

La protéine p53 fut identifiée pour la première fois lors d'études visant à identifier les molécules ciblées par l'antigène T du virus *simian* 40 (SV40) (Kress et *al.*, 1979) (Linzer and Levine 1979). Durant la même année, plusieurs groupes ont reporté l'existence d'une protéine qui était surexprimée dans plusieurs tumeurs. (DeLeo et *al.*, 1979). Cette protéine, avec un poids moléculaire approximatif de 53 kDa fut baptisée p53 (protein 53) (Levine et Oren., 2009). Cette nomenclature désigne aussi le gène.

Le gène suppresseur de tumeur p53 est perdu ou muté dans plus de 50% des cas de cancers humains (Pim et Banks.,2004) ce qui en fait le gène le plus fréquemment altéré dans les tumeurs humaines et supporte la notion que le produit du gène de p53 est une protéine suppresseur de tumeur (Aizat et *al.*,2011).

### 2. Le gène p53

Chez l'humain, le gène p53 est un anti-oncogène localisé sur le chromosome 17, au locus 17p13 et couvre environ 20kb d'ADN. Il est composé de 11 exons ayant la particularité suivante: le premier exon est non-codant et est situé 8 à 10kb en amont des autres exons (Benchimol et *al.*, 1985), (Oren 1985). Il dispose d'une séquence intronique de 10 kb située entre la première et la deuxième séquence exonique. Cinq régions hautement conservées au cours de l'évolution sont localisées entre le second et le huitième exon. Il est généralement admis que le domaine central de la protéine p53 est codé par les exons 5, 6, 7, 8 (Walid Dridi et *al.*,2006) (Figure 07).



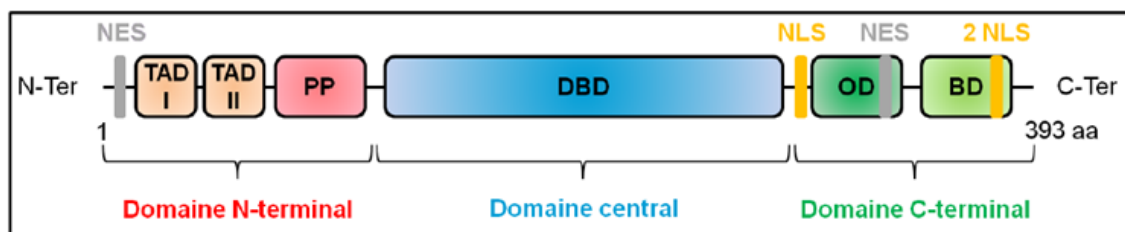
**Figure 07:** Structure du gène p53 (Aylon et Oren 2007)

### 3. La protéine p53

La protéine p53 humaine contient 393 acides aminés et est composée de 3 domaines principaux : le domaine N-terminal, le domaine central et le domaine C-terminal qui contiennent chacun un ou plusieurs sous-domaines régulant les activités de p53 (Millau et *al.*, 2009; Bieging and Attardi., 2012).

- Le domaine N-terminal comprenant les domaines d'activation de la transcription TADI et TADII ainsi que le domaine riche en proline PP .
- Le domaine central comprenant le domaine de liaison à l'ADN (DBD pour DNA Binding Domain).
- Le domaine C-terminal comprenant le domaine d'oligomérisation (OD) et le domaine régulateur riche en acides aminés basiques (BD).

La protéine p53 possède 2 NES et 3 NLS qui régulent sa localisation nucléo-cytoplasmique (Figure 08).



**Figure 08 :** Structure de la p53 (Millau et *al.*, 2009; Vousden et Prives., 2009; Rajagopalan et *al.*, 2010) .

#### 4. Les fonctions de la p53

Toute une gamme de fonctions a été attribuée à la protéine p53, incluant des rôles dans la réparation des dommages à l'ADN, la modification de la chromatine, l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose.

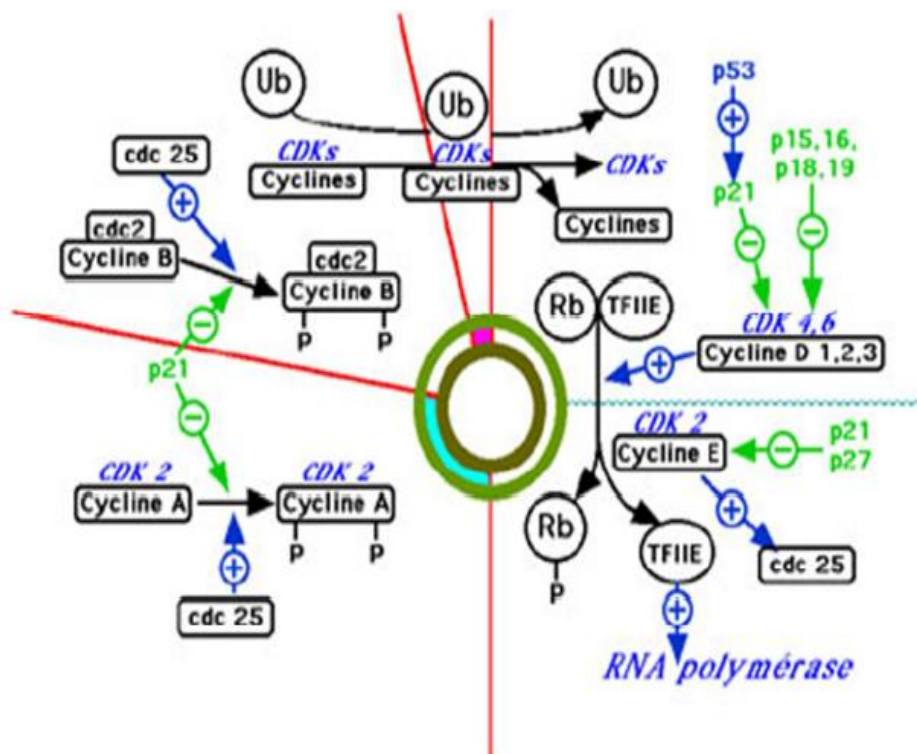
Cependant, la protéine est majoritairement connue pour son rôle dans l'inhibition de la prolifération cellulaire et s'est même mérité le surnom de «gardien du génome». Pour inhiber le développement de cancers, p53 agit surtout en stoppant le cycle cellulaire afin de permettre la réparation adéquate de l'ADN ou en promouvant l'apoptose, empêchant ainsi la prolifération de cellules aberrantes (Vousden et Prives, 2009).

##### 4.1 La régulation du cycle cellulaire

En effet, p53 peut activer la transcription de p21, une protéine inhibitrice des kinases cycline-dépendantes capable de stopper le cycle cellulaire en phase G1. L'arrêt du cycle cellulaire permet alors à la cellule de soit réparer l'ADN endommagé à l'aide des protéines XPC et GADD45, dont l'expression est aussi régulée par p53, ou de causer l'apoptose, une voie utilisée lorsque les dommages à l'ADN sont trop importants (Weinberg, 2007). Les principaux signaux reconnus pour activer p53 sont les dommages à l'ADN, ce qui inclut l'activation de certains oncogènes, le raccourcissement des télomères et les effets des rayons ultraviolets ou des inhibiteurs de topoisomérase (Balint et Vousden, 2001; Borras et *al.*, 2011). Néanmoins, l'activation complète de la protéine nécessite d'autres facteurs, comme des modifications post traductionnelles et l'inactivation de MDM2, une E3-ubiquitine ligase connue pour promouvoir la dégradation de p53.

Les modifications post-traductionnelles impliquées dans l'activation de p53 sont principalement effectuées au niveau de son domaine C-terminal et régulent la liaison de la protéine à l'ADN. Ces modifications peuvent être diverses (sumoylation, phosphorylation, déphosphorylation, acétylation, glycosylation et ribosylation) et diffèrent selon le stress auquel la cellule a été exposée (Smeenk et Lohrum.,2010).

Toutefois, la phosphorylation des sérines 15 et 20 de p53 est généralement considérée comme l'étape initiale pour la stabilisation de la protéine, puisque ces phosphorylations diminuent l'interaction de celle-ci avec son régulateur négatif, MDM2 (Borras *et al.*, 2011). Ensuite, la protéine activée peut jouer son rôle via l'activation ou la répression de la transcription de ses gènes cibles, impliqués dans le cycle cellulaire, l'apoptose, l'angiogénèse, la différenciation cellulaire et la réponse immunitaire (Borras *et al.*, 2011). Même si la plupart des rôles de p53 s'effectuent par des mécanismes dépendants de l'activation ou la répression transcriptionnelle, la protéine possède aussi d'autres activités biologiques indépendantes de la transcription et plusieurs fonctions cytoplasmiques ont même été attribuées à p53 (Green et Kroemer.,2009).



**Figure 09** : Régulation du cycle cellulaire. (Raisonnier *et al.*, 2003)

#### 4.2 L'apoptose

Entre autres, p53 peut déclencher l'apoptose même en l'absence de son domaine central de liaison à l'ADN; la protéine peut se localiser à la membrane externe mitochondriale afin de permettre le relâchement de facteurs proapoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial par perméabilisation de la membrane externe. L'inhibition

de l'autophagie par p53 cytoplasmique est également bien documentée (Green et Kroemer.,2009).

**4.3 La réparation de l'ADN**

La p53 peut aussi se situer au noyau et jouer un rôle direct dans la réparation de l'ADN en participant à sa réparation par excision de bases (Balint et Vousden.,2001) (Figure 10).

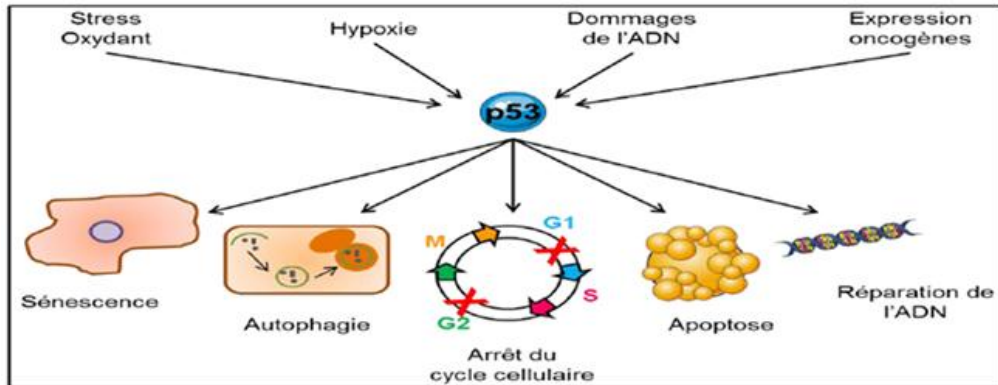


Figure 10 : Activité de p53 (Bieging et Attardi.,2012).

**5. Les mutations et polymorphisme de la p53**

**5.1 Les mutations de la p53**

Une p53 fonctionnellement normale est essentielle pour protéger les organismes du cancer (Figure 11).

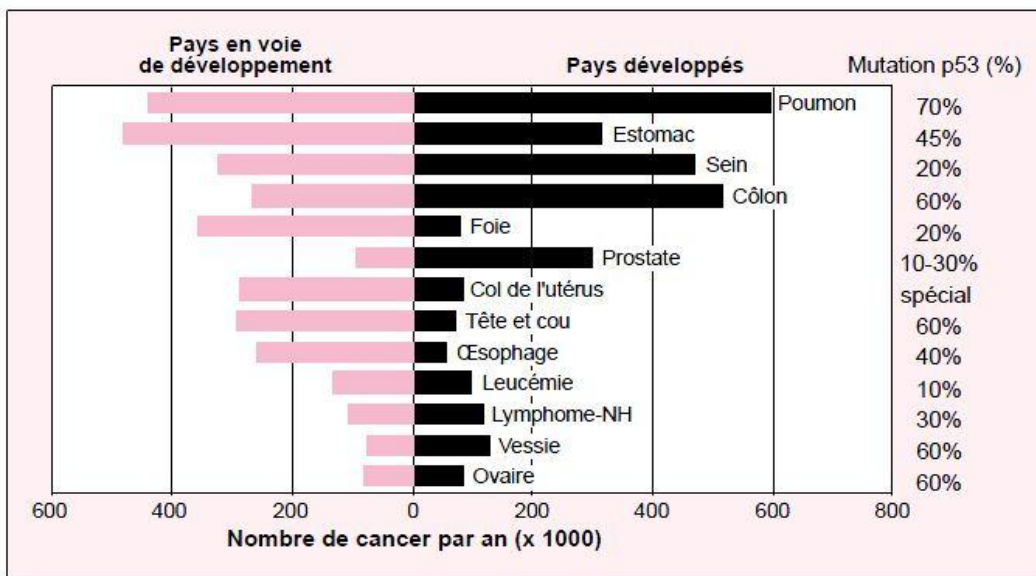


Figure11: Fréquences des cancers dans le monde et relation avec le taux de mutation du gène de la p53 (Soussi et al.,2000).

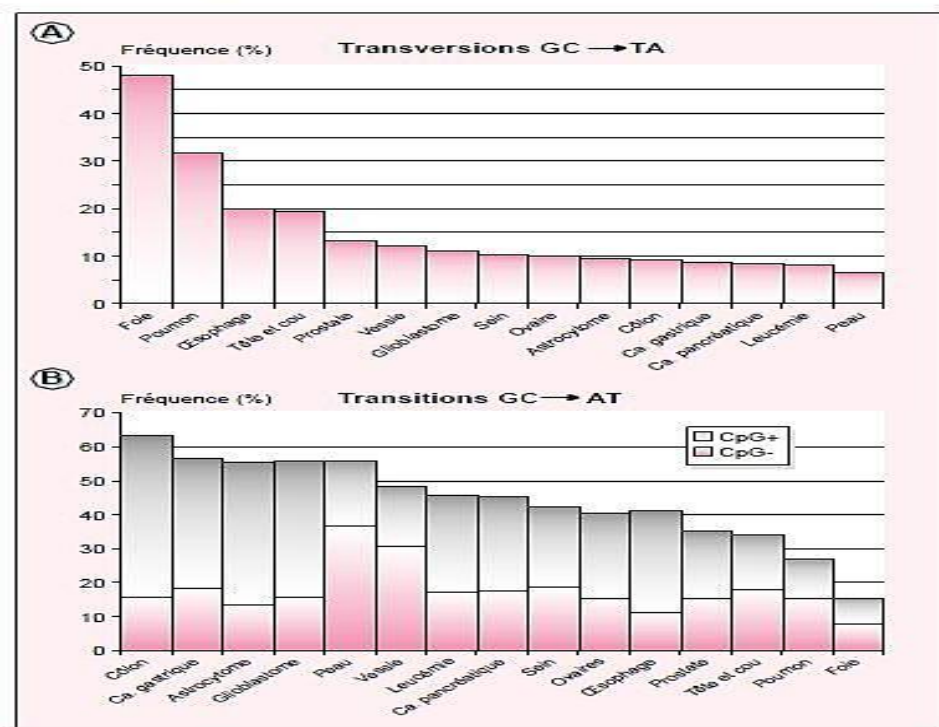


Les mutations de p53 conduisent à l’abrogation de ses fonctions et à son absence au niveau nucléaire. En effet, l’échange d’un seul acide aminé peut conduire à un changement conformationnel de p53 qui la rend inapte à se lier à son élément de réponse sur l’ADN et à transcrire ses gènes cible, la plupart des mutations ponctuelles concernant le domaine de liaison à l’ADN. Les mutations somatiques du gène représentent l’une des perturbations les plus récurrentes dans les tumeurs humaines, y compris le CCR (Naccarati et *al.*, 2012 ).

L’analyse de toutes les mutations ponctuelles qui modifient le gène p53 montre que 51% sont des transitions G:C → A:T et 49% d’entre elles sont situés au niveau d’un nucléotide CpG.

Dans les cellules humaines, la cytosine présente dans ces dinucléotides CpG est fréquemment méthylée. La désamination spontanée d’une cytosine conduit à la formation d’un mésappariement U:G qui est efficacement réparé par un uracile DNA glycosylase.

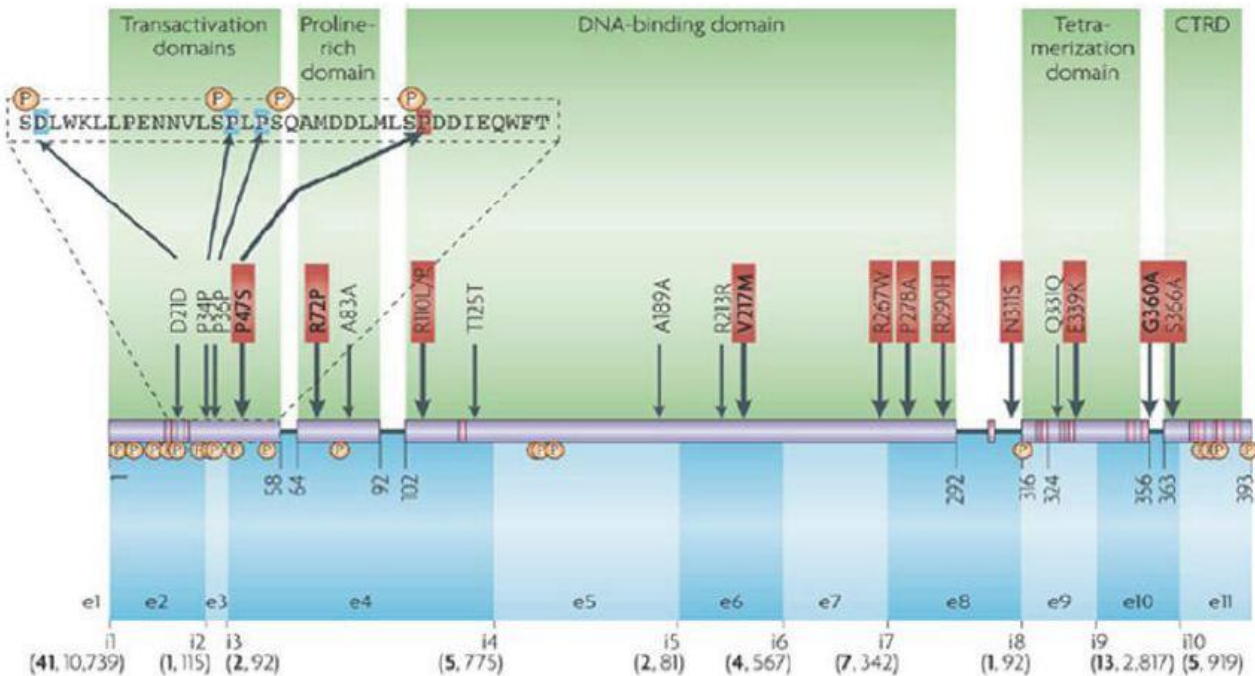
Par contre, la désamination d’une 5-méthylcytosine conduit à un mésappariement T:G dont la réparation peut conduire à une transition C->T.( Bressac et *al.*,1991)(Figure 12).



**Figure 12:** Fréquence des transversions G:C → T:A (A) et des transitions G:C → A:T (B). (Soussi et *al.*,2000).

## 5.2 Les polymorphismes du p53

Plusieurs polymorphismes sont présents au niveau du locus p53, ils peuvent augmenter le risque de cancer et affecter la réponse à des schémas thérapeutiques (Figure 13).



**Figure 13** : Les différents polymorphismes de gène p53 (Whibley et *al.*, 2009)

- **Le polymorphisme Pro 47 Ser**

Le polymorphisme p53-47 Proline / Sérine (dénommé ci-après p53-47Pro ou p53-47Ser), est le résultat d'une substitution d'une C par une T à la position 1 du codon 47, ce SNP a été signalé dans les populations d'origine africaine (Felley-Bosco et *al.*, 1993). La variante p53-47Ser, diminue l'induction de certains gènes pro-apoptotique en réduisant le niveau de phosphorylation à la sérine 46 résidu adjacent (Li et *al.*, 2005).

- **Le polymorphisme Val 217 Met et Gly 360Ala**

Le polymorphisme p53-217 valine / méthionine est le seul polymorphisme trouvé dans le DBD de p53, qui pourrait être susceptible d'influer sur l'activité de protéine. Sa fonction a été testée uniquement dans la levure et la variante p53-217Met a montré une capacité de transactivation accrue (Kato et *al.*, 2003). Une étude effectuée sur la levure

montre que l'induction de certaines gènes p53 est légèrement diminué avec la variante p53-360Ala (Kato *et al.*, 2003). Cependant, il n'y a pas de confirmation du rôle de ces SNPs dans un système de mammifère ou même dans les cancers humains.

- **Le Polymorphisme Arg72pro**

C'est le polymorphisme le plus fréquent dans le gène p53 ; c'est une variation de Proline en arginine au niveau du codon 72 localisé sur l'exon 4 du gène p53. Ce SNP est dû à un changement dans la séquence d'ADN codant pour le domaine riche en proline de p53 (CCC ou CCG).

Des expériences dans des lignées cellulaires humaines ont suggéré que la variante p53-72Arg est plus efficace dans l'induction de l'apoptose, alors que p53-72Pro serait plus efficace dans la transactivation de la p21 et d'induire l'arrêt du cycle cellulaire (Dumont *et al.*, 2003; Pim et Banks., 2004; Salvioli *et al.*, 2005; Sullivan *et al.*, 2004). Cependant, des études de l'association de ces variantes polymorphes avec le risque de cancer ont été controversées (Whibley *et al.*, 2009).

Plusieurs modèles de souris humanisées conçus pour produire le polymorphisme p53 72Pro/ Arg ont été récemment rapportés, ces modèles ont révélé des effets spécifiques des tissus du polymorphisme du codon 72, ce qui peut expliquer les résultats controversés dans les études humaines (Azzam *et al.*, 2011; Frank *et al.*, 2011; Zhu *et al.*, 2010).

## **6. L'impact du polymorphisme Arg72Pro sur la protéine**

La fonction de p53 est également altérée par un polymorphisme de séquence commun qui apparaît au codon 72 dans l'exon 4, avec 2 allèles codant pour Arg ou pour la proline. Chaque individu hérite d'un génotype p53 qui peut être hétérozygote (Arg / Pro) ou homozygote pour Arg / Arg ou Pro / Pro. Ces 2 variantes de p53 de type sauvage semblent être différents à la fois biochimiquement et biologiquement (Thomas *et al.*, 1999). Ce polymorphisme est situé dans un domaine riche en p53 qui est un composant nécessaire à la protéine p53 pour induire une fonction apoptotique complète. Une étude récente a montré que le variant Arg72 induisait l'apoptose plus efficacement que le variant Pro72 (Sullivan *et al.*, 2004).

### 7. Le fonctionnement de la protéine

Les mutations de p53 surviennent dans au moins 50% des cancers et plus de 90% de celles-ci éliminent la capacité de la protéine p53 à se lier à ses cibles ADN, soulignant ainsi l'importance de p53 dans la tumorigenèse. Un polymorphisme mononucléotidique (SNP) dans le gène p53 entraînant la substitution de l'arginine (Arg) par Proline (Pro) au niveau du codon 72 s'est avéré altérer la structure primaire de la protéine p53. Bien que les activités de liaison à l'ADN spécifiques à la séquence des deux formes structurelles soient normales, certaines différences fonctionnelles ont été identifiées. Les deux formes de p53 diffèrent par leur sensibilité à la dégradation par la protéine E6 du papillomavirus humain. De plus, (Thomas et *al.*,1999) ont observé que la forme Pro activait la transcription à un niveau plus élevé que la forme Arg, alors que la cinétique de l'apoptose était plus rapide avec la forme Arg.

### 8. La relation entre le polymorphisme Arg72Pro et le CCR

Un polymorphisme nucléotide simple (SNP) au codon 72 du gène p53 (Arg72Pro) modifie la structure de la protéine p53 et affecte son activité

Le SNP Arg72Pro pourrait jouer un rôle dans les premiers stades de la néoplasie colorectale et éventuellement dans la progression de la maladie invasive, selon le site et le sexe.

Selon (Koushik et *al.*,2006) y'a pas d'association globale significative entre le génotype p53 Arg72Pro et le cancer colorectal, mais ont trouvé une association significative avec le risque d'adénome colorectal. Lorsque stratifiée par sexe, un risque accru de cancer colorectal proximal chez les femmes et de cancer du côlon distal chez les hommes a été observé (Koushik et *al.*, 2006). Une association à risque plus élevé entre les polymorphismes CCR et p53 Arg72Pro a été rapportée par (Perez et *al.*,2006) dans une population argentine ainsi que par (Mammano et *al.*,2009) dans la population italienne.

Des études antérieures ont également montré que le polymorphisme Arg72Pro de p53 varie selon les groupes ethniques et les groupes de population. Nous avons mené une étude cas-témoins pour étudier les fréquences des allèles et des génotypes et l'apport du génotype variant du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la modification du risque de susceptibilité chez les patients atteints de CCR sporadique. (Aizat et *al.*,2011)

*Patients et  
méthodes*

### 1. La Population d'étude

Notre étude a porté sur 68 échantillons d'ADN collectés de la banque d'ADN du laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'Université Constantine 3, cet échantillon unit 2 populations :

- Une population de témoins : Elle comprend 41 échantillons d'ADN.
  - Les Critères d'inclusion : sujets âgés de 30 à 75 ans et sans antécédents familiaux de cancer.
  - Critères d'exclusion : sujets âgés de moins de 30 ans et avec antécédents personnels ou familiaux de cancer.
- Une population de malades :
  - Elle regroupe 27 échantillons d'ADN de patients atteints par le cancer colorectal.

### 2. La méthodologie

La méthode de génotypage que nous avons choisie est une PCR- RFLP pour étudier le SNP Arg72Pro du gène de la p53 et qui consiste tout d'abord à amplifier la région d'intérêt par PCR puis de différencier les génotypes par digestion à l'aide d'une enzyme de restriction spécifique. Ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de biologie moléculaire de la faculté des sciences de la nature et de la vie de l'université des frères Mentouri Constantine 1.

Notre méthode a été effectuée en plusieurs étapes successives :

- Recueil de l'ADN.
- une réaction de polymérisation en chaîne PCR (Polymerase chaine reaction).
- Une électrophorèse sur gel d'agarose pour un contrôle des produits de PCR
- Une digestion des produits de PCR par l'enzyme de restriction *Bsh1236I*.
- Electrophorèse sur gel d'agarose des produits de digestion

#### 2.1 Recueil de l'ADN

Au cours de cette étape, l'ADN de notre échantillon d'étude a été pris directement de la banque d'ADN du Laboratoire de Biologie et Génétique Moléculaire de l'Université Constantine 3.

### 2.2 L'amplification de l'ADN par PCR

La PCR est une méthode de Biologie Moléculaire, permet l'amplification exponentielle d'une faible quantité d'ADN connue en utilisant un mélange réactionnel contenant tous les réactifs nécessaires. L'ensemble est soumis à une succession de réactions appelées cycles de réplication. Chaque cycle est composé de 3 étapes : une dénaturation des brins d'ADN, une hybridation des amorces et une élongation afin d'obtenir une quantité suffisante de la séquence d'ADN désirée.

Avant de commencer notre PCR, nous avons préparés d'abord un mix de PCR contenant :

- ✓ des désoxyribonucléotides triphosphates (dNTP).
- ✓ une enzyme d'amplification in vitro (Taq polymérase).
- ✓ un environnement réactionnel (tampons, MgCl<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>O).
- ✓ deux amorces oligonucléotidiques encadrant la région d'intérêt

**Tableau 02 : Mélange réactionnel de PCR**

<b>Composant et concentration initiale</b>	<b>Volume</b>
<b>Eau distillée</b>	16.7 µl
<b>Tampon 10 x</b>	2.5 µl
<b>MgCl<sub>2</sub> (25mM)</b>	1.5 µl
<b>dNTP (5mM)</b>	2 µl
<b>Amorce S ( 10 PM)</b>	0.5 µl
<b>Amorce R ( 10 PM)</b>	0.5 µl
<b>Taq polymérase</b>	0.3 µl

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

l'Oligo F (Forward primer): 5' '-TCC CCC TTG CCG TCC CAA- 3'

l'Oligo R (Reverse primer) : 5'-CGT GCA AGT CAC AGA CTT- 3'.

Nous avons pris 24 µl de ce mélange (le mix de la PCR) avec 1µl d'ADN pour chaque échantillon. (Un témoin négatif a été ajouté à chaque réaction de PCR)

Les tubes de PCR sont ensuite posés dans le thermocycleur avec les conditions d'amplification suivantes :

- Une dénaturation initiale à 94°C pendant 6 minutes
- 35 cycles de PCR : chaque cycle comprend 3 étapes : une dénaturation à 94°C pendant 30 secondes, une hybridation à 58°C pendant 30 secondes et une élongation à 72°C pendant 30 secondes.
- Une élongation finale à 72°C pendant 5 minutes

### **2.3 Le contrôle des produits par PCR**

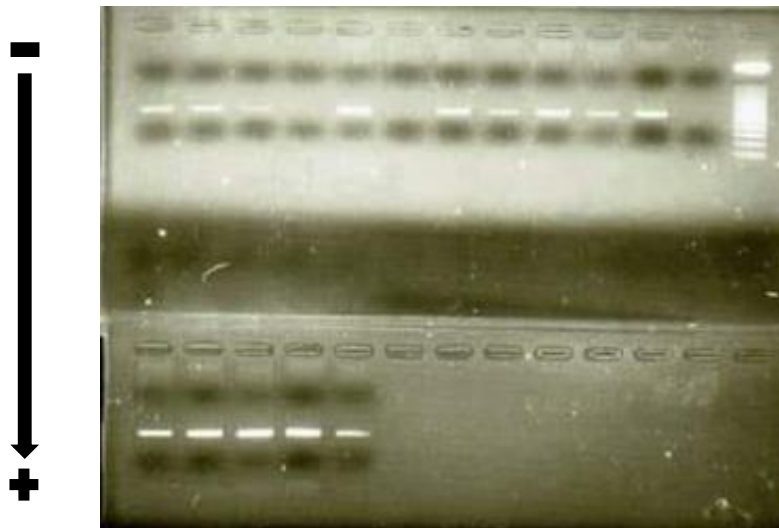
Une électrophorèse est nécessaire pour le contrôle d'amplification et la détection d'une éventuelle contamination de l'ADN (grâce au témoin Cette étape est réalisée grâce à une électrophorèse sur un gel d'agarose de 2 %.

L'électrophorèse est une méthode qui vise à séparer différentes particules en fonction de leur charge électrique, et de leur taille. La migration d'une molécule d'ADN dépend de sa taille et de la concentration du gel d'agarose, mais le voltage et la force ionique du tampon interviennent également. Les ADN sont des macromolécules chargés négativement qui peuvent migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration de TBE (Tris Borate EDTA).

Le gel a été préparé en mélangeant 2g d'agarose avec 100ml de TBE et le mettre à l'ébullition pour faire fondre l'agarose. Puis on ajoute 10 µl de Bromure d'éthidium (BET) qui est un agent intercalant se fixant entre les bases nucléiques rendant l'ADN fluorescent par exposition aux UV.

Les dépôts se font du côté cathode (-). Le système soumis à une migration sous un courant de 100 volts pendant 30 min, dans chaque puits du gel, la quantité de 10 µl du produit de PCR mélangée à 2 µl de tampon de charge été déposée.



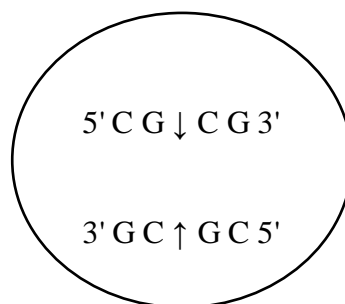


**Figure 14:** Le contrôle des produits PCR de la p53

#### 2.4 La digestion enzymatique des produits de PCR

Les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique utilisant l'enzyme de restriction *Bsh1236I* clivant la molécule à des endroits précis appelés sites de restriction.

L'enzyme de restriction *Bsh1236I* reconnaît la séquence palindromique 5'...CG /CG ...3' et clive nucléotides comme suit :



**Figure 15 :** Site de restriction de l'enzyme *Bsh1236I*

Pour procéder à la digestion des produits PCR nous préparons d'abord un mix de digestion selon le nombre des amplifias à digérés, l'ensemble, est ensuite incubé toute une nuit à 37°C. (Tableau 03).

**Tableau 03** : Mix de digestion

Composant	Volume
Mélange réactionnel de PCR	10 µl
Nucléase sans eau	18 µl
Tampon 10X R	2 µl
<i>Bsh1236I</i>	1-2 µl

### 2.5 L'électrophorèse des produits de digestion

Les fragments d'ADN digérés par l'enzyme de restriction sont séparés par électrophorèse, la petite taille de ces fragments, a nécessité la préparation d'un gel d'agarose plus résolutif à 3% (3g d'agarose dans 100ml de TBE à 1X).

La migration s'effectue sous un courant de 100volts pendant 45 min. Les fragments résultants sont ensuite visualisés sous UV. Le gel est ensuite photographié.

### 2. 6 Etude statistique analytique

Cette étude vise, d'avoir l'influence du polymorphisme Arg72pro de l'exon 4 du gène p53 dans la survenu du cancer colorectal.

L'étude statistique est basée sur l'OR et la *p-value* dans le but de déterminer s'il existe une association significative entre les polymorphismes étudiés et le cancer colorectal. Les calculs ont été faits en utilisant le logiciel EPI-info 5.01b.

#### 2.6.1 Le calcul de l'Odds Ratio

Pour le calcul de l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2×2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne. L'IC est de 95 % (ou 0,95).

**Tableau 04** : Tableau de contingence

	Malade	Témoins
Exposé	A	C
Non exposé	B	D

L'OR est calculé comme suit: **OR = a\*b / c\*d**

### **2.6.2 Le choix de la « *p value* »**

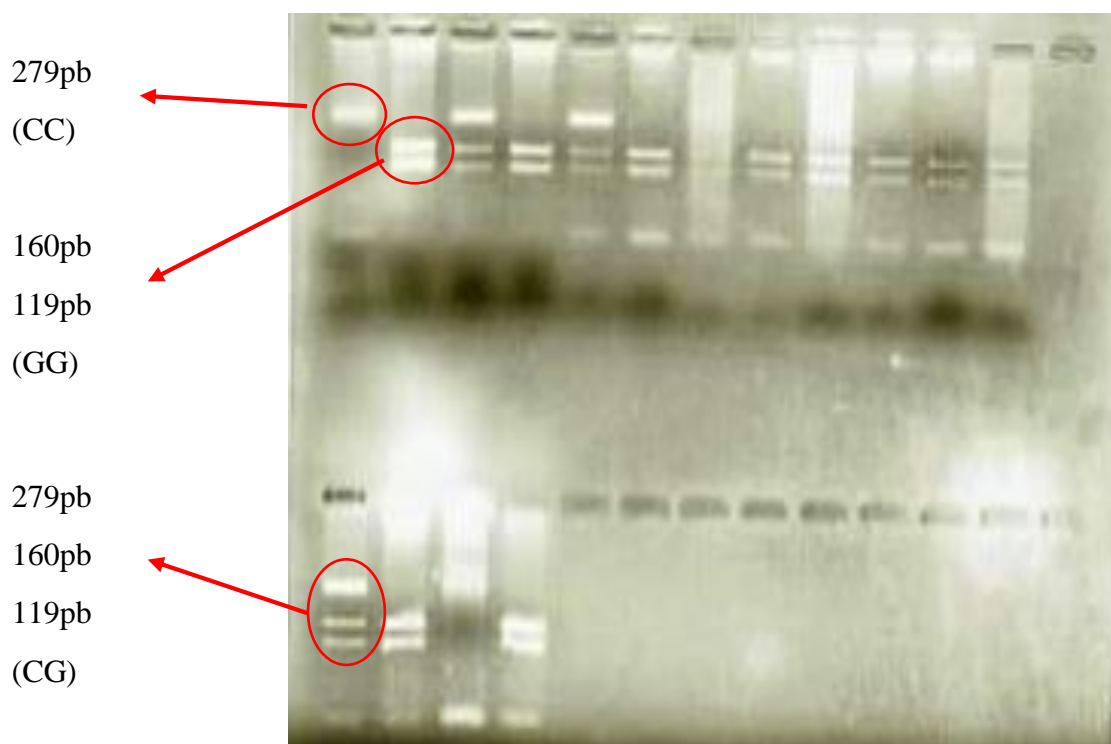
Pour la valeur  $p$ , le seuil critique *à priori* est de 0,05 (vu que l'IC pour l'OR est de 95 %). Si la valeur de  $p$  calculée *à posteriori* est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

# *Résultats*

### 1. Le profil électrophorétique du polymorphisme Arg72Pro de la p53

Notre analyse moléculaire vise à rechercher une association éventuelle entre le polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 et le cancer colorectal.

La digestion du produit d'amplification du gène p53 par l'enzyme de restriction *Bsh1236I* a révélé 3 fragments. Le premier apparait sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande correspondant au type homozygote normal (CC) (une bande de 279 pb), le deuxième sous forme de deux bandes (une de 160pb et l'autre de 119pb) correspondant au type homozygote muté (CG), le troisième sous forme de 3 bandes correspondant au type hétérozygote (CG) (bandes de 279pb, 160pb et 119pb) (Figure 15).



**Figure 16** : Profil électro-phorétique sur gel d'agarose des fragments issus par le clivage du *Bsh1236I* présentant différents génotypes de *p53*.

### 2. Etude analytique des profils génotypiques

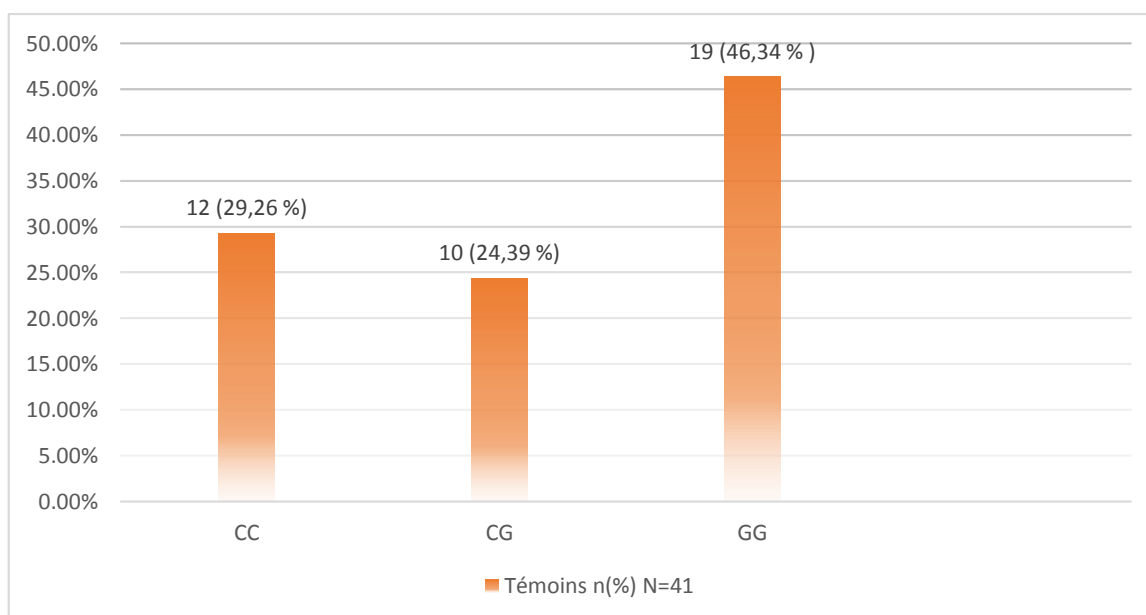
Une analyse moléculaire de l'échantillon (témoins + malades) a permis de mettre en évidence le polymorphisme du codon 72 de l'exon 4 du gène de la p53

Les fréquences alléliques des différents allèles C et G ainsi que les fréquences génotypiques, des homozygotes C/C (Pro/Pro), des hétérozygotes C/G (Pro/Arg) et des homozygotes G/G (Arg/Arg) chez les deux populations témoin et malade ont été calculées.

### 2.1 Dans la population témoin

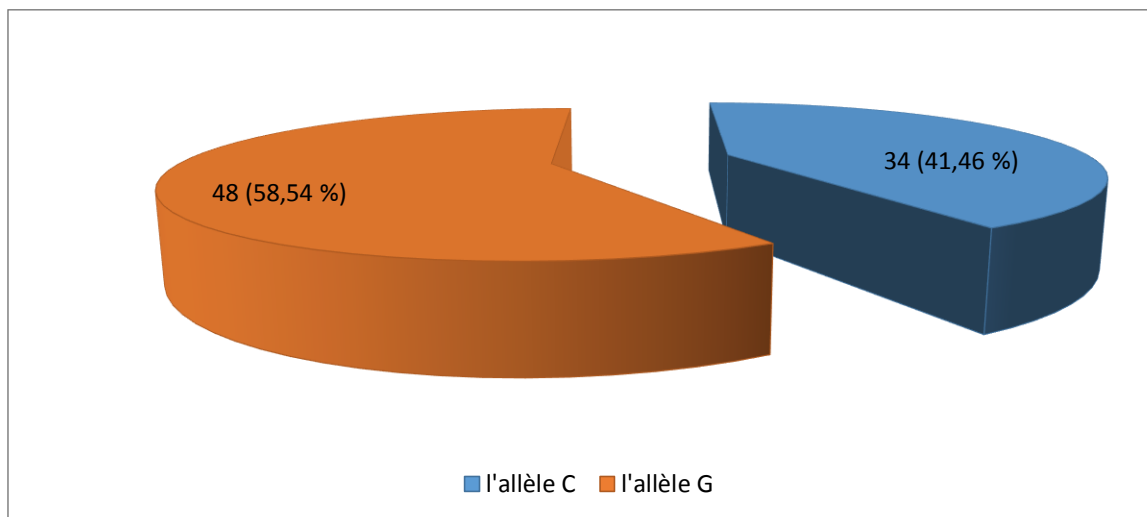
**Tableau 05** : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins

Génotype	n (%) N=41
CC	12 (29,26%)
CG	10 (24,39%)
GG	19 (46,34%)
L'allèle C	34 (41,46%)
L'allèle G	48 (58,54%)



**Figure 17** : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins.

Nous avons noté une prédominance de la fréquence génotypique mutée (GG) avec un taux de 46,34%, par contre les homozygotes sauvages (CC) représentent un taux de 29,26%, les hétérozygotes (CG) représentent un taux de 24,39%. L'allèle G est supérieur que l'allèle C par un taux de 58,54%.

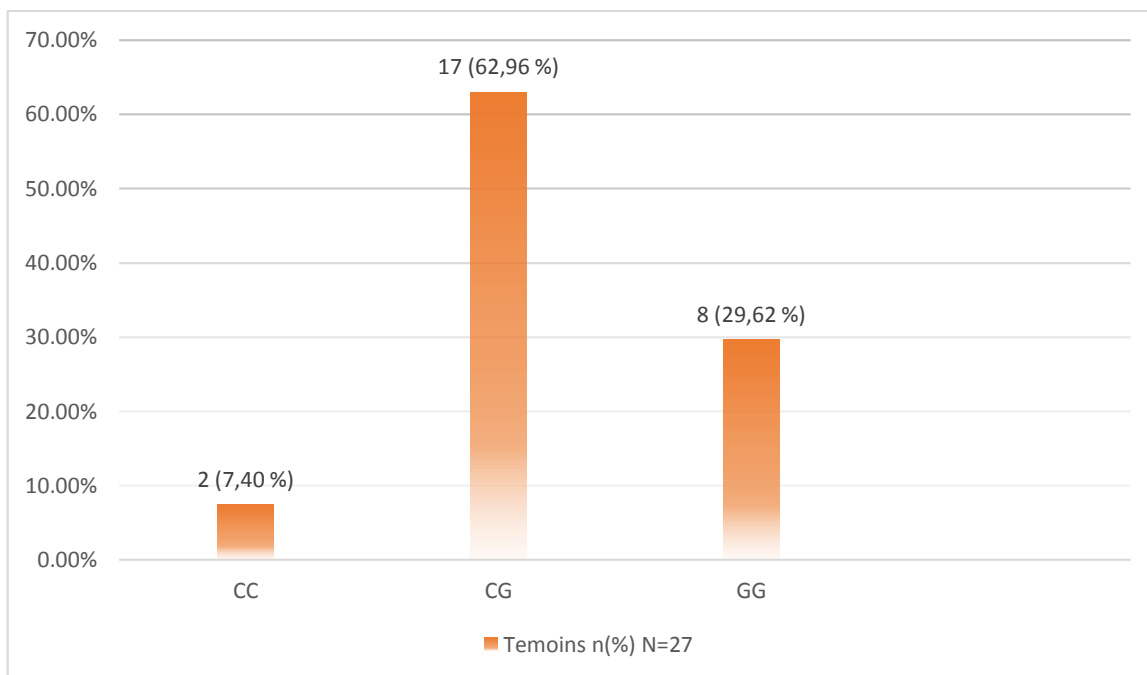


**Figure 18** : Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins

### 2.2 Dans la population des patients

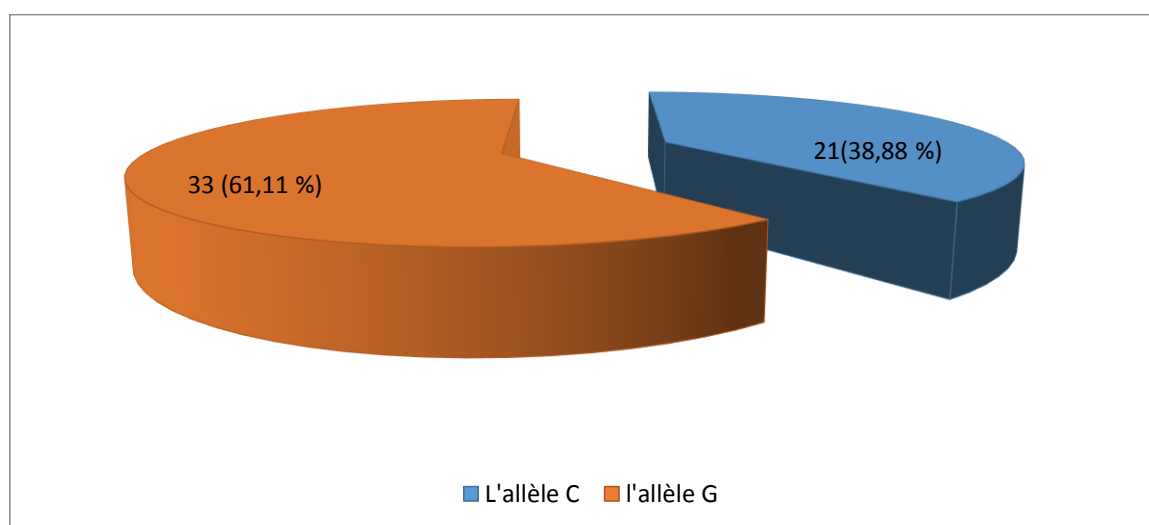
**Tableau 06** : Fréquences alléliques et génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades.

Génotype	Malades n(%) N=27
CC	2 (7,40%)
CG	17 (62,96%)
GG	8 (29,62%)
Allèle C	21(38,88%)
Allèle G	33(61,11%)



**Figure 19** : Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades

Dans la population des patients, les hétérozygotes CG représentent le pourcentage le plus élevé avec un taux de 62,96%, par contre les homozygotes CC (7,40%) représentent un pourcentage faible par rapport aux hétérozygotes avec un taux de GG (29,62%).



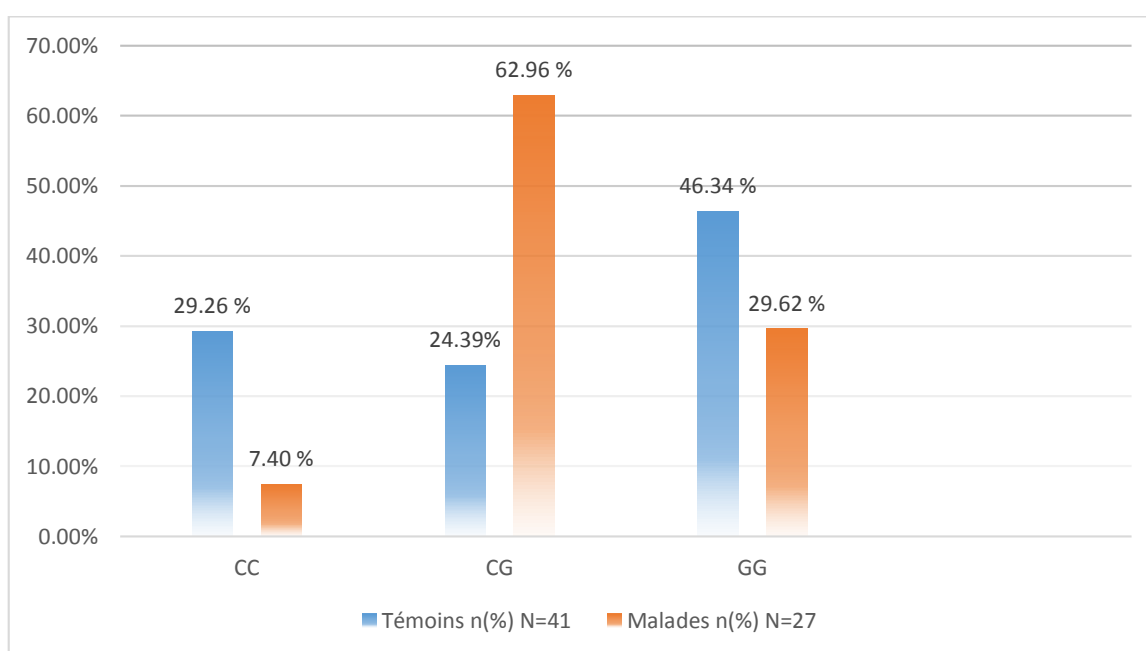
**Figure 20** : Fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population malades



En calculant les fréquences alléliques, nous avons noté que la fréquence de l'allèle G est plus élevée avec un taux de 61,11% contre un taux de 38,88% pour l'allèle C.

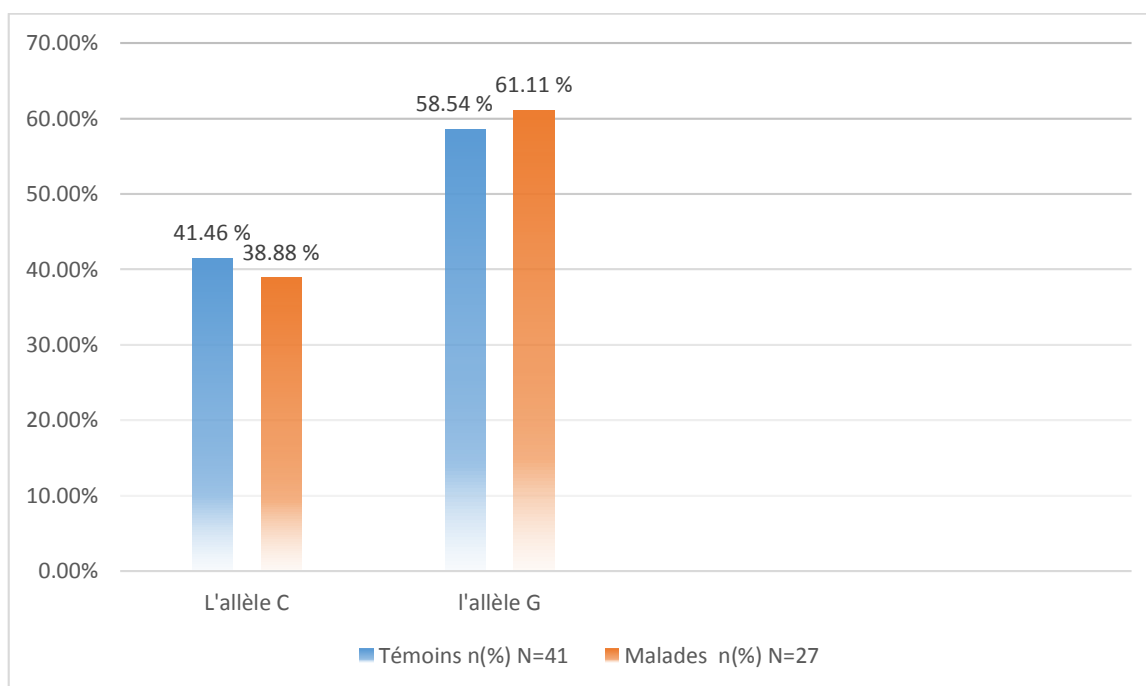
### 2.3 La comparaison entre les deux populations témoins et patients

La comparaison entre les fréquences génotypiques des deux groupes témoins et patients, montre qu'il y a une différence de répartition des valeurs pour les hétérozygotes CG ainsi que les homozygotes CC avec un taux d'hétérozygotes GC de 24,39% pour la population témoins et de 62,96 % pour la population des patients et un taux d'homozygotes CC de 29,26% pour les témoins contre 7,4% des patients. La répartition du génotype GG est relativement proche.



**Figure 21** : Comparaison des fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades

On comparant les fréquences alléliques, nous avons observé que la distribution des deux fréquences est relativement proche dans les deux populations. L'allèle G avec un pourcentage de 61,11% la population témoins pour contre 58,54% celle des patients. Ainsi que la fréquence de l'allèle C dans la population témoins (41,46%) et dans la population des patients (38,88%)



**Figure 22** : Comparaison des fréquences alléliques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades

### 3. L'analyse statistique des résultats

**Tableau 07**: Fréquences génotypiques du polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 dans la population témoins et la population malades.

Génotype	Témoins n(%) N =41	Malades n(%) N =27	OR	P value
CC	12(29,26%)	2(7,40%)	-----	-----
CG	10(24,39%)	17(62,96%)	0.10	<b>0.003</b>
GG	19(46,34%)	8(29,62%)	2.53	0.27
Allèle C	34(41,46%)	21(38,88%)	-----	-----
Allèle G	48(58,54%)	33(61,11%)	1.41	0.32

Après le calcul des Odds ratio et des *P value*, la comparaison des génotypes CC et CG montre un OR=0.10 et un *P*= 0.003, ce qui permet de conclure que le génotype CG constitue un facteur de risque pour CCR donc il y a une association significative entre le génotype CG du polymorphisme Pro72Arg du gène de la p53 et la survenue de CCR.

Cependant, les résultats observés lors de l'étude de la relation entre le génotype CC et le génotype GG ne montre aucune association significative (OR = 2.53 et *p*=0.27) ce qui exclut le génotype GG comme un facteur de risque pour la survenue du CCR.

Dans un même contexte, le résultat de l'étude de la relation entre les deux, allèle sauvage et muté ne montre aucune significativité.

# *Discussion*

La p53 est cruciale pour un contrôle correct de la transcription des gènes, de la synthèse et de la réparation de l'ADN, de l'arrêt du cycle cellulaire, de la sénescence et de l'apoptose. Des mutations dans p53 peuvent perturber ces fonctions, entraînant une instabilité génétique et la progression vers un cancer. L'inactivation du gène suppresseur de tumeur p53 est l'événement génétique connu le plus fréquent en cancérologie humaine. Elle résulte d'une double altération génétique affectant les deux allèles du gène avec pour conséquences la perte de la fonction suppresseur de tumeur et dans certains cas l'acquisition de propriétés transformantes (Jakob *et al.*,2017).

Le SNP Arg72Pro est un polymorphisme courant dans p53, il peut être en corrélation avec certaines tumeurs, comme le cancer de la prostate, le cancer du sein, et le cancer du poumon, le cancer colorectal. En particulier, les deux allèles Arg et Pro ont été révélés être associés à un risque de cancer (David *et al.*,2007 ; Xu *et al* 2012 ;Proestling *et al.*,2012)

Dans notre étude nous avons cherché à mettre en évidence le polymorphisme Arg72Pro dans l'exon 4 de p53 et sa relation avec la survenue du cancer colorectal. Ce travail a été réalisé par une PCR-RFLP pour amplifier la région d'intérêt puis différencier les génotypes de deux populations d'ADN : une population de patients atteints de CCR et une population de témoins.

Les résultats de notre travail ont révélé une différence significative pour le génotype hétérozygote CG (OR=0.10, P= 0.003) entre les deux groupes malades et témoins, ce qui permet de conclure que le génotype CG constitue un facteur de risque dans la survenue du cancer colorectal.

Plusieurs études ont établi l'impact de polymorphisme Arg 72pro de la p53 sur la survenue du CCR. Les résultats sont contradictoires.

Aizat *et al* (2011) après stratification selon l'âge, ont observé que les individus âgés de plus de 50 ans et porteurs du génotype pro / pro présentaient un risque significativement plus élevé avec (OR: 3,642 ; p= 0,026). Cela suggère que le SNP du codon 72 est associé à un risque sporadique de CCR et à des porteurs du génotype Pro / Pro et qu'il est susceptible de plus de 50 ans. (Aizat *et al.*,2011).

Tang *et al.* (2010) ont mené une méta-analyse portant sur 17 études cas-témoins et portant sur un total de 3537 cas de cancer colorectal et 5 168 témoins à l'étude. Ils n'ont pas

trouvé d'association significative du génotype Pro / Pro de p53 avec le cancer colorectal par rapport au génotype Arg / Arg. De même Economopoulos et *al.* n'ont pas non plus trouvé une association significative lorsqu'ils ont mené une méta-analyse portant sur 19 populations de race blanche, 6 populations chinoises et 2 populations mixtes (Economopoulos et *al.*, 2010).

Abderrahmane R et *al.* (2015) rejettent l'association du polymorphisme Arg72Pro avec le risque de développer le CCR. Ce résultat concorde avec une étude réalisée sur une population chinoise (Zhu et *al.*, 2007). Cependant, cette hypothèse est acceptée par deux autres études sur des populations gréco-caucasiennes et coréennes, qui ont signalé respectivement les allèles Arg ou Pro prédisposant au CRC (Cao et *al.*, 2009 ; Dakouras et *al.*, 2008). En addition, une méta-analyse sur des études cas-témoins (7414 cas et 9872 témoins), n'a montré aucune association entre l'état du polymorphisme p53 Arg72Pro et le risque de CRC dans soit des hommes ou des femmes.

Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par l'implication de ressources génétiques et environnementales supplémentaires. Cependant, Ce polymorphisme a un impact sur la fonction apoptotique de p53 de manière spécifique au tissu; de tels effets spécifiques de tissus de variants polymorphes représentent un défi supplémentaire pour les études d'association de risque de cancer chez l'homme (Azzam et *al.*, 2011; Dumont et *al.*, 2003).

Le polymorphisme Arg72Pro du gène p53 s'est révélé associé à des différences interindividuelles de l'expression de p53 dans les différentes tumeurs malignes, y compris le CCR. De plus, il a été rapporté que la variante Arg72 induit une apoptose nettement meilleure que la variante Pro72.

En conclusion, une analyse groupée des sous-groupes sur la base de l'ethnicité a montré que le polymorphisme p53 Arg72Pro est associé à un risque accru de cancer chez les Asiatiques et les Américains uniquement et n'est pas associé à d'autres populations. On peut donc en conclure que cette méta-analyse des données disponibles suggère une confirmation partielle de l'association entre le polymorphisme p53 Arg72Pro et la susceptibilité au risque de cancer (Xin Tian et *al.*, 2017).

*Conclusion*

Le développement du cancer est influencée par un certain nombre de facteurs, y compris le sexe, l'âge, les facteurs environnementaux, des conditions héréditaires, divers facteurs génétiques. Le gène suppresseur de tumeur p53 représente un puissant candidat à moduler le risque de cancer et est l'un des gènes les plus fréquemment muté dans tous les types de cancers (Dans 50 % des cancers humains).

Le cancer colorectal est un fléau mondial majeur de la santé en Algérie où il représente près de 13% des cancers et occupe la troisième place après les cancers du poumon et du sein.

Dans ce travail nous avons cherché à établir la relation entre le polymorphisme Arg72Pro du gène p53 sur la survenue du cancer colorectal.

Dans notre étude, nous avons trouvé une différence dans la distribution de fréquence génotypique entre les malades et les témoins du cancer colorectal. Ainsi, les résultats de notre étude ont montré que le génotype CG peut être considéré comme un risque probable de la survenue du cancer de colorectal ( $OR=0,10$  ;  $P=0,003$ ), alors que la comparaison entre la fréquence de l'allèle G muté et l'allèle sauvage C montré qu'il n'y a pas association de polymorphisme Arg72Pro et la survenue de cancer colorectal.

Il est à noter que le temps réservé à la réalisation pratique du travail et les difficultés rencontrés nous ont devancés la poursuite du travail. Toutefois, ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs vu le faible nombre de notre échantillon qui reste insuffisant pour une conclusion définitive. Il est donc essentiel d'élargir la population d'étude.

A la lumière de ce travail, nous proposons comme perspectives de poursuivre les travaux et explorer d'autres paramètres ainsi que d'autres gènes de la voie p53 susceptibles d'être impliqués dans la survenue du cancer colorectal.



*Références*  
*bibliographiques*

- **Abderrahmane, R., Louhibi, L., Moghtit, F. Z., Boubekour, A., Benseddik, K., Boudjema, A., ... & Saidi-Mehtar, N.** (2015). TP53 Arg 72Pro and MDM2 SNP309 polymorphisms and colorectal cancer risk: a west Algerian population study. *Pathology & oncology research*, 21(3), 629-635.
- **Abid, L.** (2009). Épidémiologie des cancers en Algérie: problématique des registres des cancers. *Journal africain du cancer/African Journal of Cancer*, 1(2), 98-103.
- **Aizat, A. A., Shahpudin, S. N., Mustapha, M. A., Zakaria, Z., Sidek, A. S., Abu Hassan, M. R., & Ankathil, R.** (2011). Association of Arg72Pro of P53 polymorphism with colorectal cancer susceptibility risk in Malaysian population. *Asian Pac J Cancer Prev*, 12(11), 2909-2913.
- **Aylon, Y., & Oren, M.** (2007). Living with P53, dying of P53. *Cell*, 130(4), 597-600.
- **Azzam, G. A., Frank, A. K., Hollstein, M., & Murphy, M. E.** (2011). Tissue-specific apoptotic effects of the P53 codon 72 polymorphism in a mouse model. *Cell Cycle*, 10(9), 1352-1355.
- **Balint, E., & Vousden, K. H.** (2001). Activation and activities of the P53 tumour suppressor protein. *British journal of cancer*, 85(12), 1813.
- **Benchimol, S., Lamb, P., Crawford, L. V., Sheer, D., Shows, T. B., Bruns, G. A. P., & Peacock, J.** (1985). Transformation associated P53 protein is encoded by a gene on human chromosome 17. *Somatic cell and molecular genetics*, 11(5), 505-510
- **Biegging, K. T., & Attardi, L. D.** (2012). Deconstructing P53 transcriptional networks in tumor suppression. *Trends in cell biology*, 22(2), 97-106.
- **Boland, C. R., & Goel, A.** (2010). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087
- **Borrás, C., Gómez-Cabrera, M. C., & Viña, J.** (2011). The dual role of P53: DNA protection and antioxidant. *Free radical research*, 45(6), 643-652.
- **Bouvier, A. M.** (2009). Epidémiologie descriptive du cancer colorectal en France. *BEH thématique*, 13.
- **Bray, F., Ren, J. S., Masuyer, E., & Ferlay, J.** (2013). Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *International journal of cancer*, 132(5), 1133-1145.

- **Bressac, B., Kew, M., Wands, J., & Ozturk, M.** (1991). Selective G to T mutations of P53 gene in hepatocellular carcinoma from southern Africa. *Nature*, 350(6317), 429.
- **Cao, Z., Song, J. H., Park, Y. K., Maeng, E. J., Nam, S. W., Lee, J. Y., & Park, W. S.** (2009). The P53 codon 72 polymorphism and susceptibility to colorectal cancer in Korean patients. *Neoplasma*, 56(2), 114.
- **Dakouras, A., Nikiteas, N., Papadakis, E., Perakis, M., VALIS, D., Rallis, G., ... & Karakitsos, P.** (2008). P53Arg72 homozygosity and its increased incidence in left-sided sporadic colorectal adenocarcinomas, in a Greek-Caucasian population. *Anticancer research*, 28(2A), 1039-1043.
- **DANCOURT, V., & FAIVRE, J.** (2004). Épidémiologie et dépistage des cancers colo-rectaux: Cancers colo-rectaux. *La revue du praticien*, 54(2), 135-142.
- **DeLeo, A. B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G. C., Law, L. W., & Old, L. J.** (1979). Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(5), 2420-2424.
- **Dixon, M. F.** (2002). Gastrointestinal epithelial neoplasia: Vienna revisited. *Gut*, 51(1), 130-131.
- **Dridi, W., Krabchi, K., Gadji, M., Lavoie, J., Bronsard, M., Fetni, R., & Drouin, R.** (2006). Activité dominante négative des protéines P53 mutées. *médecine/sciences*, 22(3), 301-307.
- **Dumont, P., Leu, J. J., Della Pietra III, A. C., George, D. L., & Murphy, M.** (2003). The codon 72 polymorphic variants of P53 have markedly different apoptotic potential. *Nature genetics*, 33(3), 357.
- **Duval, A., & Hamelin, R.** (2002). Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer research*, 62(9), 2447-2454.
- **Economopoulos, K. P., Sergentanis, T. N., Zagouri, F., & Zografos, G. C.** (2010). Association between P53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer risk: a meta-analysis. *Oncology Research and Treatment*, 33(12), 666-674.
- **Faivre, J.** (2001). *Epidémiologie et prévention du cancer colorectal*. Springer Science & Business Media.
- **Fearon, E. R., & Vogelstein, B.** (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *cell*, 61(5), 759-767.

- **Felley-Bosco, E., Weston, A., Cawley, H. M., Bennett, W. P., & Harris, C. C.** (1993). Functional studies of a germ-line polymorphism at codon 47 within the P53 gene. *American journal of human genetics*, 53(3), 752.
- **Ferlay, J., Soerjomataram, I., Ervik, M., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., ... & Bray, F.** (2012). *Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 11* [Internet]. International Agency for Research on Cancer, Lyon, France, 2013.
- **Ferron, M., Praz, F., & Pocard, M.** (2005). Génétique du cancer colorectal. In *Annales de chirurgie* (Vol. 10, No. 130, pp. 602-607).
- **Fodde, R., Smits, R., & Clevers, H.** (2001). APC, signal transduction and genetic instability in colorectal cancer. *Nature Reviews Cancer*, 1(1), 55.
- **Frank, A. K., Julia, I., Leu, J., Zhou, Y., Devarajan, K., Nedelko, T., ... & Murphy, M. E.** (2011). The codon 72 polymorphism of P53 regulates interaction with NF- $\kappa$ B and transactivation of genes involved in immunity and inflammation. *Molecular and cellular biology*, 31(6), 1201-1213
- **Grady, W. M.** (2003). Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*, 124(6), 1574-1594.
- **Green, D. R., & Kroemer, G.** (2009). Cytoplasmic functions of the tumour suppressor P53. *Nature*, 458(7242), 1127.
- **Haggar, F. A., & Boushey, R. P.** (2009). Colorectal cancer epidemiology: incidence, mortality, survival, and risk factors. *Clinics in colon and rectal surgery*, 22(04), 191-197.
- **Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., & Harris, C. C.** (1991). p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015), 49-53.
- **Hunt, R., Quigley, E., Abbas, Z., Eliakim, A., Emmanuel, A., Goh, K. L., ... & Whorwell, P.** (2013). Prise en charge des symptômes gastro-intestinaux courants dans la communauté.
- **Issa, J. P.** (2004). CpG island methylator phenotype in cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4(12), 988
- **Kato S, Han SY, Liu W, Otsuka K, Shibata H, Kanamaru R, Ishioka C,**(2003).
- **Kodal, J. B., Vedel-Krogh, S., Kobylecki, C. J., Nordestgaard, B. G., & Bojesen, S. E.** (2017). TP53 Arg72Pro, mortality after cancer, and all-cause mortality in 105,200 individuals. *Scientific reports*, 7(1), 336.

- **Koushik, A., Tranah, G. J., Ma, J., Stampfer, M. J., Sesso, H. D., Fuchs, C. S., ... & Hunter, D. J.** (2006). P53 Arg72Pro polymorphism and risk of colorectal adenoma and cancer. *International journal of cancer*, 119(8), 1863-1868.
- **Laurent-Puig, P., Agostini, J., & Maley, K.** (2010). Colorectal oncogenesis. *Bulletin du cancer*, 97(11), 1311-1321
- **Leggett, B., & Whitehall, V.** (2010). Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*, 138(6), 2088-2100.
- **Levine, A. J., & Oren, M.** (2009). The first 30 years of P53: growing ever more complex. *Nature reviews cancer*, 9(10), 749.
- **Li X, Dumont M,** (2005)." The codon 47 polymorphism in P53 is functionally
- **Lichtenstein, P., Holm, N. V., Verkasalo, P. K., Iliadou, A., Kaprio, J., Koskenvuo, M., ... & Hemminki, K.** (2000). Environmental and heritable factors in the causation of cancer—analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *New England journal of medicine*, 343(2), 78-85.
- **Linzer, D. I., & Levine, A. J.** (1979). Characterization of a 54K dalton cellular SV40 tumor antigen present in SV40-transformed cells and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell*, 17(1), 43-52.
- **Lopez, N. E., & Yeh, J. J.** (2016). *Gastrointestinal Malignancy: Genetic Implications to Clinical Applications*. In *Gastrointestinal Malignancies* (pp. 393-479). Springer, Cham.
- **Mammano, E., Belluco, C., Bonafe, M., Olivieri, F., Mugianesi, E., Barbi, C., ... & Nitti, D.** (2009). Association of P53 polymorphisms and colorectal cancer: modulation of risk and progression. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 35(4), 415-419.
- **Millau, J. F., Bastien, N., Bouchard, É. F., & Drouin, R.** (2009). P53 Pre-and post-binding event theories revisited: stresses reveal specific and dynamic P53-binding patterns on the p21 gene promoter. *Cancer research*, 69(21), 8463-8471
- **Naccarati, A., Polakova, V., Pardini, B., Vodickova, L., Hemminki, K., Kumar, R., & Vodicka, P.** (2012). Mutations and polymorphisms in TP53 gene—an overview on the role in colorectal cancer. *Mutagenesis*, 27(2), 211-218.
- **Olschwang, S., Hamelin, R., Laurent-Puig, P., Thuille, B., De Rycke, Y., Li, Y. J., ... & Thomas, G.** (1997). Alternative genetic pathways in colorectal carcinogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(22), 12122-12127.

- **Oren, M.** (1985). The P53 cellular tumor antigen: gene structure, expression and protein properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, 823(1), 67-78
- **Ørsted, D. D., Bojesen, S. E., Tybjærg-Hansen, A., & Nordestgaard, B. G.** (2007). Tumor suppressor P53 Arg72Pro polymorphism and longevity, cancer survival, and risk of cancer in the general population. *Journal of Experimental Medicine*, 204(6), 1295-1301.
- **Parente, S.** (2010). Diagnostic moléculaire des cancers colorectaux métastatiques: Facteurs prédictifs de réponse aux thérapies ciblées anti-EGFR et organisation du génotypage KRAS en Lorraine (Doctoral dissertation, UHP-Université Henri Poincaré).
- **Pérez, L. O., Abba, M. C., Dulout, F. N., & Golijow, C. D.** (2006). Evaluation of P53 codon 72 polymorphism in adenocarcinomas of the colon and rectum in La Plata, Argentina. *World journal of gastroenterology: WJG*, 12(9), 1426.
- **Pim, D., & Banks, L.** (2004). P53 polymorphic variants at codon 72 exert different effects on cell cycle progression. *International journal of cancer*, 108(2), 196-199.
- **Proestling, K., Hebar, A., Pruckner, N., Marton, E., Vinatzer, U., & Schreiber, M.** (2012). The Pro allele of the P53 codon 72 polymorphism is associated with decreased intratumoral expression of BAX and p21, and increased breast cancer risk. *PLoS One*, 7(10), e47325
- **Raisonnier, A., Wright F.**(2003) ." Molécules informationnelles".Cours de Biochimie PCEM2, Biochimie métabolique et Régulations C1.
- **Rajagopalan, S., Andreeva, A., Rutherford, T. J., & Fersht, A. R.** (2010). Mapping the physical and functional interactions between the tumor suppressors P53 and BRCA2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8587-8592.
- **Salvioli, S., Bonafé, M., Barbi, C., Storci, G., Trapassi, C., Tocco, F., ... & Monti, D.** (2005). P53 codon 72 alleles influence the response to anticancer drugs in cells from aged people by regulating the cell cycle inhibitor p21WAF1. *Cell Cycle*, 4(9), 1264-1271
- **Smeenk, L., & Lohrum, M.** (2010). Behind the scenes: unravelling the molecular mechanisms of P53 target gene selectivity. *International journal of oncology*, 37(5), 1061-1070.
- **Smyrk, TC. Kelsen, D. P., Daly, J. M., Kern, S. E., Levin, B., Tepper, J. E., & Van Cutsem, E.** (2008). *Principles and Practice of Gastrointestinal Oncology*. (2nd Édition). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 41:555-565.

- **Soussi, T., Dehouche, K., & Béroud, C.** (2000). L'analyse des mutations du gène P53 dans les cancers humains: le lien entre l'épidémiologie et la carcinogénèse.
- **Strum, W. B.** (2016). Colorectal adenomas. *New England Journal of Medicine*, 374(11), 1065-1075.
- **Sullivan, G. A.** (2004). Geography and identity in Marlowe. In *The Cambridge Companion to Christopher Marlowe* (pp. 231-244). Cambridge University Press
- **Tang, N. P., Wu, Y. M., Wang, B., & Ma, J.** (2010). Systematic review and meta-analysis of the association between P53 codon 72 polymorphism and colorectal cancer. *European Journal of Surgical Oncology (EJSO)*, 36(5), 431-438
- **Thomas, M., Kalita, A., Labrecque, S., Pim, D., Banks, L., & Matlashewski, G.** (1999). Two polymorphic variants of wild-type P53 differ biochemically and biologically. *Molecular and cellular biology*, 19(2), 1092-1100.
- **Tian, X., Dai, S., Sun, J., Jiang, S., & Jiang, Y.** (2017). The association between the TP53 Arg72Pro polymorphism and colorectal cancer: an updated meta-analysis based on 32 studies. *Oncotarget*, 8(1), 1156.
- **Torre, L. A., Siegel, R. L., Ward, E. M., & Jemal, A.** (2016). Global cancer incidence and mortality rates and trends—an update. *Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers*, 25(1), 16-27.
- **Tsong, W. H., Koh, W. P., Yuan, J. M., Wang, R., Sun, C. L., & Yu, M. C.** (2007). Cigarettes and alcohol in relation to colorectal cancer: the Singapore Chinese Health Study. *British journal of cancer*, 96(5), 821.
- **Vousden, K. H., & Prives, C.** (2009). Blinded by the light: the growing complexity of P53. *Cell*, 137(3), 413-431.
- Weinberg, R. A. (2007). *The Biology of Cancer*. New York, USA: Garland Science.
- **Whibley, C., Pharoah, P. D., & Hollstein, M.** (2009). P53 polymorphisms: cancer implications. *Nature reviews cancer*, 9(2), 95.
- **Winawer, SJ, Fletcher, RH, Miller, L., Godlee, F., Stolar, MH, Mulrow, CD, ... et Rosen, L.** (1997). Dépistage du cancer colorectal: directives cliniques et justification. *Gastroenterology*, 112 (2), 594-642.
- **Xu, C. T., Zheng, F., Dai, X., Du, J. D., Liu, H. R., Zhao, L., & Li, W. M.** (2012). Association between TP53 Arg72Pro polymorphism and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, 13(9), 4305-4309.

- **Yu, X., Harris, S. L., & Levine, A. J.** (2006). The regulation of exosome secretion: a novel function of the P53 protein. *Cancer research*, 66(9), 4795-4801.
- **Zhu, Z. Z., Wang, A. Z., Jia, H. R., Jin, X. X., He, X. L., Hou, L. F., & Zhu, G.** (2007). Association of the TP53 codon 72 polymorphism with colorectal cancer in a Chinese population. *Japanese journal of clinical oncology*, 37(5), 385-390.
- **Zisman, A. L., Nickolov, A., Brand, R. E., Gorchow, A., & Roy, H. K.** (2006). Associations between the age at diagnosis and location of colorectal cancer and the use of alcohol and tobacco: implications for screening. *Archives of internal medicine*, 166(6), 629-634.



# *Annexe*

**La séquence de la P53 EXON 4 279 pb Arg72Pro**

gtgggaagcgaaaattccatgggactgactttctgctcttgtctttcagacttc  
tgaaaacaacgttctggtaaggacaaggggtgggctggggacctggagggctgg  
gacctggagggctggggggctggggggctgaggacctggtcctctgactgctct  
ttcaccatctacag**TCCCCCTTGCCGTCCCAAGCAATGGATGATTTGATGCTT**  
**CCCCGGACGATATTGAACAATGGTTC**ACTGAAGACCCAGGTCCAGATGAAGCTC  
**CAGAATGCCAGAGGCTGCTCCCC**CGTGGCCCCTGCACCAGCAGCTCCTACACG  
**GCGGCCCTGCACCAGCCCCCTCCTGGCCCCTGTCATCTTCTGTCCCTTCCCAA**  
**AAACCTACCAGGGCAGCTACGGTTTCCGTCTGGGCTTCTTGCATTCTGGGACAC**  
**CAAGTCTGTGACTTGCACG**gtcagttgccctgaggggctggcttccatgagact  
caatgcctggccgtatccccctgcatttcttttgtttgggaacttgggattccc  
ttcacccttggcttctctgtcagtgttt

## Résumé

Le gène suppresseur de tumeur p53 est l'un des gènes muté dans 50% des cancers, il a été rapporté qu'un changement d'une Arginine (Arg) en une Proline (Pro) au niveau du codon 72 de ce gène pourrait accroître le risque de la survenue du cancer colorectal.

Dans notre étude nous avons cherché une estimation de la fréquence du polymorphisme Arg72Pro dans deux populations (patients et témoins) ainsi de tenter d'établir une éventuelle relation entre ce polymorphisme et la survenue du cancer colorectal. Le génotypage a été réalisé par une méthode de PCR-RFLP.

Les résultats obtenus dans notre étude ont révélé une différence significative entre les deux groupes malades et témoins pour le génotype hétérozygote CG (OR=0.10, P= 0.003), ce qui permet de conclure que le génotype CG constitue un facteur de risque dans la survenue du cancer colorectal.

Par contre la comparaison de l'allèle sauvage C avec l'allèle muté G avec un (OR= 1.41, P=0.32) conclue que l'allèle muté G n'est pas lié à un risque accru de cancer colorectal.

En conclusion, ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs, une étude plus large avec un échantillon plus important est nécessaire pour pouvoir confirmer nos résultats dans le futur.

**Mots-clés :** le cancer colorectal, p53, polymorphisme Arg72Pro, PCR-RFLP

## Summary

The tumor suppressor gene p53 is one of the genes mutated in 50% of cancers, it has been reported that a change from an Arginine (Arg) to a Proline (Pro) at codon 72 of this gene could increase the risk of the occurrence of colorectal cancer.

In our study we sought an estimation of the frequency of Arg72Pro polymorphism in two populations (patients and controls) and to try to establish a relationship between this polymorphism and the occurrence of colorectal cancer. Genotyping was performed by a PCR-RFLP method.

The results obtained in our study revealed a significant difference between the two patient and control groups for the CG heterozygous genotype (OR = 0.10, P = 0.003), which allows us to conclude that the CG genotype constitutes a risk factor in the occurrence colorectal cancer.

Thus, the comparison of the wild-type C allele with the mutated G allele with a (OR = 1.41, P = 0.32) concludes that the mutated allele G is not linked to an increased risk of colorectal cancer.

In conclusion, these results can not be confirmatory, a larger study with a larger sample is needed to confirm our results in the future.

**Key words:** Colorectal cancer, p53, Arg72Pro polymorphism, PCR-RFLP

## ملخص

الجين القامع للورم p53 هو أحد الجينات المتحورة في 50% من السرطانات ، وقد تم الكشف عن أن التغيير في القاعدة أرجينين (Arg) بقاعدة أخرى بروتين (Pro) في الرامزة 72 من هذا الجين يساهم في زيادة خطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم.

في هذا البحث (المرضى، الشواهد) قمنا بدراسة لتقييم تواتر تعدد الأشكال Arg72Pro في مجموعتين (المرضى، الشواهد) و تقييم إمكانية الإصابة بسرطان القولون والمستقيم ولقد تم إجراء هذه الدراسة بواسطة طريقة PCR-RFLP.

كشفت النتائج التي تحصلنا عليها في دراستنا وجود اختلاف كبير بين المجموعتين (المرضى والضوابط) في التركيب الوراثي غير المتجانس CG (OR = 0.10)، (P = 0.003) ، والذي يسمح لنا أن نستنتج أن التركيب الوراثي CG يشكل عامل خطر في حدوث سرطان القولون والمستقيم.

من ناحية أخرى، فإن مقارنة الأليل C النقي مع الأليل G المتحور (OR = 1.41، P = 0.32) يدل على أن الأليل المتحور G غير مرتبط بخطر الإصابة بسرطان القولون والمستقيم.

في النهاية، لا يمكن القول إن هذه النتائج مؤكدة، إذ يستوجب دراسة أكبر تحتوي على عدد أكبر من العينات و هذا أمر ضروري لتأكيد نتائجنا في المستقبل.

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون والمستقيم , تعدد الأشكال Arg72Pro , p53 , PCR-RFLP

Année universitaire : 2018 - 2019

Présenté par : KHEBBAB Inès  
BOUFLIGHA Asma

**Etude de l'association entre le polymorphisme Arg72Pro du gène de la p53 et le risque du cancer colorectal**

**Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Génétique**

**Résumé**

Le gène suppresseur de tumeur p53 est l'un des gènes muté dans 50% des cancers, il a été rapporté qu'un changement d'une Arginine (Arg) en une Proline (Pro) au niveau du codon 72 de ce gène pourrait accroître le risque de la survenue du cancer colorectal.

Dans notre étude nous avons cherché une estimation de la fréquence du polymorphisme Arg72Pro dans deux populations (patients et témoins) ainsi de tenter d'établir une éventuelle relation entre ce polymorphisme et la survenue du cancer colorectal. Le génotypage a été réalisé par une méthode de PCR-RFLP.

Les résultats obtenus dans notre étude ont révélé une différence significative entre les deux groupes malades et témoins pour le génotype hétérozygote CG (OR=0.10, P= 0.003), ce qui permet de conclure que le génotype CG constitue un facteur de risque dans la survenue du cancer colorectal.

Par contre la comparaison de l'allèle sauvage C avec l'allèle muté G avec un (OR= 1.41, P=0.32) conclue que l'allèle muté G n'est pas lié à un risque accru de cancer colorectal.

En conclusion, ces résultats ne peuvent pas être confirmatifs, une étude plus large avec un échantillon plus important est nécessaire pour pouvoir confirmer nos résultats dans le futur.

**Mots-clés :** le cancer colorectal, p53, polymorphisme Arg72Pro, PCR-RFLP

**Laboratoires de recherche :**

Laboratoire de Biologie et de Génétique moléculaire (Université Salah Boubnidere, Constantine 3).  
Laboratoire de Biologie Moléculaire et Cellulaire (Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Présidente du jury:** Dr *GHERZOULI- FERTOUL Razika* (MCA-Université des Frères Mentouri, Constantine 1)

**Encadreur :** Dr *SEDRATI- ZAAF Khadidja* (MCB - Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

**Examineur :** Dr *ZIADA-BOUCHAAR Hadia* (MCB- Université des Frères Mentouri, Constantine 1).

