

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

République Algérienne Démocratique et Populaire

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



جامعة الإخوة منتوري قسنطينة I
Frères Mentouri Constantine I University
Université Frères Mentouri Constantine I

Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département : Biochimie et Biologie cellulaire et
moléculaire

كلية علوم الطبيعة والحياة
قسم الكيمياء الحيوية والبيولوجيا الخلوية
والجزينية

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

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

N° d'ordre :

N° de série :

Intitulé :

Etude de la mutation G12D du gène KRAS dans le cancer de l'ovaire

❖ Présenté par : DIABI Sabrine

Le : 21/06/2023

DJEGHMOUNE Djihad Nasreddine

❖ Jury d'évaluation :

Encadrante 1 : MOUSSAOUI Samira

(MCB-UFM, Constantine 1).

Encadrante 2 : AYACHI Ouarda Sariyah

(MCB- CRBt Constantine).

Présidente de jury : MEDOUKALI Imane

(MCB-UFM, Constantine1).

Examinatrice : OUNIS Leyla

(MCA -UFM, Constantine 1).

Année universitaire 2022 – 2023

Remerciements

Le plus grand remerciement à 'ALLAH' qui nous a donné la patience, le courage et la volonté pour réaliser ce mémoire.

*Nous tenons à remercier sincèrement notre encadrante **Dr. MOUSSAOUI Samira** pour sa patience, ses orientations, sa compétence et pour être là quand on a besoin d'elle. Merci madame.*

*Notre sincère gratitude à **Dr. AYACHI Ourada Sariyah**, comme encadrante 2, qui a toujours été très disponible tout au long de la réalisation de ce mémoire, ainsi que pour l'inspiration, l'aide et simplement, merci pour tout.*

*Un grand merci aux membres de jury, **Dr. MEDOUKALI Imene** et **Dr. OUNIS Leila** pour l'honneur qu'ils nous ont fait d'évaluer et de juger notre travail. Leurs remarques et suggestions ne feront que parfaire ce travail.*

Dédicace

Je dédie ce modeste travail à tous mes proches et toutes les personnes qui ont me rassurer et croire en moi

A mes très chers parents et surtout ma mère Tes sacrifices et tes Prières m'ont permis de vivre ce jour. rien ne saurait exprimer la fierté, la reconnaissance et l'Amour que je te porte.

Mon binôme, Sabine

Ces quelques mots ne suffisent pas pour exprimer toute ma gratitude envers toi. On a commencé cette spécialité ensemble et on la fini ensemble. Sans toi, ce travail n'aurait jamais vu le jour.

A Mon Frère Abderrahmane Dj

Merci de m'avoir motivé, sans vous je m'ennuierai. Vous êtes la meilleure chose qui me soit arrivée

À ma sœur, ses filles et '3amty'

Qui n'ont pas Cessée de me conseiller, encourager et soutenir tout au long de mes Études. Merci pour Les moments agréables que nous avons passés

A Mes très chères amies

Sabry, Nachwa, Ayoub, Mounir, Rahim, Abdou, Doha, Alaa, Sam²i, Sara³, Sofi, Monder, Salah, Tessnim, Nada, Yahya, Akram, Zaki, Tadjou et Lilya.

& A special thanks to my Fav singer-songwriter T,swift.

J'ai le plaisir de dédier à chacune de vous ce modeste travail Merci pour votre présence, votre amitié, votre compréhension, votre patience et vos encouragements.

Puisse Dieu vous combler de bonheur, de santé et de réussite.

-Joe-

Dédicace

*In loving memory of my dear father **Aziz** Allah yarhmou, my source of strength, the best support since day one, who taught me everything I know and loved me unconditionally.*

You will be deeply missed.

*To my dear mom **Abla**, thank you, mother, for your unconditional love, your sacrifices, for making me always feel that I'm the best person alive, for being always proud of me and being there for me no matter what.*

*To my sisters **Amina, Mayssa, Maya** and my sister-in-law **Nina** for making difficult moments easier for me, I'm so lucky to have you and wish you lots of success.*

*A special cute thank you to my baby niece **Jana Mayane** (aka moumouch - bata :v) for bringing so much joy to the house and to my heart specially.*

*To my brothers **Lhadi, Tarek and Chakib** for being the best brothers and best support, so grateful and lucky to have you guys.*

*To my partners in crime, **Nachoua, Wissal, Rayane, and Djouheina** ;
Thank you for the beautiful memories we shared together, for making college a lot fun and easy for me. I wish you happiness and lots of success.*

*To my binome , **L'joe** , it was quite difficult but it wouldn't be complete without your effort so thank you and i wish you a bright future.*

-Sabrine-

Liste des abréviations

- A** : Adénosine
- ADN** : acide désoxyribonucléique
- AKT** : Protein kinase B
- ARMS**: Amplification-refractory mutation system
- ARNm**: Acide ribonucléique messenger
- ASR**: Age-standardized rate
- BRAF**: V-Raf murine sarcoma viral oncogene homolog B
- BRCA** : Breast Cancer
- CA125** : Antigène du cancer 125
- Ca²⁺** : ions de calcium
- DHEA** : Déshydroépiandrostérone
- DHEAS** : Sulfate de déshydroépiandrostérone
- DHT** : Dihydrotestostérone
- EDTA** : Éthylène-diamine-tétra-acétique
- FIGO** : fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
- FSH**: Follicle stimulating hormone
- GAP**: GTPase-activating proteins
- GDP**: Guanosine Diphosphate
- GEF**: Guanine nucleotide exchange factors
- Gly**: Glycine
- GR**: Globule rouge
- GTP**: Guanosine 5'-triphosphate
- HGSC**: High-grade serous ovarian cancer
- HRAS**: Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
- HRM**: High Resolution Melt
- HVR**: Région hypervariable
- IRM** : Imagerie par résonance magnétique
- KRAS** : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
- LGSC**: Low-grade serous ovarian cancer
- LH**: Luteinizing hormone

MAPK: Mitogen-activated protein kinase
mg: Milligram
MMR: Mismatch repair
M-RAS: Muscle RAS Oncogene Homolog
nm : Nanomètre
NRAS : neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NTP : Nucléotides triphosphate
PBS : Solution saline tamponnée au phosphate
PI3K: Phosphatidylinositol-3-kinase
RAF: Rapidly accelerated fibrosarcoma
Ral : Ras-related protein
Rap : Receptor-associated protein
RAS : Rat sarcoma
RBC : Red blood cells
RCPG : les récepteurs couplés à la protéine G
RFLP : Restriction fragment length polymorphism
R-RAS : Ras-related protein
RTK : Récepteurs de tyrosines kinases
SDS: Sodium dodecyl sulfate
SNP: Single Nucleotide Polymorphisms
T: Testostérone
TBE: Tris Borate EDTA
Thr: Threonine
TP53: Tumor protein 53
U: unité
UTR: Untranslated region

Liste des figures

Figure 1 : Appareil génital féminin	3
Figure 2 : Coupe transversale de l'ovaire.....	4
Figure 3 : Différents stades de la folliculogenèse.....	5
Figure 4 : Nombre des cas d'incidence et de mortalité des femmes par le cancer d'ovaire en 2020	10
Figure 5 : Structure des domaines des différentes protéines de Ras.....	16
Figure 6 : Isoformes du gène KRAS (KRAS4A et KRAS4B)	16
Figure 7 : Structure de KRAS4B	17
Figure 8 : Modifications et réarrangements structurelles des molécules RAS lors de la liaison des nucléotides	18
Figure 9 : Voies de signalisation de la protéine RAS	19
Figure 10 : Mutations somatiques de l'oncogène RAS dans les 10 principaux cancers humains	20
Figure 11 : Régulation du cycle Ras GDP–GTP dans les cellules normales et néoplasiques.....	21
Figure 12 : Présentation schématique du principe de la PCR.....	27
Figure 13 : Profil électrophorétique de produits de PCR obtenus	34
Figure 14 : Profil électrophorétique de produits de la digestion enzymatique.....	34

Liste des tableaux

Tableau 1 : Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO	9
Tableau 2 : Fréquence des quatre mutations génétiques parmi le cancer épithélial de l'ovaire	22
Tableau 3 : Age moyen des deux populations d'étude.....	30
Tableau 4 : Répartition des cas et témoins par tranches d'âge.....	30
Tableau 5 : Répartition des cas selon le type histologique.....	32
Tableau 6 : Répartition des cas et témoins par l'état et la durée de mariage	33
Tableau 7 : Fréquences génotypiques du polymorphisme du gène KRAS	35
Tableau 8 : Fréquences alléliques du polymorphisme du gène KRAS.	36

Table des matières

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction générale 1

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 : Cancer de l’ovaire

1. Appareil génital féminin	3
2. Ovaire	3
2.1. Anatomie descriptive	3
2.2. Fonctionnement.....	4
3. Cancer de l’ovaire	6
3.1. Classification et histotypes du cancer de l’ovaire.....	6
3.2. Epidémiologie	10
3.3. Facteurs de risque	10
3.4. Facteurs protecteurs	12
3.5. Diagnostic	13
3.6. Traitement	13

Chapitre 02 : Gène KRAS

1. Famille RAS	15
1.1. Structure	15
2. Gène KRAS	16
2.1. Structure	17
2.2. Voie de signalisation	18
2.3. KRAS et oncogenèse	19
2.4. Types des mutations	20
2.5. Physiopathologie	21
2.6. Mutation du KRAS et cancer d’ovaire	21
2.7. Techniques de détection des mutations KRAS	23

Partie expérimentale

Matériel et Méthodes

1. Population d'étude	25
2. Méthodes	25
2.1. Préparation des échantillons	25
2.1.1. Extraction de l'ADN génomique	25
2.1.2. Détermination de la concentration et de la pureté de l'ADN extrait ...	26
2.2. Détection de la mutation par PCR-RFLP.....	27
2.2.1. Amplification des fragments d'intérêt par PCR	27
2.2.2. Visualisation des fragments amplifiés	28
2.2.3. Détection de la mutation par digestion enzymatique.....	28
2.2.4. Révélation des produits de digestion	29
2.3. Etude statistique	29

Résultats et Discussion

1. Etude descriptive	30
1.1. Moyenne d'âge	30
1.2. Répartition par tranches d'âge	30
1.3. Répartition selon le type histologique.....	32
1.4. Répartition selon l'état et la durée de mariage.....	33
2. Analyse de produits de PCR obtenus	33
3. Digestion des produits de PCR par l'endonucléase de restriction BstNI.....	34
3.1. Analyse des fréquences génotypiques du polymorphisme du gène KRAS .	35
3.2. Analyse des fréquences alléliques du polymorphisme du gène KRAS	36
3.3. Répartition des mutations selon le type histologique	37

Conclusion et perspectives

Références bibliographiques

Annexes

Résumés

INTRODUCTION GENERALE

Le cancer est un ensemble des altérations moléculaires spécifiques induisant une cellule normale à devenir maligne. Il est la cause de mortalité, la plus fréquente, dans la plupart des régions du monde (**Momenimovahed Z. et al., 2019**). Les tumeurs malignes gynécologiques présentent les cancers les plus courants chez les femmes. Elles constituent à cet effet, un problème important de santé (**Krishnan R., 2018**). Parmi ces cancers, il figure le cancer de l’ovaire.

Dans notre pays, il constitue le 5^{ème} cancer le plus fréquent de tous les types de cancers gynécologiques avec 1042 nouveaux cas et 685 décès enregistrés en 2020 selon l’organisation mondiale de la santé (OMS) (**Web 1**). Il a été montré que le cancer de l’ovaire chez les femmes algériennes présente des caractéristiques clinicopathologiques et biologiques similaires à celui des femmes d’origine européenne. Il provoque ainsi, le plus grand nombre de décès chez les femmes en Algérie, d’où la nécessité de mettre l’accent sur ce problème de santé publique (**Cherbal F. et al., 2018**).

Il s’agit d’une maladie hétérogène avec de multiples sous-types classés en fonction de caractéristiques histologiques et génétiques distinctes (**Rankin E.B., 2019**). Le type épithélial est le type pathologique le plus fréquent, avec cinq histotypes principaux, qui diffèrent en origine, pathogénèse, altérations moléculaires, facteurs de risque et pronostic (**Brett M. et al., 2017**). Il existe divers facteurs de risque qui peuvent contribuer à l’apparition de ce cancer, à savoir l’âge, ménopause, l’obésité, le tabac, les maladies gynécologiques (comme l’endométriose) et surtout les facteurs génétiques (**Webb P.M. & Jordan S.J., 2017**). Parmi les gènes que les chercheurs devraient mettre en lumière dans cette maladie, les mutations du gène KRAS.

Le gène du Kirsten rat sarcoma (KRAS) est l'oncogène le plus couramment muté dans les cancers humains (**Wang S. et al., 2022**). Il est associé à un mauvais diagnostic, à une résistance au traitement et à la thérapie. Ce gène est situé sur le chromosome 12p12, et code pour une protéine de 21 kDa (**Dobrzycka B. et al., 2009 ; Krishnan R., 2018**). En cancer de l’ovaire, des mutations de KRAS sont observées dans les codons 12, 13 et 61, conduisant à la protéine RAS constitutivement active ouvrant la voie à une augmentation aberrante de la croissance tumorale et de la transformation maligne. Plusieurs études ont montré l’importance de la mutation KRAS, en particulier le polymorphisme G12D qui était fortement présent dans de nombreuses études par rapport à d’autres polymorphismes (G12C, G12V et etc.) (**Therachiyil L. et al., 2022**).

Le présent travail a pour objectif d'analyser la mutation G12D au niveau du gène KRAS, et de rechercher une éventuelle corrélation entre ce polymorphisme et le risque d'apparition ou de développement d'un cancer de l'ovaire.

SYNTHESE
BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre 1 :

Cancer de l'ovaire

1. Appareil génital féminin

La femme possède un appareil génital unique et propre à l'espèce humaine (Lejeune J., 2011), elle représente l'ensemble des organes féminines responsables de la fonction de reproduction.

L'appareil génital féminin se compose d'organes externes et internes. Les organes externes comprennent le mont du pubis, les grandes lèvres, les petites lèvres, le clitoris, l'orifice génital, l'hymen, l'orifice urinaire, les glandes de Bartholin. Les organes internes regroupent deux glandes sexuelles, les ovaires et les voies génitales, formées des trompes utérines, de l'utérus et du vagin (Wainsten J.P., 2012) (Figure 1).

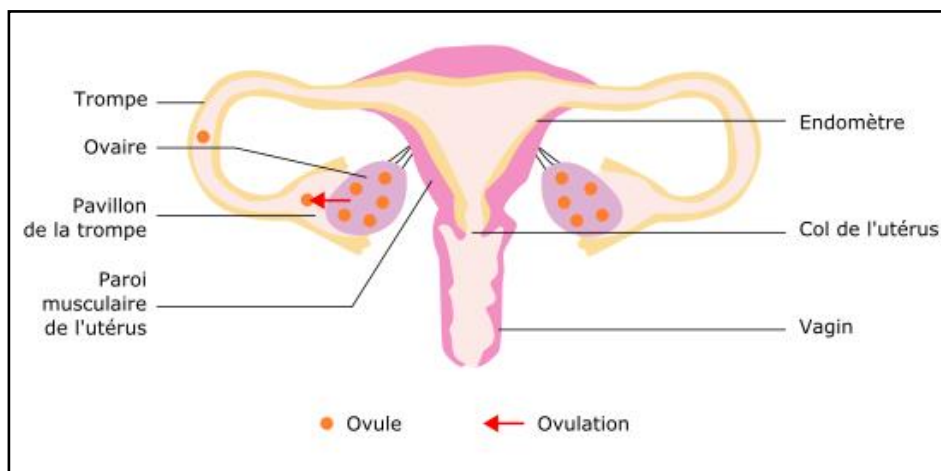


Figure 1 : Appareil génital féminin (Web 2)

2. Ovaire

L'ovaire est une unité indispensable de reproduction et de santé féminine. Cependant, l'étude de la fonction ovarienne chez les mammifères est entravée par des défis uniques, qui comprennent le développement désynchronisé des ovocytes, la distribution irrégulière, la grande disparité de taille des follicules et le remodelage dynamique des tissus au cours de chaque cycle hormonal (Soygur B. & Laird D.J., 2021).

2.1. Anatomie descriptive

L'ovaire est un organe pair de siège intrapéritonéal situé dans le petit bassin, de part et d'autre de l'utérus, en arrière du ligament large (Bazot M. *et al.*, 2004). Cette glande a une forme ovoïde et un peu aplatie. Pendant la période d'activité génitale, l'ovaire mesure 3,5 cm de longueur, 2 cm de largeur, 1 cm d'épaisseur et pèse 8 grammes (Rame A. & Théron S., 2009), mais ses dimensions varient avec l'âge. À la coupe d'un ovaire

normal, il existe plusieurs régions macroscopiquement identifiables (**Bazot M. et al., 2016**) représentant :

- ✚ Un épithélium cubique simple entouré d'une fine couche conjonctive sous-épithéliale leur donnant une couleur blanchâtre : l'albuginée.
- ✚ Le corps de l'ovaire, ou stroma ovarien, est riche en cellules et notamment en fibroblastes. On y distingue deux zones :
 - La périphérie du stroma ou cortex : qui comprend de nombreux follicules contenant des gamètes femelles (ovocytes) à différents stades de développement.
 - La zone centrale du stroma ou zone médullaire : est quant à elle constituée d'un tissu conjonctif fibreux dans lequel sont localisés les vaisseaux sanguins, lymphatiques et les nerfs (**Boinet A., 2017**) (**Figure 2**).

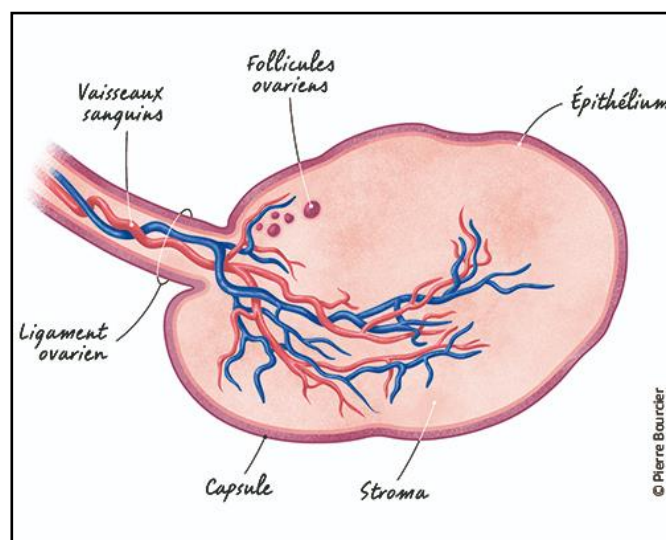


Figure 2 : Coupe transversale de l'ovaire (**Web 3**)

2.2. Fonctionnement

L'ovaire a une double fonction, exocrine et endocrine sous le contrôle des gonadotrophines hypophysaires (l'hormone folliculostimulante (FSH) et l'hormone lutéinisante (LH) (**Bazot M. et al., 2004**).

- ✚ Fonction exocrine : consistant à libérer à chaque cycle menstruel un ovocyte ou ovule prêt à être fécondé. Le développement folliculaire aboutissant à l'ovulation est un phénomène épisodique cyclique permettant de la puberté à la ménopause environ 400 ovulations.
- ✚ Fonction endocrine : permettant de produire les hormones stéroïdiennes dites sexuelles : essentiellement les œstrogènes et la progestérone ainsi que les androgènes (**Michèle F.G., 2017**).

2.2.1. Folliculogénèse

La folliculogénèse correspond au processus exocrine traduit par la croissance et la maturation d'un follicule simple et de petite taille dit 'follicule primordial' en un follicule complexe de grande taille qui s'appelle le follicule de Degraaf ou mur. Ce dernier libère son ovocyte : c'est l'ovulation

Ce processus se déroule en 4 étapes (**Figure 3**) :

- L'initiation ou recrutement folliculaire.
- La croissance basale jusqu'au stade prénatal.
- La sélection et la dominance du follicule sélectionné.
- La maturation (**Bénard J. & Grynberg M., 2015 ; Bazot M. et al., 2016**).

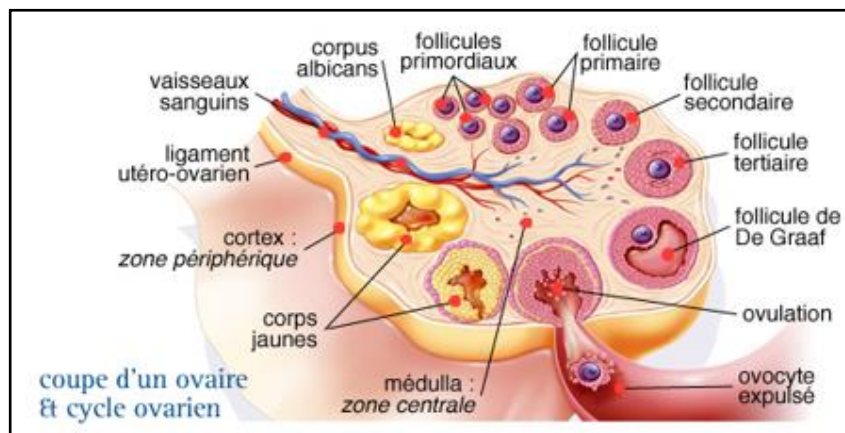


Figure 3 : Différents stades de la folliculogénèse (**Boinet A., 2017**)

2.2.2. Stéroïdogénèse

Il s'agit d'une fonction endocrine qui correspond à la production d'hormones stéroïdes sexuelles par les ovaires (**Bazot M. et al., 2016**).

- ✚ Les œstrogènes : sont des hormones sexuelles primaires qui appartiennent au groupe des stéroïdes qui comprennent : l'estradiol, l'estriol et l'estrone. Ils jouent un rôle dans le développement et le maintien des caractères sexuels secondaires chez la jeune femme à la puberté et intervient dans la sélection du follicule dominant (**Heath J.W. et al., 2008**).
- ✚ La progestérone : c'est une hormone stéroïde endogène couramment produite par le cortex surrénal et les ovaires (testicules aussi). Elle est également sécrétée par le corpus luteum ovarien au cours des dix premières semaines de grossesse, suivie par le placenta au stade ultérieur de la grossesse. Elle joue donc un rôle vital dans le maintien de l'utérus pendant la grossesse (**Cable J.K. & Grider M.H., 2023**).

✚ Les androgènes : ils sont produits dans tout le corps dans les organes producteurs de stéroïdes, tels que les glandes surrénales, les ovaires et les autres tissus **(Bienenfeld A. et al., 2019)**. Les principaux androgènes chez les femmes, classés par ordre décroissant de concentration sérique, comprennent : sulfate de déshydroépiandrostérone (DHEAS), déshydroépiandrostérone (DHEA), androsténédione (A), testostérone (T) et dihydrotestostérone (DHT) **(Burger H.G., 2002)**. Ils ont un impact dans l'apparition, la distribution et le maintien de la pilosité féminine, sur la libido féminine, mais également sur les troubles métaboliques, à savoir la répartition androïde de la masse grasse et l'apparition d'une résistance à l'insuline liée à l'obésité abdominale **(Gosselin J., 2016)**.

3. Cancer de l'ovaire

Le cancer d'ovaire est un cancer qui se développe également à partir d'une croissance anormale des cellules ovariennes **(Moisan A.M., 2007)**, il se forme dans les tissus de l'ovaire sous forme des tumeurs primitifs ou secondaires, bénins ou malins, d'aspect kystique solide ou mixte **(Zilfi W., 2012)**.

Dans la plupart de ces cancers, les carcinomes épithéliaux, commencent dans les cellules de la surface de l'ovaire ou au niveau des cellules germinales. Ils passent souvent inaperçus, jusqu'à ce qu'ils se répandent dans le bassin et l'abdomen. A ce stade tardif, le cancer de l'ovaire est plus difficile à traiter et est souvent fatal **(Eymard J., 2014)**.

3.1. Classification et histotypes du cancer de l'ovaire

La classification des tumeurs se fait selon leur aspect morphologique et leur localisation par observation microscopique d'une biopsie **(Delehedde M., 2006)**.

3.1.1. Tumeurs épithéliales

Les tumeurs épithéliales communes sont développées à partir du revêtement de l'ovaire, c'est le sous-type pathologique qui prédomine **(Buy J.N., & Hugol D., 2004 ; Wambecke A., 2019)**. Les quatre types histologiques les plus courants de cancer de l'ovaire épithélial sont séreux, endométrioïde, cellule claire et tumeur mucineuse. Il peut être classé en deux sous-types : type I ou type II.

La tumeur de type I comprend des carcinomes séreux, endométrioïdes, à cellules claires mucineux de faible grade, qui proviennent principalement des tumeurs prolifératives atypiques (borderline).

Les tumeurs de type II comprennent le carcinome séreux de haut grade et le carcinome indifférencié.

Les tumeurs de type I sont habituellement présentes à un stade précoce et sont de faible grade, sauf pour la cellule claire, qui est considérée comme de haut grade. Leur activité proliférative est généralement faible. Ils sont diagnostiqués tôt et portent un bon pronostic, en comparaison, aux tumeurs de type II qui sont des tumeurs de haut grade et presque toujours de stade avancé et ils ont une activité proliférative élevée avec une progression rapide et agressive.

- ✚ **Type séreux** : est le sous-type le plus courant de carcinome ovarien. Il se présente sous forme de tumeurs de faible grade (LGSC) (10 % de toutes les tumeurs du sous-type sérique) ou de carcinome de haut grade (HGSC) (90 % de toutes les tumeurs du sous-type sérique). Le premier montre une mitose rare, et moins d'anomalies moléculaires, contrairement au second qui montre une mitose significative avec plus de copies d'anomalies moléculaires. D'autres analyses ont révélé qu'une fréquence élevée des mutations KRAS et BRAF sont trouvées dans le carcinome séreux de bas grade, alors que le carcinome séreux de haut grade présente une fréquence élevée de mutations des gènes p53 et BRCA 1 et 2 avec une absence de mutation KRAS/BRAF (**Arora T. et al., 2023**).
- ✚ **Type endométrioïde** : les tumeurs endométrioïdes sont composées de cellules qui ressemblent à celles de la paroi interne de l'utérus, l'endomètre. Ces tumeurs constituent environ 10-25% des cancers ovariens. Elles sont surtout malignes.
- ✚ **Type cellule claire** : les tumeurs à cellules claires sont constituées de cellules polygonales ayant un cytoplasme riche en glycogène. Ces tumeurs représentent seulement 4-5% des tumeurs malignes de l'ovaire.
- ✚ **Type mucineux** : les tumeurs mucineuses sont caractérisées par une prolifération de cellules mucosécrétantes qui ressemblent aux cellules épithéliales endocervicales ou intestinales. Ce type compte pour environ 10% des tumeurs de l'ovaire (**Chen V.W. et al., 2003**) et est souvent hétérogène, où un mélange d'éléments, y compris les tumeurs bénignes et malignes, sont trouvés dans un seul spécimen. Les mutations de KRAS sont fréquentes dans ces tumeurs (**Arora T. et al., 2023**).

3.1.2. Cancer des cellules germinales

L'épithélium germinale couvre la surface de l'ovaire du nourrisson. Les tumeurs germinales dérivent des cellules germinales primitives de l'ovaire embryonnaire. Elles représentent 20 à 30% de toutes les tumeurs ovariennes malignes (**Gică N. et al., 2022**).

3.1.3. Tumeur stromale

Les tumeurs stromales commencent à partir des cellules des tissus structuraux qui maintiennent l'ovaire ensemble et produisent les hormones féminines œstrogène et progestérone. Environ 1% des cancers ovariens sont des tumeurs des cellules stromales ovariennes. Plus de la moitié des tumeurs stromales sont trouvées chez les femmes de plus de 50 ans, mais environ 5% des tumeurs stromales se produisent chez les jeunes filles **(Web 4)**.

Le degré d'extension de la tumeur permet de définir le stade de progression du cancer de l'ovaire. C'est la Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (créée en 1998) qui a défini ce classement en 4 stades bien distincts, la dernière mise à jour de cette classification datant de 2014 **(Wambecke A., 2019) (Tableau 1)**.

Tableau 1 : Stades de développement des tumeurs ovariennes classifiées selon le système FIGO (Prat J., 2015)

Stades	Descriptions
I	Tumeur confinée aux ovaires.
IA	Tumeur limitée à un seul ovaire (Capsule intacte). Aucune tumeur à la surface de l'ovaire sans ascite.
IB	Tumeur limitée à un seul ovaire (Capsule intacte). Aucune tumeur à la surface de l'ovaire sans ascite.
IC	Tumeur limitée à un ovaire ou aux deux avec l'un des éléments suivants : -IC1 : déversement chirurgical. -IC2 : capsule rompue avant la chirurgie ou la tumeur à la surface de l'ovaire. -IC3 : cellules malignes dans les ascites.
II	Tumeur impliquant un ovaire ou les deux avec extension pelvienne ou cancer primaire péritonéal.
IIA	Extension et/ou implants sur l'utérus et/ou les trompes de Fallope et/ou les ovaires.
IIB	Extension à d'autres tissus pelviens intrapéritonéaux.
IIC	Tumeur de stade 1A et 1B, mais avec des tumeurs sur la surface d'un ou des deux ovaires ou présentant une capsule rompue ou la présence d'ascite contenant des cellules cancéreuses.
III	Tumeur impliquant un ou les deux ovaires ou des trompes de Fallope, ou cancer péritonéal primaire, avec cytologiquement ou histologiquement confirmé propagation au péritoine à l'extérieur du bassin et/ou des métastases aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux.
IIIA	Ganglions lymphatiques rétropéritonéaux positifs seulement.
IIIB	Métastase péritonéale macroscopique au-delà du bassin jusqu'à 2 cm dans la plus grande dimension, avec ou sans métastase aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux
IIIC	Métastase péritonéale macroscopique au-delà du bassin de plus de 2 cm dans la plus grande dimension, avec ou sans métastase aux ganglions lymphatiques rétropéritonéaux
IV	Métastases distantes à l'exclusion des métastases péritonéales

3.2. Epidémiologie

Le cancer de l'ovaire est le troisième cancer gynécologique le plus répandu dans le monde en 2020 (Huang J. *et al.*, 2022).

Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), en 2020, un total de 313 959 nouveaux cas, ainsi que 207 252 nouveaux décès de cancer de l'ovaire ont été enregistrés dans le monde (Figure 4), avec une incidence ASR (age-standardized rate) de 6,6 pour 100 000, et de mortalité 4,2 pour 100 000 (Huang J. *et al.*, 2022).

En Algérie, le cancer de l'ovaire arrive en cinquième place dans les cancers les plus fréquents chez les femmes avec un total de 1042 nouveaux cas, ainsi que 685 nouveaux décès de cancer de l'ovaire ont été enregistrés localement (Web 1).

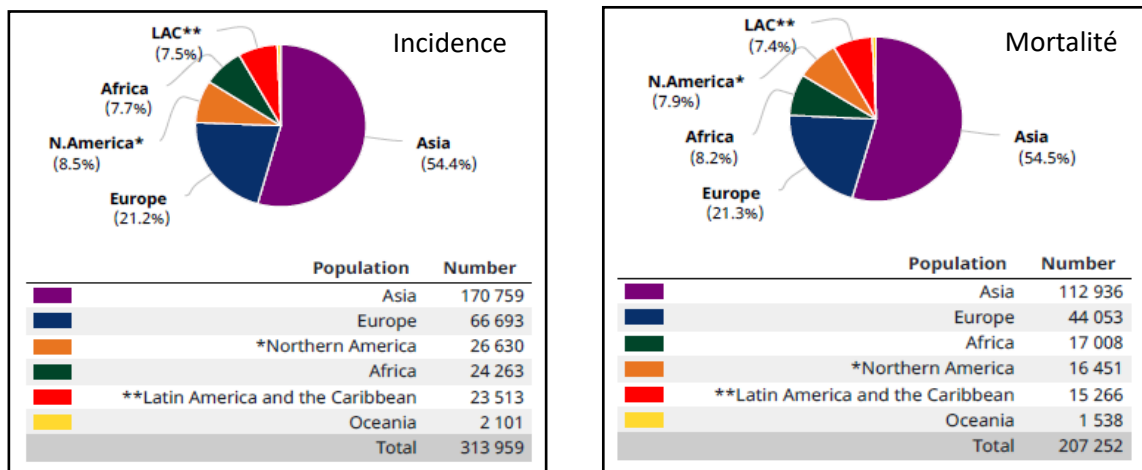


Figure 4 : Nombre des cas d'incidence et de mortalité des femmes par le cancer d'ovaire en 2020 (Web 1)

Le taux de survie à 5 ans du cancer de l'ovaire, varie de 30 % à 90 %. Les patientes aux premiers stades ont habituellement un taux de survie élevé de près de 90 %, mais un grand nombre de patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire sont diagnostiquées comme des malades au stade avancé (Shao Y. *et al.*, 2018).

3.3. Facteurs de risque

Bien que les événements moléculaires impliqués dans l'initiation, la progression de la carcinogenèse des cellules ovariennes soient mal connus, quelques facteurs sont susceptibles de contribuer à la tumorigenèse :

3.3.1. Age et ovulation

Chez les femmes pré-ménopausées, l'axe hypophyso-ovarien est sous le contrôle d'un mécanisme de rétroaction pour atteindre le cycle mensuel. Les gonadotrophines, LH et FSH, sont synthétisées et libérées de l'hypophyse dans la circulation. La LH et la FSH stimulent l'ovulation ; par conséquent les ovaires produisent des hormones et des facteurs

comme l'œstrogène, la progestérone et l'inhibine alpha. Les facteurs ovariens à leur tour atteignent l'hypophyse pour supprimer la synthèse et les libérations de gonadotrophines. Chez les femmes ménopausées, les ovaires ne produisent plus d'hormones et de facteurs, et la boucle de rétroaction est manquante. Par conséquent, l'hypophyse produit des gonadotrophines accrues, qui stimulent et favorisent la transformation des cellules épithéliales de la surface ovarienne (**Rampersad A.C. et al., 2015**)

La nulliparité, l'infertilité, la prise d'hormones et les contraceptifs oraux à la ménopause augmentent aussi les risques de développement du cancer de l'ovaire (**Salehi F. et al., 2008 ; Fathalla M.F., 1971**).

3.3.2. Obésité

L'obésité peut être associée à l'arrêt de l'ovulation chez les femmes préménopausées et à l'augmentation des niveaux d'œstrogènes chez la femme ménopausée, de sorte que les adipocytes sont la principale source d'œstrogène, qui est également produit par aromatisation périphérique de la testostérone. Ces événements pourront contribuer à la tumorigenèse des cellules de l'ovaire (**Salehi F. et al., 2008; Shen F. et al., 2017; Webb P.M. & Jordan S.J., 2017**).

3.3.3. Tabagisme

Les cigarettes contiennent plus de 60 carcinogènes qui peuvent altérer le fonctionnement de l'ovaire, affecter les concentrations des hormones stéroïdiennes et engendrer des problèmes de fertilité (**El-Masri R., 2012**). Il a été proposé que le tabagisme puisse induire des mutations dans le gène KRAS ou exercer un pouvoir cancérigène plus fort effet sur les cellules sans gène KRAS fonctionnel (**Faber M.T. et al., 2013**).

3.3.4. Facteurs gynécologiques

Il existe des facteurs gynécologiques influençant la survenue de ce cancer comme l'endométriose, il a également été constaté que les femmes atteintes de cette maladie présentent un risque accru de certains types de cancer de l'ovaire.

L'endométriose est un processus d'une maladie gynécologique inflammatoire commun, dépendant des œstrogènes, dans lequel le tissu endométrial normal est anormalement présent en dehors de la cavité utérine (**Hoyle A.T. & Puckett Y., 2023**). Le fer produit dans le liquide de kyste endométriosique favorise le stress oxydatif, qui peut entraîner des mutations génétiques (**Brilhante A. et al., 2017**).

Les maladies inflammatoires pelviennes, les kystes ovariens qui même bénins pourraient aussi jouer un rôle de précurseur pour les tumeurs ovariennes malignes (**Momenimovahed Z. et al., 2019**).

3.3.5. Predisposition génétique au cancer d'ovaire

Environ 15 % des cancers ovariens sont héréditaires. Les cancers ovariens héréditaires sont causés par une variante pathogène germinale d'un gène de susceptibilité BRCA1 et BRCA2 (**Desseignés C. & Benusiglio P., 2022**). Ces derniers sont liés au cancer du sein et des ovaires. Ils ont une fonction dans les processus de réparation de l'ADN et donc ils sont des gènes suppresseurs de tumeur. Il y a des centaines de mutations identifiées dans ces gènes (**Varol U. et al., 2018**).

L'oncogène KRAS encode pour une petite protéine pouvant lier les GTPs. Cette protéine a normalement un rôle dans la signalisation intracellulaire en interagissant avec les récepteurs de type tyrosine-kinase. Plusieurs études ont rapporté des mutations dans le proto-oncogène KRAS dans plusieurs cas de tumeurs mucineuses ou de tumeurs à faible potentiel de malignité. Dans la plupart de ces tumeurs, une mutation dans les codons 12 et 13 du gène amène une activation constitutive de la protéine (**L'Espérance S., 2008**).

La présence des mutations de divers gènes comme les gènes de la voie de réparation MMR (mismatch repair) qui est retrouvée dans 10 à 15% des cas de cancers de l'ovaire. Ces mutations font partie des facteurs définissant le syndrome de Lynch qui est responsable de 10 à 15% des cancers de l'ovaire héréditaire (**Momenimovahed Z. et al., 2019; Wambecke A., 2019**).

3.4. Facteurs protecteurs

La grossesse est un facteur protecteur. Ce bénéfice est notamment retrouvé lorsque la dernière grossesse a lieu tardivement dans la vie génitale, période où le parenchyme ovarien présente souvent des lésions précancéreuses qui pourraient régresser à l'arrêt des ovulations (**Brun J.L. et al., 2012**). De plus l'allaitement et la prise de contraceptifs oraux sont aussi associés à une diminution du risque de cancer de l'ovaire puisqu'ils inhibent l'ovulation.

La consommation de poissons, des aliments végétaux, de lentilles et de pois participe à diminuer ce risque (**Salehi F. et al., 2008**).

3.5. Diagnostic

Les cancers ovariens sont très difficiles à diagnostiquer à des stades précoces car les symptômes, lorsque présents, ne sont pas spécifiques (L'Espérance S., 2008), il existe différents examens pourront diagnostiquer ce cancer :

3.5.1. Examen clinique

Cet examen est réalisé par l'échographie endovaginale qui consiste à introduire une sonde dans le vagin. Elle permet de visualiser un éventuel kyste dans un ovaire ou dans les deux et d'en préciser la nature. Si l'échographe n'arrive pas à déterminer précisément la nature du kyste, l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet en effet d'obtenir des images plus précises de l'organisme (Web 5).

3.5.2. Bilan biologique

Antigène du cancer 125 (CA125), aussi appelé antigène des glucides 125, a le rôle le plus important dans le dépistage, la détection et la gestion du cancer de l'ovaire. CA125 est une glycoprotéine mucineuse de poids moléculaire élevé trouvée à la surface de cellules cancéreuses des ovaires. Cet antigène est ensuite éliminé et quantifié dans des échantillons sériques de cancer des ovaires des patients. Les taux sériques de CA125 sont élevés dans 50 % des tumeurs au stade précoce, et 92 % des tumeurs au stade avancé (Charkhchi P. *et al.*, 2020).

3.5.3. Diagnostic histologique

Le principe de la biopsie est de prélever un échantillon du tissu suspect afin de réaliser un examen microscopique des cellules qui le composent. Elle permet de confirmer ou d'écarter avec certitude le diagnostic du cancer. Une fois le diagnostic est confirmé, le médecin réalise un bilan d'extension afin de choisir le traitement le plus adapté (Web 5).

3.6. Traitement

Le traitement est adapté à chaque patiente en fonction de son âge, de ses antécédents médicaux et chirurgicaux, de son état de santé global et des caractéristiques du cancer.

3.6.1. Chirurgie :

La chirurgie est le traitement de référence du cancer de l'ovaire. Elle vise à supprimer la totalité de la tumeur et des cellules cancéreuses qui pourraient migrer vers les organes voisins.

3.6.2. Chimiothérapie :

La chimiothérapie est un traitement administré par voie orale ou par injection et est envisagée lorsque le risque de progression de la maladie est élevé, c'est-à-dire quand

la tumeur n'est plus exclusivement localisée au niveau ovarien et/ou quand le grade de la tumeur est avancé. La plupart du temps, une chimiothérapie est prescrite de façon régulière pendant plusieurs semaines, voire plusieurs mois (jusqu' à 6 mois en principe)

(Web 6)

Chapitre 2 :

Gène KRAS

1. Famille RAS

Tout d'abord, les gènes RAS sont parmi les premiers oncogènes découverts (**Organ S.L., 2014**), les plus fréquemment mutés dans 33 % des cancers humains (**Baines A.T., et al., 2011**).

Cette famille des proto-oncogènes comprend trois principaux gènes bien caractérisés codant pour des protéines-G (GTPase) : Harvey-Ras (H-Ras), Kirsten-Ras (K-Ras) et neuroblastoma-Ras (N-Ras), situés sur des chromosomes différents : 11p15.5, 12p12.1 et 1p13.1 respectivement (**Nshizirungu J.P., 2015 ; Westcott P. & To M., 2012**).

D'autres protéines de cette famille furent ensuite décrites telles que R-RAS, TC21 (R-RAS2), M-RAS (R-RAS3), Rap1A, Rap1B, Rap2A, Rap2B, RalA et RalB (**Lamoril J. et al., 2009; Takai Y. et al., 2001**).

Ses isoformes ont été décrites avec une tissu-spécificité différente et une répartition dans les organelles variables (réticulum endoplasmique, appareil de golgi ou mitochondrie) (**Lamoril J. et al., 2009**).

1.1. Structure

Les protéines RAS ont une longueur de 188/189 acides aminés ; ces derniers sont constitués de trois régions :

- ✚ La première région englobe les acides aminés N-terminal 86, qui sont 100% identiques pour les différentes protéines de Ras.
- ✚ Les 80 acides aminés suivants définissent une deuxième région où les protéines de Ras des mammifères ne divergent que légèrement, présentant une homologie de 85% entre une paire de protéines (**Clarke S., 1992 ; Bar-Sagi D., 2001**). Ces 165 premiers acides aminés comprennent le domaine conservé qui est responsable de la liaison et de l'hydrolyse du GTP et des interactions avec les protéines GAP et GEF (**Westcott P. & To M., 2012**).
- ✚ Le domaine terminal restant appelée la région hypervariable, commence à l'acide aminé 165 et ne montre aucune séquence similitude entre les protéines de Ras sauf pour un motif conservé CAAX (C : cystéine ; A : acide aminé aliphatique; X : méthionine ou serine) à l'extrémité C-terminale (**Clarke S., 1992 ; Bar-Sagi D., 2001**), cette partie contient des séquences importantes pour la modification post translationnelle (**Westcott P. & To M., 2012**) (**Figure 5**).

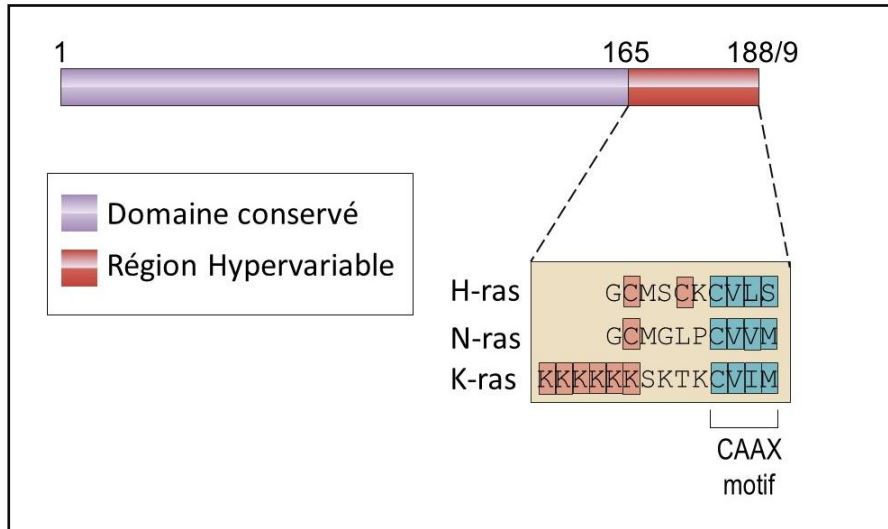


Figure 5 : Structure des domaines des différentes protéines de Ras (Hancock J.F., 2003)

2. Gène KRAS

Le gène KRAS situé sur le bras court du chromosome 12 (12p11.22) est un oncogène orthologue du gène transformant isolé à partir du Kirsten Rat Sarcoma virus (Nshizirungu J.P, 2015). Il est constitué de six exons (Rásó E., 2020 ;Garcia-Robledo A. et al., 2022) et codée pour une protéine avec un poids moléculaire de 21,6 kDa (Ruuth-Praz J., 2019).

Le gène KRAS possède deux quatrièmes exons différents qui peuvent diriger la synthèse de deux ARNm différents par épissage alternatif (Bos J.L.,1988), donc la protéine KRAS existe sous 2 isoformes : KRAS4A et KRAS4B, qui contiennent respectivement 188 et 189 acides aminés (Figure 6).

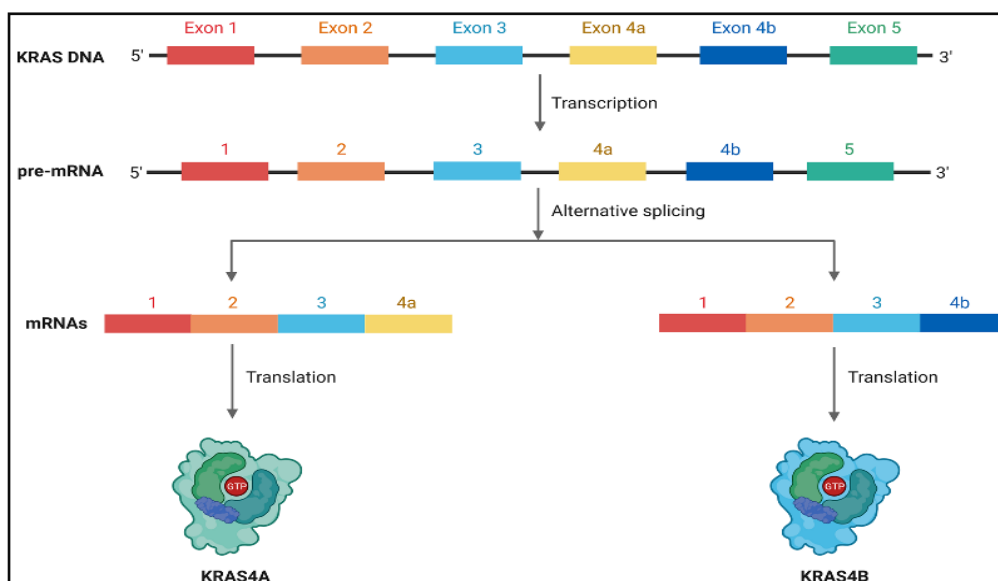


Figure 6 : Isoformes du gène KRAS (KRAS4A et KRAS4B) (Garcia-Robledo A. et al., 2022)

KRAS4B est largement exprimé et constitue la forme dominante dans les cellules humaines et contrairement à KRAS-4A est essentiel pour l'embryogénèse (**Chetty R. & Govender D., 2013**).

Les protéines KRAS sont situées à l'intérieur de la membrane plasmique où elles sont ancrées dans la bicouche lipidique par un acide palmitique attaché de façon covalente à l'extrémité carboxyle (**Buss J.E. & Sefton B.M., 1986 ; Bos J.L., 1988**).

Le rôle important du KRAS est la transmission des signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau grâce à son activité de GTPase (**Lièvre A., 2010 ; Nshizirungu J.P., 2015**).

2.1. Structure

La structure de KRAS révèle 6 brins bêta et 5 hélices alpha qui forment deux domaines majeurs : un domaine catalytique appelé le domaine G et une région hypervariable (HVR) (**Huang L. et al., 2021**). Le domaine G se compose de trois régions : switch I (acides aminés 30 à 38), switch II (acides aminés 59 à 67) et la boucle P qui lie les nucléotides de guanine et active la signalisation en interagissant avec les effecteurs. Le HVR consiste en un domaine de ciblage membranaire (**Figure 7**).

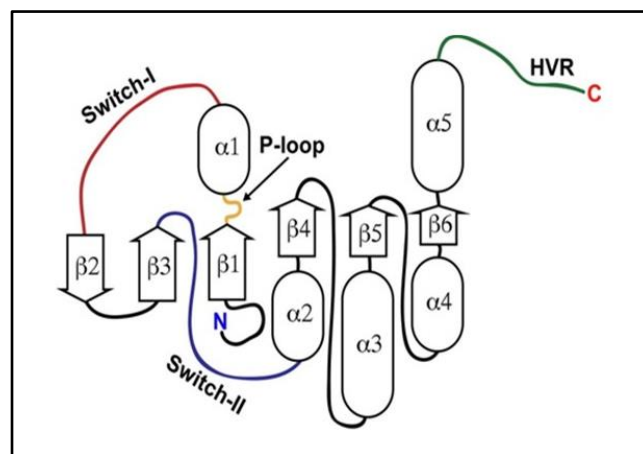


Figure 7 : Structure de KRAS4B (**Pantsar, 2020**)

Elle se présente sous 2 formes : soit inactive par liaison à une guanosine diphosphate (GDP), soit active par liaison à une guanosine triphosphate (GTP). Elle possède une activité GTPase intrinsèque qui lui permet de passer de la forme active à la forme inactive, peu après la liaison du GTP (**Ruuth-Praz J., 2019 ; Huang L. et al., 2021**).

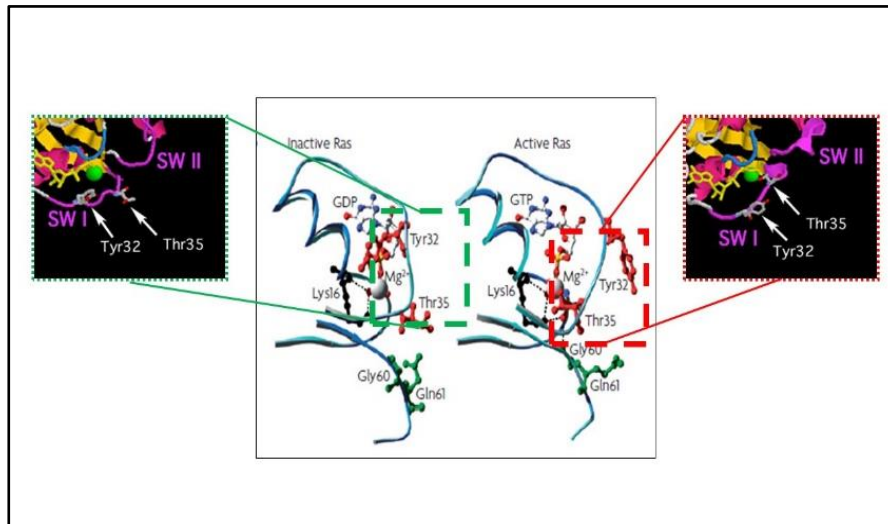


Figure 8 : Modifications et réarrangements structurels des molécules RAS lors de la liaison des nucléotides (**Karnoub A.E. & Weinberg R.A., 2008**)

Les différences structurelles entre les conformations RasGDP et RasGTP résident principalement dans deux régions hautement dynamiques, switch I et switch II ou la liaison du GTP modifie la conformation de switch I, principalement par la réorientation vers l'intérieur de la chaîne latérale de la Thr35, permettant ainsi ses interactions avec le γ phosphate du GTP ainsi qu'avec l'ion Mg^{2+} (**Figure 8**). De même, le γ -phosphate induit des changements significatifs dans l'orientation de la région de switch II grâce aux interactions qu'il établit avec Gly60 (**Karnoub A.E. & Weinberg R.A., 2008**).

2.2. Voies de signalisation

La protéine KRAS sert comme un interrupteur moléculaire binaire impliquée dans les voies de signalisation intracellulaire, finement régulé qui contrôle plusieurs cascades en cyclant entre les conformations activées et inactivées pour assurer à la fin une variété de fonctions cellulaires, y compris la prolifération, l'apoptose, la survie, la différenciation, l'intégrité du cytosquelette, l'adhésion et la migration cellulaire.

Tout d'abord, Cette protéine peut être activée par les facteurs de croissance, les chimiokines, le Ca^{2+} ou la tyrosine kinase (TK) en se liant sur des récepteurs, tels que les récepteurs de tyrosines kinases (RTK) et les récepteurs couplés à la protéine G (RCPG) (**Huang L. et al., 2021 ; Ibrahim A.E.K. & Arends M.J., 2012**).

Une fois sous forme active, KRAS subit un changement conformationnel du domaine G qui forme une boucle effectrice. Celle-ci va permettre par liaison directe l'activation de deux voies de signalisation principales : la voie des **RAF/MAPKinases** et la voie de **PI3K/AKT**, qui vont conduire notamment à des signaux de prolifération et de survie cellulaire. L'activité de KRAS est auto-régulée par son activité GTPase

intrinsèque. En effet, la liaison de GTP à KRAS va activer des protéines activatrices de GTPase (GAP), qui vont majorer l'activité GTPase intrinsèque de KRAS. Cela permet la transformation rapide de GTP en GDP, l'inactivation de KRAS, et donc l'arrêt de signaux de transduction stimulant la prolifération et la survie cellulaire (Guibert N. *et al.*, 2016 ; Ruuth-Praz J., 2019) (Figure 9).

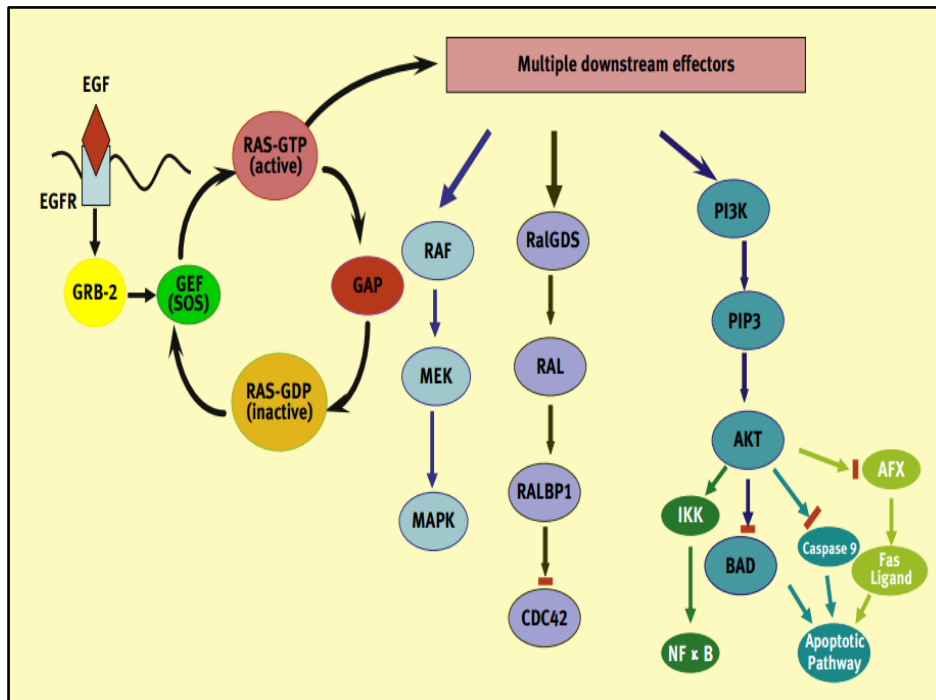


Figure 9 : Voies de signalisation de la protéine RAS (Ibrahim A.E.K. & Arends M.J., 2012).

2.3. KRAS et oncogénèse

Il est bien établi que les altérations spécifiques chez les membres de la famille des gènes Ras peuvent les convertir en oncogènes actifs. Ces altérations sont soit des mutations ponctuelles se produisant dans les codons 12, 13 ou 61 ou bien une amplification de 5 à 50 fois du gène de type sauvage (Bos J.L., 1988).

L'analyse du séquençage génomique de spécimens de cancers humains a identifié le gène KRAS comme étant le gène le plus fréquemment muté avec 86 % suivi par le NRAS 8,0 % et finalement l'isoforme HRAS qui est le moins muté dans les cancers humains avec 3.3% (Therachiyil L. *et al.*, 2022).

L'incidence des mutations KRAS dans divers cancers comprend 57 % dans le cancer du pancréas, 35 % dans le gros intestin, 28 % dans les voies biliaires, 17 % dans l'intestin grêle, 16 % dans le cancer du poumon, 15 % dans l'endomètre et 14 % dans le cancer de l'ovaire) (Murugan A.K., *et al.*, 2019 ; Therachiyil L., *et al.*, 2022) (Figure 10).

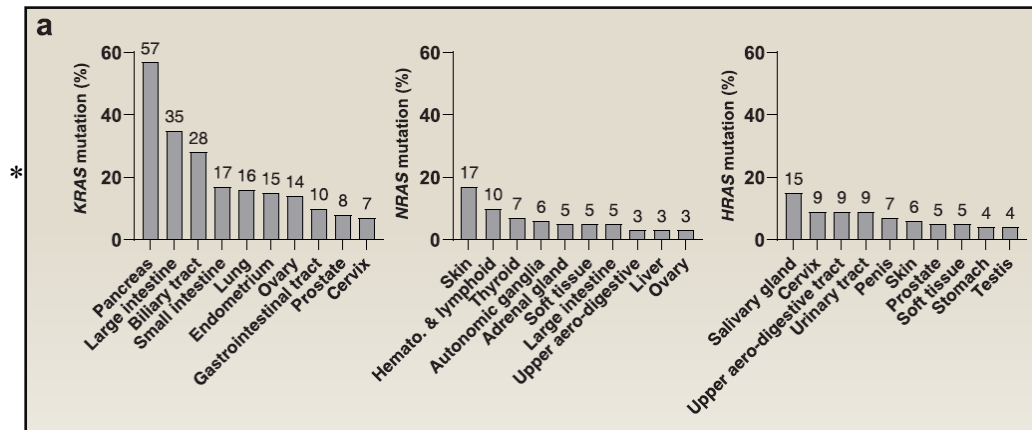


Figure 10 : Mutations somatiques de l'oncogène RAS dans les 10 principaux cancers humains (Tang D. *et al.*, 2021)

Il semble qu'une mutation de KRAS soit l'évènement initiateur de la carcinogenèse, étape indispensable à la formation d'une tumeur (Bos J.L., 1988 ; Huguet F. *et al.*, 2011). La majorité des mutations qui touchent le gène KRAS sont des mutations activatrices qui conduisent à une activation constitutive de la voie EGFR (indépendante de la fixation du ligand à son récepteur) lui conférant ainsi le pouvoir transformant (Herrmann C., 2003 ; Nshizirungu J.P., 2015).

Environ 90 % de ces mutations activatrices se trouvent dans les codons 12(GGT) et 13(GGC) de l'exon 1 et un peu moins de 5 % dans le codon 61(CAA) situé dans l'exon 2 (Palmirotta R. *et al.*, 2011).

Outre ces mutations activatrices, il existe des mécanismes indirects d'activation du gène KRAS, notamment une hyperactivation d'un récepteur situé en amont de cet oncogène (par exemple les récepteurs au facteur de croissance) ou encore une mutation inactivatrice d'un de ses régulateurs négatifs. La capacité de transformation par les protéines Ras dépend de ses interactions avec ses effecteurs en aval (Nshizirungu J.P., 2015).

2.4. Types des mutations

La mutation la plus fréquente est G12C, qui représente 49% des mutations KRAS. Les mutations G12V, G12D, G12A et G12S représentent respectivement 27%, 10%, 8% et 5% des tumeurs mutées du gène KRAS. Ces polymorphismes nucléotidiques sont regroupés en 2 catégories pour les mutations des codons 12 et 13 :

- Les transitions qui consistent en un remplacement d'une purine par une autre purine ou d'une pyrimidine par une autre pyrimidine sont : G12D, G12S et G13D.

✚ Les transversions qui consistent en un remplacement d'une purine par une pyrimidine et inversement sont : G12C, G12V, G12R, G12A et G13C (**Guibert N. et al., 2015 ; Ruuth-Praz J., 2019**).

2.5. Physiopathologie

Les mutations des gènes RAS au niveau de certains « hot-spots » engendrent une activation constitutive des protéines RAS mutantes à un seul acide aminé indépendamment des signaux de l'EGFR (**Baines A.T. et al., 2011**), elles affectent le domaine de liaison du GTP modifiant la structure de la protéine, ce qui perturbe l'interaction entre RAS et GAP, entraînent un blocage de l'activité hydrolytique du GTP et donc l'accumulation de la protéine sous sa forme active **liée au GTP** (**Bischof K. et al., 2019 ; Therachiyil L. et al., 2022**) (**Figure 11**).

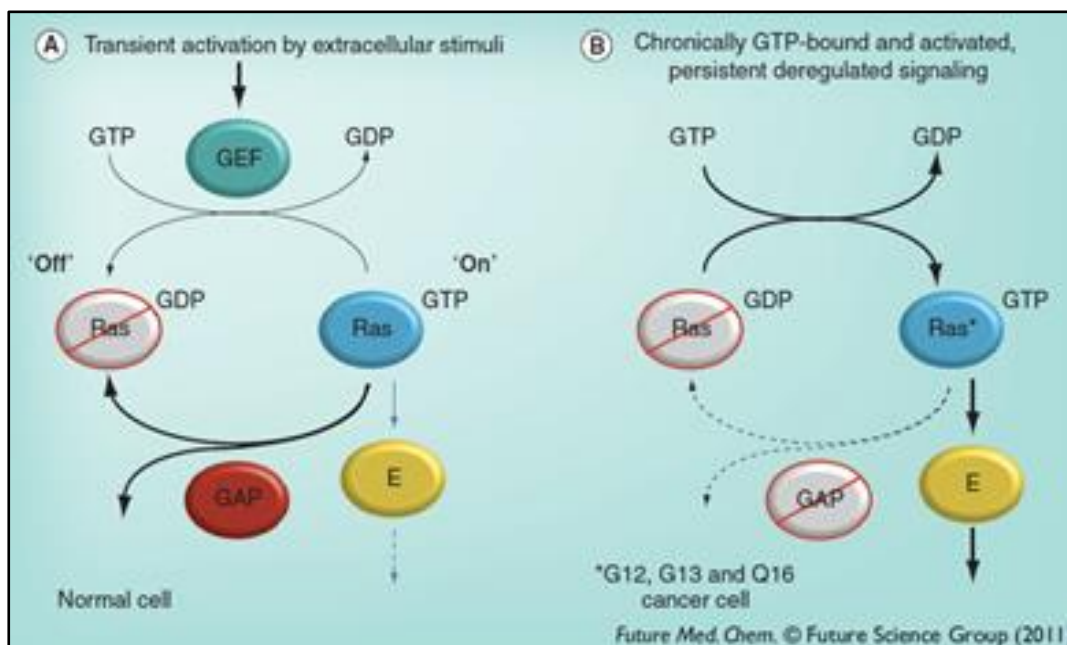


Figure 11 : Régulation du cycle Ras GDP–GTP dans les cellules normales et néoplasiques (**Baines A.T. et al., 2011**).

2.6. Mutation KRAS et cancer d’ovaire

Dans le cancer d’ovaire épithélial, le plus répandu chez les femmes, il existe quatre mutations génétiques : TP53, BRCA1/2, PIK3CA et KRAS. La fréquence de ces mutations varie selon leurs sous-types (**Tableau 2**).

Tableau 2 : Fréquence des quatre mutations génétiques parmi le cancer épithélial de l'ovaire (**Guo T. et al., 2021**).

Sous-types	Fréquence des altérations génétiques			
	TP53	BRCA1 /2	PIK3CA	KRAS
HGSOC	96%	22~40%	2.9%	5.9%
LGSOC	8.3%	10%	12.5%	54%
EnOC	5-54.5%	11.1%	31.4%	10.3%
OCCC	10%	4.5%	51%	15%
mucineux	56.8%	0%	13.5%	57.1~64.9%

HGSOC: high-grade serous ovarian carcinoma; LGSOC: low-grade serous ovarian carcinoma; EnOC: endometrioid ovarian carcinoma; OCCC: ovarian clear cell carcinoma.

L'analyse du séquençage a montré que la mutation du gène KRAS était la plus fréquente dans les tumeurs séreuses limites, les LGSOC et les carcinomes mucineux. Le taux des mutation du gène KRAS était respectivement de 33~41%, 35~54% et 57,1%, ce qui contraste avec leur expression faible ou absente dans les HGSOC (**Sakai K. et al., 2017** ; **Guo T. et al., 2021**).

La variante héréditaire située dans le 3'UTR du gène KRAS (rs61764370 T > G) est associée à un risque accru de cancer d'ovaire (**Guo T. et al., 2021** ; **Therachiyil L. et al., 2022**).

Les mécanismes potentiels entre les mutations de KRAS et le cancer de l'ovaire sont décrits comme : perte de fonction des gènes régulant la suppression des tumeurs, anomalies des gènes de réparation de l'ADN, gain de fonction des oncogènes, (**Guo et al., 2021**; **Testa et al., 2018**) et modifications épigénétiques (**Kwon M.J. & Shin Y.K., 2011**).

2.6.1. Perte de fonction des gènes régulant la suppression des tumeurs

Les gènes BRCA 1 et BRCA 2 sont des gènes suppresseurs de tumeurs; en effet s'ils sont inactivés par une mutation ponctuelle, une délétion ou une perte d'expression, il n'y a plus de restriction sur la croissance des tissus causant le cancer de l'ovaire et du sein (**Casaubon J.T. et al., 2023**). En outre, le gène TP53 codant pour une protéine du même nom dont la mutation génétique unique peut causer le cancer de l'ovaire. Par conséquent, il joue un rôle essentiel dans la prévention et l'inhibition du développement et de la progression de cette maladie (**Zhang Y. et al., 2016**).

2.6.2. Anomalies des gènes de réparation de l'ADN

Il existe la voie de réparation MMR (mismatch repair) qui est associée à un risque accru de développer plusieurs types de cancer et est la cause la plus fréquente de cancer ovarien héréditaire après BRCA1 et BRCA2 (Xiao X. *et al.*, 2014).

2.6.3. Gain de fonction des oncogènes

Les altérations génétiques conduisent à l'inactivation de gènes défavorables à la prolifération (gènes suppresseurs de tumeur) et à l'activation de gènes favorables à la prolifération (oncogènes) (Zhang Y. *et al.*, 2016), comme le gène KRAS dont une mutation ponctuelle dans cet oncogène confère un gain de prolifération non contrôlée pour la cellule cancéreuse (Bournet B. *et al.*, 2013).

2.6.4. Modifications épigénétiques

Les processus épigénétiques ne modifient pas les séquences d'ADN mais régulent l'expression des gènes par la méthylation de l'ADN, la modification des histones et l'ARN non codant (Xie W. *et al.*, 2021). Les mécanismes épigénétiques peuvent favoriser la progression du cancer par activation ou surexpression des oncogènes ou des gènes cancérogènes dans le cancer de l'ovaire ainsi que par l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs (Kwon MJ. & Shin YK., 2011).

2.7. Techniques de détection des mutations KRAS

La détection des mutations dans l'ADN représente une étape essentielle de la biologie moléculaire (Boukerroum A. *et al.*, 2012), afin de valider l'hypothèse que l'altération d'un gène est responsable d'une pathologie, il est souvent préférable d'utiliser des méthodes rapides, mais non exhaustives, qui ne garantissent pas la détection de toutes les mutations (Feingold J. *et al.*, 2017).

De manière générale, l'étude des mutations se fait après extraction de l'ADN sur tissu conservé en paraffine et après amplification par polymérase Chain réaction (PCR) (Lamoril J. *et al.*, 2009).

La méthode la plus largement accessible pour tester le KRAS est le séquençage direct des produits PCR du KRAS, qui a longtemps été l'étalon-or pour la détection des mutations. Cette méthode permet de détecter toutes les mutations dans les séquences d'ADN amplifiées, mais exige que les copies mutantes aient une concentration d'au moins 20 à 50 % par rapport aux séquences de type sauvage qui les accompagnent avec une faible sensibilité (Jimeno A. *et al.*, 2009).

Pour optimiser la sensibilité et la spécificité de la détection des mutations, des techniques alternatives ont été développées.

Parmi ces techniques La méthode RFLP qu'elle est basée sur les différences entre l'ADN mutant et l'ADN sauvage du KRAS en termes de sensibilité à la digestion par les enzymes de restriction, qui n'insèrent une coupure dans l'ADN que s'il existe une séquence définie.

La méthode HRM qui mesure les différences de température de point de fusion entre l'ADN double brin et l'ADN non apparié, causées par des polymorphismes ou des mutations somatiques. En comparant les températures de fusion à une échelle de référence connue, et en se basant sur le principe que l'affinité de deux chaînes d'ADN est perturbée par la présence d'une mutation (**Jimeno A., et al., 2009**).

La PCR en temps réel (Taqman) est un outil puissant pour des analyses de mutations comme les SNPs et les études de génotypage elle est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (**Postras E., & Houde A., 2003**).

L'ARMS est une méthode simple de détection de toute mutation impliquant des changements de bases simples ou de petites délétions. elle repose sur l'utilisation d'amorces PCR spécifiques d'une séquence qui ne permettent l'amplification de l'ADN testé que lorsque l'allèle cible est présent dans l'échantillon (**Yang L. et al., 2017**).

Aucune de ces techniques n'est parfaite Certaines d'entre elles nécessitent aussi une confirmation du résultat par séquençage (**Lamoril J. et al., 2009**).

**ETUDE
EXPERIMENTALE**

Matériel et Méthodes

1. Populations d'étude

Il s'agit d'une étude cas-témoins qui vise à étudier le polymorphisme du gène KRAS au niveau de l'exon 2 et son implication dans la survenue du cancer de l'ovaire.

▪ Patientes

Cette étude a été réalisée sur 25 patientes diagnostiquées pour un cancer d'ovaire de différents types au niveau du centre anti-cancer (CAC) du centre hospitalo-universitaire de Constantine (CHUC) Benbadis. Les cas présentant un cancer secondaire ont été exclus.

▪ Témoins

La population témoin est au nombre de 25 sujets sains.

La collecte des échantillons a été réalisée au niveau du Centre de Recherche en Biotechnologies (CRBt) Constantine.

Des informations ont été recueillies sur les deux populations d'étude suivant le **questionnaire 1 et 2 (Annexe 1)**.

N.B. : la collecte des échantillons a été réalisée dans une étude précédente, le travail présent mettra l'accent sur la mise au point de la technique de génotypage au niveau du laboratoire de biologie moléculaire du CRBt.

2. Méthodes

2.1. Préparation des échantillons

2.1.1. Extraction de l'ADN génomique

L'ADN génomique a été extrait à partir du sang total humain frais prélevé dans des tubes EDTA (éthylène-diamine-tétra-acétique) selon la méthode de **Wajhul et al.,2017** en suivant les étapes suivantes :

✚ Lyse et élimination des globules rouges (RBC)

Dans un tube à centrifuger de 15 ml, 2 ml du sang ont été prélevés et 8 ml de la solution de lyse de RBC (Red blood cells) ont été ajoutés. Cette solution fournit une lyse rapide et optimale des globules rouges (GR) avec des effets minimes sur les leucocytes des échantillons de sang humain.

Les tubes ont été placés dans un vortex pendant 5 min. Tous les tubes ont été centrifugés pendant 10 min à 3000 g. Le surnageant a été jeté et le culot de globules blancs a été remis en suspension dans 500 µl de solution saline tamponnée au phosphate (PBS). Cette étape de lyse et d'élimination des GR a été répétée trois fois et à la fin, un culot blanc propre et sans GR a été obtenu et remis en suspension dans 500 µl de PBS.

✚ Lyse des globules blancs

Dans la suspension de globules blancs, 1,5 ml de tampon de lyse (pH 8,0) ont été ajoutés avec 500 µl de dodécylsulfate de sodium (SDS,10%) et 50 µl de la protéinase K fraîchement préparée (10mg/ml de PBS). Ce mélange a été incubé à 50°C dans un bain-marie pendant deux heures. Cette incubation est une période minimale pour obtenir une solution cellulaire lysée claire, si le culot cellulaire est visible après deux heures d'incubation, le temps peut être prolongé jusqu'à l'obtention d'une solution claire.

✚ Précipitation et collecte d'ADN

Après incubation, les échantillons sont retirés du bain-marie et refroidis à température ambiante. 500 µl d'acétate d'ammonium 7,5 M ont été ajoutés dans chaque échantillon et doucement vortexé jusqu'à ce que la solution soit homogène. 3 Volume d'éthanol absolu réfrigéré ont été ajoutés et les tubes d'échantillons ont été inversés jusqu'à ce qu'une méduse d'ADN condensé soit visible. Cette méduse d'ADN est collectée à l'aide d'une pointe de pipette fixée à une micropipette de 100 µl.

La méduse d'ADN a été transférée dans un tube Eppendorf de 1,5 ml et lavée avec 500 µl d'éthanol à 70 %. Ce dernier a été soigneusement éliminé à l'aide d'une micropipette et la méduse d'ADN a été laissée dans le tube et séchée à l'air à température ambiante. Une fois la méduse séchée, 100 à 200 µl de tampon tris-EDTA (TE) à (pH 8,0) ont été ajoutés et les tubes ont été incubés à 37 °C pour permettre au culot d'ADN de former une solution claire et homogène. Tous les échantillons ont été conservés à -20 °C (les solutions d'extraction de l'ADN ont été préparées selon l'Annexe 2)

2.1.2. Détermination de la concentration et la pureté de l'ADN extrait

Le contrôle de la pureté de l'ADN est réalisé par le nanodrop (NanoDrop™ 8000). Elle a été évaluée par mesure du rapport DO260 nm / DO280 nm puisque le maximum d'absorbance des acides nucléiques (l'ADN et l'ARN) se situe à 260 nm, par contre celui des protéines se situe à 280 nm. Le rapport doit être compris entre 1,8 et 2 ; s'il est inférieur à 1,8, l'ADN est contaminé par les protéines et s'il est supérieur à 2, l'ADN est contaminé par les ARNs.

2.2. Détection de la mutation par PCR-RFLP

2.2.1. Amplification des fragments d'intérêt par PCR

✚ Principe :

La PCR (polymerase chain reaction) est fondée sur une réaction enzymatique *in vitro* permettant d'amplifier plusieurs millions de fois des séquences d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire. Elle nécessite de connaître les séquences des extrémités de la région à amplifier, et de les utiliser pour élaborer des amorces nucléotidiques. La région d'ADN cible est copiée par incorporation de désoxyribonucléotides libres grâce à une enzyme ADN polymérase thermostable (**Figure 12**). Des variations cycliques de températures vont permettre successivement la dénaturation de l'ADN, l'hybridation des amorces et leur extension par l'ADN polymérase (**Uhel F. *et al.*, 2019**).

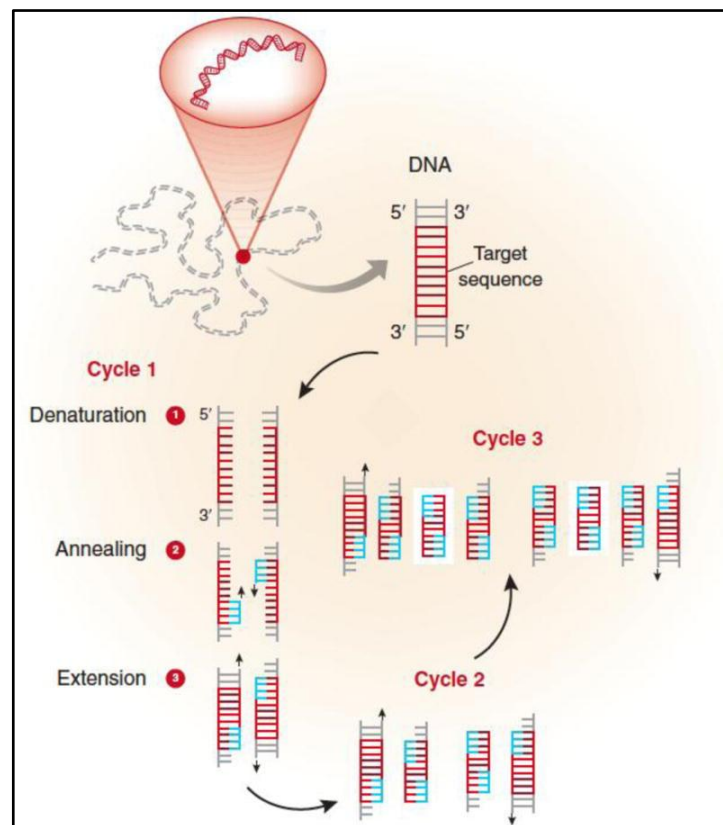


Figure 12 : Présentation schématique du principe de la PCR (**Garibyan L. & Avashia N., 2013**).

✚ Procédure :

La réaction de polymérisation est réalisée dans un volume final de 25µl contenant 50ng de l'ADN génomique, 0.2µM de chaque amorce, 200µM des dNTP, 1U de la Taq polymérase, 1.5µM du MgCl₂ et 1X du tampon.

Une séquence de 171 pb de l'exon 2 du gène KRAS (OMIM 190070) a été amplifiée en utilisant une paire d'amorces spécifiques :

Amorce sens : 5' **GAAAATGACTGAATATAAA** 3'

Amorce anti-sens : 5' **GACCATTCTTTGATACAGAT** 3'

Le programme d'amplification au thermocycleur (MiniAmp thermal cycler) est réalisé ainsi :

- Une dénaturation initiale pendant 10 minutes à 94°C, suivi de 30 cycles avec :
 - Une dénaturation à 94°C pendant 1 minute.
 - Une température d'hybridation à 60°C pendant 1 minute.
 - L'élongation à 72°C pendant 90 secondes.
- Une élongation finale de 10 minutes à 72°C.

2.2.2. Visualisation des produits de PCR

✚ Principe :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode la plus efficace pour isoler les fragments d'ADN de taille allant de 100 bp à 25 kb. Un champ électrique est utilisé pour conduire des molécules chargées à travers une matrice d'agarose où elles seront séparées par taille (**Tantray J.A. et al., 2023**). Les petits fragments migrent plus vite que les plus gros. La taille des fragments est déterminée par l'utilisation d'un marqueur de taille connu et en comparant la distance de migration du fragment inconnu (**Davis L.G. et al., 1986**).

✚ Procédure

Un gel d'agarose à 2 % a été préparé (**Annexe 3**), après polymérisation du gel ; 3µl du marqueur de taille (PM 100 bp) ont été déposés au premier puits et 5µl du produit de PCR ajoutés à 1µl du tampon de charge ont été mis dans les autres puits.

Après la migration qui prend 20 minutes à 120 V, le gel est soumis à un système de visualisation. Les fragments amplifiés peuvent être observés sous forme de bandes fluorescentes de même taille qui devraient atteindre 171 bp.

2.3.3. Détection de la mutation par digestion enzymatique

✚ Principe

Cette technique est un outil couramment utilisé pour vérifier les variations petites mais spécifiques dans une séquence d'ADN double brin. Il est basé sur la spécificité des endonucléases de restriction, qui reconnaissent un ensemble de nucléotides appelés site de restriction et clivent l'ADN à ces sites. Un modèle spécifique de RFLP émerge sur la

séparation électrophorétique de l'ADN digéré, produisant des longueurs variables de fragments de clivage qui sont caractéristiques d'une séquence d'ADN (Mittal B. *et al.*, 2013).

Procédure

La digestion est effectuée en ajoutant 1µl de l'enzyme de restriction **BstNI (10U/µl)** qui reconnaît et clive la séquence 5'- CCWGG-3' (W signifie A ou T) à 5µl d'amplicon, 3µl du tampon et 1µl d'eau à grade biologie moléculaire. Ce mélange a été incubé pendant 3 heures à une température de 60°C.

2.3.4. Révélation des produits de digestion

Les produits de digestion ont été analysés sur un gel d'agarose à 3 %. Le polymorphisme G12D, correspond à une transition d'une Guanosine par une Adénosine en position 35 dans la séquence nucléotidique du transcrit (c.35 G>A). Trois types de profils de restriction peuvent être révélés par le système de visualisation selon le génotype ; l'homozygote muté AA apparaît sur le profil électrophorétique sous forme d'une bande de 171pb, l'hétérozygote GA apparaît sous forme de deux bandes de 171 pb et 125 pb, et enfin l'homozygote sauvage GG apparaît sous forme d'une seule bande de 125 pb.

2.3. Etude statistique

Les résultats ont été saisis sur le logiciel Microsoft Excel puis transférés vers le logiciel IBM SPSS V.22. Les données ont été exprimées en pourcentages et fréquences pour les variables qualitatives et en moyenne \pm écart type pour les variables quantitatives. La comparaison entre des proportions, a été évaluée au moyen du test De Fisher, et les tests de corrélation ont été réalisés par le test de l'Anova à un facteur.

Le seuil critique à priori est de 0.05. Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

Résultats et Discussion

Afin de rechercher une éventuelle corrélation entre les polymorphismes de la mutation G12D du gène KRAS et le risque d'apparition ou de développement d'un cancer de l'ovaire. La présente étude a utilisé une technique de biologie moléculaire (PCR-RFLP) sur l'ADN génomique de vingt-cinq patientes atteintes d'un carcinome ovarien.

1. Etude descriptive de la population

1.1. Moyenne d'âge

Le **tableau 3** présente l'âge moyen des deux populations étudiées.

Tableau 3 : Age moyen des deux populations d'étude

	Patientes (n=25)	Témoins (n=25)
Moyenne	52,3	42
Écart type	10,61	11,25

L'âge moyen est de $52,3 \pm 10,61$ ans chez les patientes avec des extrêmes de 25 – 73 ans et de $42 \pm 11,25$ ans chez les témoins, avec des extrêmes de 16 – 85 ans (**Tableau 3**).

1.2. Répartition par tranches d'âge

Le **tableau 4** suivant présente la répartition des patientes et témoins selon différentes classes d'âge.

Tableau 4 : Répartition des cas et témoins par tranches d'âge

Différentes classes d'âge	Patientes (n=25)		Témoins (n=25)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
23 – 45	5	20%	15	60%
46 – 65	18	72%	9	36%
≥ 66	2	8%	1	4%

D'après le tableau 2, les deux populations ont été répartis sur trois classes d'âge. La distribution majoritaire des patientes et témoins se trouvent dans la classe d'âge [46 - 65ans] et [23 - 45ans] avec des pourcentages de 72% 60% respectivement. La tranche d'âge de plus de 66 ans représente l'effectif le plus réduit.

Mazidimoradi A. *et al.*, (2019) ont démontré que la plupart des cas d'incidence du cancer d'ovaire surviennent à la classe d'âge [50-69 ans] au cours de leur étude épidémiologique sur l'incidence, la mortalité et le fardeau du cancer de l'ovaire dans 204 pays **(Mazidimoradi A. *et al.*, 2022)**.

Des proportions proches de celle de notre étude ont été notées par plusieurs autres travaux notamment Jung E.J. *et al.*, (2017) ; Trifanescu O., (2018) et Cherbal F., *et al* (2018) ayant montré que les patientes ménopausées représentent respectivement 66,1%, 61,2% et 60,25% de la population d'étude **(Cherbal F. *et al.*, 2018; Jung E.J. *et al.*, 2017; Trifanescu O., 2018)**.

De même Yolaine *et al.*, (2020) ont conclu que l'incidence du cancer de l'ovaire augmente avec le vieillissement de la population lors d'une étude rétrospective évaluant la prise en charge des patientes jeunes, âgées et très âgées et son impact sur la survie des femmes françaises atteintes d'un cancer de l'ovaire **(Joueidi Y. *et al.*, 2020)**.

Cependant, des études contradictoires ont observé une diminution de l'incidence du cancer de l'ovaire chez les femmes plus de 50 ans originaires du Brésil, la Slovénie, les Etats-Unis et la Suisse **(Huang J. *et al.*, 2022)**.

Il a été montré dans la littérature que 65 % des patientes diagnostiquées d'un cancer de l'ovaire étaient ménopausées, ce qui mène à considérer la ménopause comme un facteur de risque du cancer de l'ovaire **(Rampersad A.C. *et al.*, 2015)**. D'après Jung E.J. *et al.*, (2017), il existe deux théories proposées pour décrire l'association entre le risque du cancer de l'ovaire épithélial et la ménopause. L'hypothèse d'une ovulation incessante et la théorie de la stimulation gonadotrope : pendant la période de reproduction, l'épithélium de la surface ovarienne est principalement impliqué dans le processus physiologique de l'ovulation, les lésions répétitives pendant l'ovulation et la prolifération cellulaire dans la réparation post ovulatoire de l'épithélium ovarien ont été proposés pour conduire à des mutations qui s'accumulent dans les cellules épithéliales causant ainsi des tumeurs.

La deuxième hypothèse est fondée sur le fait que l'épuisement des follicules ovariens après la ménopause provoque des niveaux élevés de gonadotrophines sériques qui stimulent une réponse inflammatoire dans l'ovaire, ceci peut conduire à la transformation des cellules épithéliales de surface et le développement de tumeur **(Jung E.J. *et al.*, 2017)**.

1.3. Répartition selon le type histologique

Le **tableau 5** présente la répartition des patientes selon le type histologique du cancer.

Tableau 5 : Répartition des cas selon le type histologique

Types histologiques	Patientes (n=25)	
	Effectifs	(%)
Séreux	12	48%
Mucineux	7	28%
Endométrioïde	5	20%
À cellule claire	1	4%

La majorité des patientes recrutées sont atteintes d'un cancer d'ovaire de type épithélial qui se divise en quatre sous-types histologiques, le sous-type séreux représente le type histologique le plus diagnostiqué avec 48% (12 cas) suivi par le sous-type mucineux, endométrioïde et à cellule claire avec des pourcentages de 28% (7 cas), 20% (5 cas) et 4% (1 cas) respectivement.

Ce classement des types histologiques de cancer se rapproche au résultat de Momenimovahed Z. *et al.*, (2019) ayant effectué une étude de méta-analyse sur les publications allant de l'année 1925 à 2018 dans le but d'examiner l'épidémiologie et les facteurs de risque du cancer d'ovaire dans le monde. Les auteurs ont prouvé que le cancer de type séreux était majoritaire avec une proportion de 70 %, suivi par les autres types histologiques : mucineux (5 %), endométrioïde (10 %), carcinome à cellule claire 10% et les autres (5%) (**Momenimovahed Z. et al., 2019**).

L'application du test de corrélation a donné une valeur de $P=0,67$, cette dernière n'est pas statistiquement significative, ce qui prouve qu'il n'existe pas de corrélation entre l'âge et le type histologique du cancer d'ovaire de la population d'étude. La même chose a été constatée dans une étude rétrospective effectuée par Begum S. *et al.*, (2020) qui ont notés une valeur de $P= 0,053$, statistiquement non significative (**Begum S. et al., 2020**).

1.4. Répartition selon l'état de mariage

Le **tableau 6** présente la répartition des patientes et témoins par tranches selon leurs états de mariage et durées de mariage.

Tableau 6 : Répartition des cas et témoins par l'état et la durée de mariage

Etat de mariage	Patientes (n=25)		Témoins (n=25)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Marié	23	92%	23	92%
Non marié	2	8%	2	8%
Durée de mariage	1-58 ans		2-48 ans	

Une grande prédominance des femmes mariées a été remarquée dans la population de notre étude (92%), avec une durée de mariage de 1 à 58 ans. Ce constat a été approuvé par Sait K.H. *et al.*, (2022) lors d'une étude de cohorte réalisée entre Octobre 2000 et Mai 2018 sur les femmes atteintes d'un cancer épithélial de l'ovaire dans l'ouest de l'Arabie Saoudite, la prédominance des femmes mariées est estimée à une proportion de 84,7% par rapport aux femmes non mariées (15.3%) lors de l'étude d'intérêt (**Sait K.H. et al., 2022**).

L'augmentation du pourcentage des femmes mariées souffrant d'un cancer de l'ovaire peut être attribuée à la diminution de la parité. Selon Torre L.A. *et al.*, (2018) le risque de cancer épithélial est réduit d'environ 20% lors du premier accouchement et d'environ 10% à chaque naissance supplémentaire (**Torre L.A. et al., 2018**). De même Walker J.L. *et al.*, (2015) ont montré que l'infertilité augmente également le risque de cancer de l'ovaire au cours d'une étude de recherche clinique de la société d'oncologie gynécologique pour la prévention du carcinome ovarien (**Walker J.L. et al., 2015**).

L'application d'un autre test de corrélation a donné une valeur de $P=0,45$, cette valeur n'est pas statistiquement significative, ce qui démontre qu'il n'existe pas de corrélation entre la durée du mariage et l'apparition de la tumeur.

2. Analyse de produits de PCR obtenus

Les résultats des produits d'amplification de la région d'intérêt ont été soumis à une migration électrophorétique suivie d'une révélation, puis une visualisation.

Le profil électrophorétique présenté à la **figure 13** présente des bandes correspondant à la taille attendue des amplicons de 171pb. La taille des amplicons est confirmée par un marqueur de poids moléculaire (M).

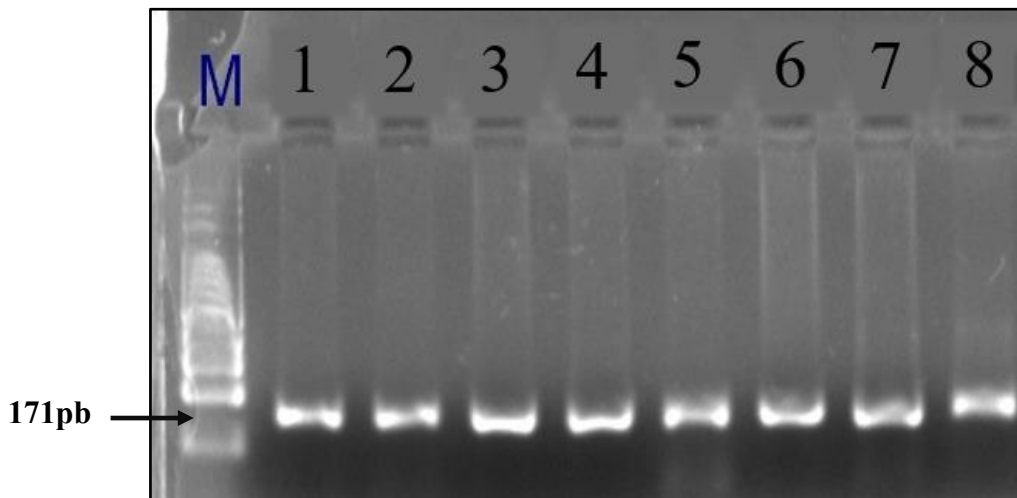


Figure 13 : Profil électrophorétique de produits de PCR obtenus

3. Digestion des produits de PCR par l'endonucléase de restriction BstNI

Les produits de PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l'endonucléase de restriction BstNI. Les produits de la digestion enzymatique sont visualisés par bromure d'éthidium sous UV après migration sur un gel agarose de 3%. La taille des fragments obtenus selon le polymorphisme sauvage GG est mentionnée sur la **figure 14**.

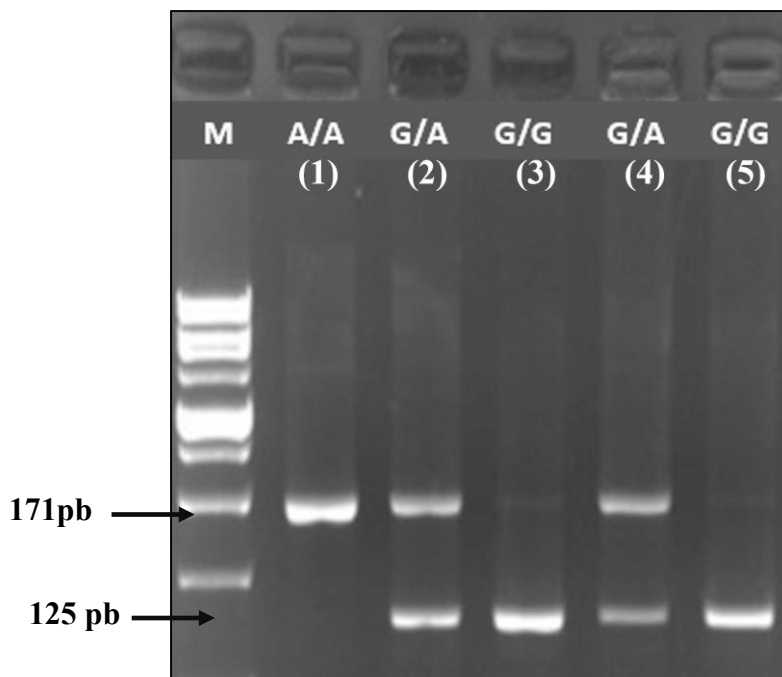


Figure 14 : Profil électrophorétique des produits de la digestion enzymatique.

On observe sur le profil électrophorétique que :

- L'échantillon n°1 correspond aux produits de digestion des fragments de taille 171 pb qui portent le polymorphisme de type homozygote muté AA.
- Les échantillons n°2 et 4 correspondent aux produits de digestion des fragments de taille 171 pb et 125 pb qui portent le polymorphisme de type hétérozygote GA.
- Les échantillons n° 3 et 5 correspondent aux produits de digestion des fragments de taille 125 pb qui portent le polymorphisme de type homozygote sauvage GG.

3.1. Analyse des fréquences génotypiques du polymorphisme du gène KRAS

L'analyse moléculaire a permis de mettre en évidence la mutation G12D du gène KRAS, le calcul des fréquences génotypiques a été réalisé et les résultats sont représentés au **tableau 7** :

Tableau 7 : Fréquences génotypiques du polymorphisme du gène KRAS

Génotypes KRAS G12D	Patientes (n=25)		Témoins (n=25)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Homozygote sauvage (GG)	21	84%	25	100%
Hétérozygote (GA)	3	12%	00	00%
Homozygote muté (AA)	1	4%	00	00%
P-value	0,113			

La comparaison des fréquences génotypiques des patientes atteintes d'un carcinome ovarien et des témoins a mis en exergue des similarités, mais aussi des variations notables. En effet, le génotype homozygote sauvage (GG) était le plus fréquent dans les deux populations d'étude avec des proportions de 84% chez les patientes et 100% chez les témoins. Les génotypes hétérozygote (GA) et homozygote muté (AA) présentent des fréquences de 12% et 4% respectivement chez les patients et une absence totale chez les témoins.

Les résultats observés montrent qu'il n'existe pas une différence significative dans la distribution génotypique du polymorphisme de la mutation du gène KRAS ($p > 0,05$).

3.2. Analyse des fréquences alléliques du polymorphisme du gène KRAS

L'analyse moléculaire et le calcul des fréquences alléliques ont été réalisés et les résultats sont résumés au **Tableau 8** :

Tableau 8 : Fréquences alléliques du polymorphisme du gène KRAS.

Allèles	Patientes (n=25)		Témoins (n=25)	
	Effectifs	(%)	Effectifs	(%)
Fréquence allélique (G)	45	90%	50	100%
Fréquence allélique (A)	5	10%	00	00%
P-value	0,021			

Nos résultats montrent une légère différence dans la répartition des fréquences alléliques pour l'allèle sauvage (G) qui est le plus fréquent par une proportion de 90% et 100% chez les patients et les témoins respectivement. L'allèle (A), est le moins fréquent, avec un pourcentage de 10% pour les patients et un pourcentage nul pour les témoins.

On remarque qu'il existe une différence statistiquement significative dans la distribution allélique du polymorphisme du gène KRAS (P=0.021).

Le calcul de l'odds ratio n'était pas possible au cours de notre étude car les génotypes mutés GA et AA sont absents chez la population témoin.

Plusieurs études ont détecté ; la présence majoritaire de la mutation G12D au cours de l'analyse des résultats. En effet ; Auner V. *et al.*, (2009) ont constaté que sur les 403 échantillons examinés 60 (15 %) contenaient des mutations au codon 12 ou 13 et que la mutation la plus fréquente était G12D qui représente 40 % dans l'ensemble (**Auner V. *et al.*, 2009**).

Aussi Rechsteiner M. *et al.*, (2013) ont noté la présence de 11 mutations au niveau de l'exon 2 ; dont la mutation G12D était la plus fréquente (**Rechsteiner M. *et al.*, 2013**). Kilowski K.A. *et al.*, (2020) ont montré des génotypes distincts du mutant KRAS dans les carcinomes ovariens épithéliaux, où le sous-type G12D occupe la fréquence la plus élevée (36,5 %) suivi par G12V (35,8 %) et G12C (8,4 %) (**Kilowski K.A. *et al.*, 2020**).

Dans une étude effectuée par Bagherlou N. *et al.*, (2020) sur une population iranienne ; visant à évaluer la prévalence des mutations du gène KRAS et du marqueur tumoral CA125 chez les patientes atteintes de carcinome ovarien, les auteurs ont montré

des fréquences génotypiques presque similaires à ceux de notre étude GG (89,55 %), GA (10,44 %) et AA (0 %) (**Bagherlou N. et al., 2020**).

3.3. Répartition des mutations selon le type histologique

Deux cas portant le génotype muté sont caractérisés par la présence d'un cancer d'ovaire de type séreux et deux autres cas présentaient le type endométrioïde. La plupart des résultats signalent la présence majoritaire de deux types histologiques du carcinome ovarien épithélial à savoir les types séreux et mucineux (**Dobrzycka B. et al., 2009; Therachiyil L. et al., 2022**).

Peu d'études ont détecté l'apparition des mutations du gène KRAS au sein du type histologique endométrioïde ; parmi lesquels Auner V. *et al.*, (2009) ayant enregistré 4 cas (10%) sur la totalité des cas diagnostiqués de ce type histologique de cancer d'ovaire. Aussi Hollis R.L. *et al.*, 2020 ont fait une analyse génomique de 112 cas atteints du type endométrioïde, les résultats ont démontré la présence d'une variété de mutations notamment : CTNNB1 (43 %), PIK3CA (43 %), ARID1A (36 %), PTEN (29 %), KRAS (26 %), TP53 (26 %) et SOX8 (19 %) (**Hollis R.L. et al., 2020**). Cette hétérogénéité moléculaire peut expliquer la faible présence des mutations du gène KRAS lors du génotypage de ce type histologique du cancer de l'ovaire.

Par ailleurs ; Pierson W.E. *et al.*, (2020) ont confirmé la présence minoritaire des mutations du gène KRAS lors d'une analyse moléculaire sur des échantillons de cas de cancer endométrioïde; et il a été proposé que la présence de la maladie gynécologique endométriose pourrait avoir un effet sur l'apparition de ce type histologique du carcinome ovarien (**Pierson W.E. et al., 2020; Yachida N. et al., 2021**).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Au cours de cette étude, nous avons analysé le polymorphisme G12D du gène KRAS pour détecter une éventuelle corrélation entre ce polymorphisme et le risque de développer un carcinome ovarien.

Pendant l'analyse des paramètres de la population, nous avons remarqué que l'incidence du cancer de l'ovaire est plus élevée chez les femmes pré-ménopausées et ménopausées. De plus, nous avons constaté que la population étudiée présente une dominance de type épithélial avec ses 4 sous-types dont le plus fréquent est le sous-type séreux.

Les résultats de l'analyse moléculaire ont montré qu'il n'existe pas une différence significative dans la distribution génotypique du polymorphisme de la mutation du gène KRAS tandis que la comparaison de la répartition des fréquences alléliques a montré une différence significative.

Nos résultats ne semblent malheureusement pas concluant sur l'implication des génotypes mutés du gène KRAS dans le risque de développement de la maladie d'où la nécessité de travaux supplémentaires visant à :

- Augmenter la taille de l'échantillon de patientes dans le but d'obtention de résultats concluants.
- Utiliser d'autres techniques de biologie moléculaire notamment le séquençage à haut débit ou NGS (next-generation sequencing) qui est une méthode révolutionnaire permettant le séquençage rapide de milliers à de millions de molécules d'ADN.
- Estimer le risque lié à d'autres mutations du gène KRAS à savoir : G12C, G12V, G13D,.....etc.

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUE

A

- Arora, T., Mullangi, S., & Lekkala, M. R.** (2023). Ovarian Cancer. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK567760/>
- Auner, V., Kriegshäuser, G., Tong, D., Horvat, R., Reinthaller, A., Mustea, A., & Zeillinger, R.** (2009). KRAS mutation analysis in ovarian samples using a high sensitivity biochip assay. *BMC Cancer*, 9(1), 111. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-111>

B

- Bagherlou, N., Farajnia, S., Zahri, S., Dastranj Tabrizi, A., & Nazari, A.** (2020). Prevalence of K-RAS mutations and CA125 tumor marker in patients with ovarian carcinoma. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 11(1). <https://doi.org/10.22088/cjim.11.1.75>
- Baines, A. T., Xu, D., & Der, C. J.** (2011). Inhibition of Ras for cancer treatment : The search continues. *Future Medicinal Chemistry*, 3(14), 1787-1808. <https://doi.org/10.4155/fmc.11.121>
- Bar-Sagi, D.** (2001). **A Ras by Any Other Name.** *Molecular and Cellular Biology*, 21(5), 1441-1443. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.5.1441-1443.2001>
- Bazot, M., Fédida, B., Dechoux-Vodovar, S., Beldjord, S., & Thomassin-Naggara, I.** (2016). Ovaires : Variations physiologiques et pathologies fonctionnelles. *Feuillets de Radiologie*, 56(2), 65-84. <https://doi.org/10.1016/j.frad.2016.03.007>
- Bazot, M., Nassar, J., Jonard, S., Rocourt, N., & Robert, Y.** (2004). Ovaire normal, variations physiologiques et pathologies fonctionnelles de l'ovaire. *EMC - Radiologie*, 1(6), 647-664. <https://doi.org/10.1016/j.emcrad.2004.08.002>
- Begum, S., Begum, F., Gani, N., Rahman, F., & Jahan, F. I.** (2020). Relationship of Age and Different Histological Types of Ovarian Tumors. *Bangladesh Journal of Obstetrics & Gynaecology*, 32(2), 99-105. <https://doi.org/10.3329/bjog.v32i2.48281>

- Bienenfeld, A., Azarchi, S., Lo Sicco, K., Marchbein, S., Shapiro, J., & Nagler, A. R.** (2019). Androgens in women. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 80(6), 1497-1506. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2018.08.062>
- Bischof, K., Knappskog, S., Hjelle, S. M., Stefansson, I., Woie, K., Salvesen, H. B., Gjertsen, B. T., & Bjorge, L.** (2019). Influence of p53 Isoform Expression on Survival in High-Grade Serous Ovarian Cancers. *Scientific Reports*, 9(1), 5244. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41706-z>
- Boinet, A.** (2017). Le syndrome des ovaires polykystiques : Prise en charge à l'officine et place / intérêt du myo-inositol. Rennes 1.
- Bos, J. L.** (1988). The ras gene family and human carcinogenesis. *Mutation Research*, 195(3), 255-271. [https://doi.org/10.1016/0165-1110\(88\)90004-8](https://doi.org/10.1016/0165-1110(88)90004-8)
- Bos, J. L.** (1989). ras oncogenes in human cancer : A review. *Cancer Research*, 49(17), 4682-4689.
- Boukerroum, A., Bouhanouna, S., Bouhnika, I., & Bensam, M. (Encadreur).** (2012). Les mutations génétiques comme cibles pour la détection précoce dans le diagnostic de cancer [Thesis, Université de Jijel]. <http://dspace.univ-jijel.dz:8080/xmlui/handle/123456789/6133>
- Bournet, B., Dufresne, M., Selves, J., Torrisani, J., Cordelier, P., & Buscail, L.** (2013). Oncogène Kras et cancer du pancréas—Trente ans plus tard. *médecine/sciences*, 29(11), Article 11. <https://doi.org/10.1051/medsci/20132911015>
- Brilhante, A., Augusto, K., Portela, M., Sucupira, L. C., Oliveira, L. A., Pouchaim, A. J., Mesquita Nóbrega, L. R., de Magalhães, T. F., & Sobreira, L. R.** (2017). Endometriosis and Ovarian Cancer : An Integrative Review (Endometriosis and Ovarian Cancer). *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*, 18(1). <https://doi.org/10.22034/APJCP.2017.18.1.11>
- Brun, J.-L., Boubli, B., & Sasco, A. J.** (2012). Épidémiologie des tumeurs de l'ovaire. *EMC - Gynécologie*, 7(2), 1-9. [https://doi.org/10.1016/S0246-1064\(12\)54702-X](https://doi.org/10.1016/S0246-1064(12)54702-X)
- Burger, H. G.** (2002). Androgen production in women. *Fertility and Sterility*, 77, 3-5. [https://doi.org/10.1016/S0015-0282\(02\)02985-0](https://doi.org/10.1016/S0015-0282(02)02985-0)

Buss, J. E., & Sefton, B. M. (1986). Direct identification of palmitic acid as the lipid attached to p21ras. *Molecular and Cellular Biology*, 6(1), 116-122. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.1.116>

Buy, J.-N., & Hugol, D. (2004). Les tumeurs epitheliales de l'ovaire. *Journal de Radiologie*, 85(9), 1283. [https://doi.org/10.1016/S0221-0363\(04\)76921-8](https://doi.org/10.1016/S0221-0363(04)76921-8)

C

Cable, J. K., & Grider, M. H. (2023). Physiology, Progesterone. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK558960/>

Capon, D. J., Chen, E. Y., Levinson, A. D., Seeburg, P. H., & Goeddel, D. V. (1983). Complete nucleotide sequences of the T24 human bladder carcinoma oncogene and its normal homologue. *Nature*, 302(5903), 33-37. <https://doi.org/10.1038/302033a0>

Casaubon, J. T., Kashyap, S., & Regan, J.-P. (2023). BRCA 1 and 2. In StatPearls. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470239/>

Charkhchi, P., Cybulski, C., Gronwald, J., Wong, F. O., Narod, S. A., & Akbari, M. R. (2020). CA125 and Ovarian Cancer : A Comprehensive Review. *Cancers*, 12(12), 3730. <https://doi.org/10.3390/cancers12123730>

Chen, V. W., Ruiz, B., Killeen, J. L., Cotter, T. R., Wu, X. C., Correa, C. N., & Howe, H. L. (2003). Pathology and classification of ovarian tumors. *Cancer*, 97(S10), 2631-2642. <https://doi.org/10.1002/cncr.11345>

Cherbal, F., Mehemmai, C., Boumehdi, L., Khider, F., Boucheffa, A., Gaceb, H., Mahfouf, H., & Bakour, R. (2018). Abstract 2208: Clinicopathological and genetic study of ovarian cancer in Algerian women: First report. *Cancer Research*, 78(13_Supplement), 2208-2208. <https://doi.org/10.1158/1538-7445.AM2018-2208>

Chetty, R., & Govender, D. (2013). Gene of the month : KRAS. *Journal of clinical pathology*, 66. <https://doi.org/10.1136/jclinpath-2013-201663>

Clarke, S. (1992). Protein isoprenylation and methylation at carboxyl-terminal cysteine residues. *Annual Review of Biochemistry*, 61(1), 355-386. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.002035>

D

Davis, L. G., Dibner, M. D., & Battey, J. F. (1986). Agarose Gel Electrophoresis. In *Basic Methods in Molecular Biology* (p. 58-61). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-01082-7.50022-9>

Desseignés, C., & Benusiglio, P. (2022). [Oncogénétique dans les cancers de l’ovaire]. *La Revue Du Praticien*, 72(6), 639-641.

Dobrzycka, B., Terlikowski, S. J., Kowalczyk, O., Niklińska, W., Chyczewski, L., & Kulikowski, M. (2009). Mutations in the KRAS gene in ovarian tumors. *Folia Histochemica et Cytobiologica*, 47(2), 221-224. <https://doi.org/10.2478/v10042-009-0039-6>

E

El-Masri, R. (2012). Mutations impliquées dans la progression du cancer épithélial de l’ovaire. Université de Montréal.

Eymard, J. (2014, juin 23). Les ovaires : Fonctions et pathologies. *sainte santé*. <https://saintesante.com/anatomie/bassin/ovaires-et-sante-chez-la-femme>

F

Faber, M. T., Kjær, S. K., Dehlendorff, C., Chang-Claude, J., Andersen, K. K., Høgdall, E., Webb, P. M., Jordan, S. J., Rossing, M. A., Doherty, J. A., Lurie, G., Thompson, P. J., Carney, M. E., Goodman, M. T., Ness, R. B., Modugno, F., Edwards, R. P., Bunker, C. H., Goode, E. L., ... Jensen, A. (2013). Cigarette smoking and risk of ovarian cancer : A pooled analysis of 21 case–control studies. *Cancer Causes & Control*, 24(5), 989-1004. <https://doi.org/10.1007/s10552-013-0174-4>

Fathalla, M. F. (1971). Incessant ovulation- a factor in ovarian neoplasia? *The Lancet*, 298(7716), 163. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)92335-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)92335-X)

G

Garcia-Robledo, J. E., Rosell, R., Ruíz-Patiño, A., Sotelo, C., Arrieta, O., Zatarain-Barrón, L., Ordoñez, C., Jaller, E., Rojas, L., Russo, A., de Miguel-Pérez, D., Rolfo, C., & Cardona, A. F. (2022). KRAS and MET in non-small-cell lung cancer : Two of

the new kids on the « drivers » block. *Therapeutic Advances in Respiratory Disease*, 16, 17534666211066064. <https://doi.org/10.1177/17534666211066064>

Gică, N., Peltecu, G., Chirculescu, R., Gică, C., Stoicea, M. C., Serbanica, A. N., & Panaitescu, A. M. (2022). Ovarian Germ Cell Tumors : Pictorial Essay. *Diagnostics*, 12(9), 2050. <https://doi.org/10.3390/diagnostics12092050>

Gosselin, J. (2016). L'hirsutisme chez la femme et sa prise en charge [Picardie jules verne]. <https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01337518/document>

Guibert, N., Ilie, M., Long, E., Hofman, V., Bouhlel, L., Brest, P., Mograbi, B., Marquette, C. H., Didier, A., Mazieres, J., & Hofman, P. (2015). KRAS Mutations in Lung Adenocarcinoma : Molecular and Epidemiological Characteristics, Methods for Detection, and Therapeutic Strategy Perspectives. *Current Molecular Medicine*, 15(5), 418-432. <https://doi.org/10.2174/1566524015666150505161412>

Guo, T., Dong, X., Xie, S., Zhang, L., Zeng, P., & Zhang, L. (2021a). Cellular Mechanism of Gene Mutations and Potential Therapeutic Targets in Ovarian Cancer. *Cancer Management and Research*, Volume 13, 3081-3100. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S292992>

H

Herrmann, C. (2003). Ras-effector interactions : After one decade. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(1), 122-129. [https://doi.org/10.1016/s0959-440x\(02\)00007-6](https://doi.org/10.1016/s0959-440x(02)00007-6)

Hollis, R. L., Thomson, J. P., Stanley, B., Churchman, M., Meynert, A. M., Rye, T., Bartos, C., Iida, Y., Croy, I., Mackean, M., Nussey, F., Okamoto, A., Semple, C. A., Gourley, C., & Herrington, C. S. (2020). Molecular stratification of endometrioid ovarian carcinoma predicts clinical outcome. *Nature Communications*, 11(1), 4995. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-18819-5>

Hoyle, A. T., & Puckett, Y. (2023). Endometrioma. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK559230/>

Huang, J., Chan, W. C., Ngai, C. H., Lok, V., Zhang, L., Lucero-Prisno, D. E., Xu, W., Zheng, Z.-J., Elcarte, E., Withers, M., Wong, M. C. S., & on behalf of NCD Global Health Research Group of Association of Pacific Rim Universities (APRU). (2022).

Worldwide Burden, Risk Factors, and Temporal Trends of Ovarian Cancer : A Global Study. *Cancers*, 14(9), 2230. <https://doi.org/10.3390/cancers14092230>

Huang, L., Guo, Z., Wang, F., & Fu, L. (2021). KRAS mutation : From undruggable to druggable in cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 6(1), Article 1. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00780-4>

Huguet, F., Fernet, M., Monnier, L., Touboul, E., & Favaudon, V. (2011). Mécanismes de carcinogénèse des cancers du pancréas : Quelles pistes pour la radiosensibilisation ? *Cancer/Radiothérapie*, 15(5), 365-375. <https://doi.org/10.1016/j.canrad.2011.04.001>

I

Ibrahim, A. E. K., & Arends, M. J. (2012). Molecular typing of colorectal cancer : Applications in diagnosis and treatment. *Diagnostic Histopathology*, 18(2), 70-80. <https://doi.org/10.1016/j.mpdhp.2011.11.002>

J

Jimeno, A., Messersmith, W. A., Hirsch, F. R., Franklin, W. A., & Eckhardt, S. G. (2009). KRAS Mutations and Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Colorectal Cancer : Practical Application of Patient Selection. *Journal of Clinical Oncology*, 27(7), 1130-1136. <https://doi.org/10.1200/JCO.2008.19.8168>

Joueidi, Y., Dion, L., Bendifallah, S., Mimoun, C., Bricou, A., Nyangoh Timoh, K., Collinet, P., Touboul, C., Ouldamer, L., Azaïs, H., Dabi, Y., Akladios, C., Canlorbe, G., Bolze, P.-A., Costaz, H., Mezzadri, M., Gauthier, T., Kridelka, F., Chauvet, P., ... Lavoué, V. (2020). Management and Survival of Elderly and Very Elderly Patients with Ovarian Cancer : An Age-Stratified Study of 1123 Women from the FRANCOGYN Group. *Journal of Clinical Medicine*, 9(5), 1451. <https://doi.org/10.3390/jcm9051451>

Jung, E. J., Eom, H. M., Byun, J. M., Kim, Y. N., Lee, K. B., Sung, M. S., Kim, K. T., & Jeong, D. H. (2017). Different features of the histopathological subtypes of ovarian tumors in pre- and postmenopausal women. *Menopause*, 24(9), 1028-1032. <https://doi.org/10.1097/GME.0000000000000976>

K

- Karnoub, A. E., & Weinberg, R. A.** (2008). Ras oncogenes : Split personalities. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(7), 517-531. <https://doi.org/10.1038/nrm2438>
- Kilowski, K. A., Dietrich, M., Xiu, J., Jones, N., Powell, M., Galvan Turner, V. B., Erickson, B., Mutch, D., Thaker, P., ElNaggar, A., Dizon, D., Ahmad, S., Herzog, T., Korn, W. M., & Holloway, R. W.** (2020). 844P KRAS mutant epithelial ovarian carcinomas (EOC) represent distinct genomic genotypes. *Annals of Oncology*, 31, S632. <https://doi.org/10.1016/j.annonc.2020.08.983>
- Kwon, M. J., & Shin, Y. K.** (2011). Epigenetic Regulation of Cancer-Associated Genes in Ovarian Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(2), 983-1008. <https://doi.org/10.3390/ijms12020983>

L

- L'Espérance, S.** (2008). DÉTERMINANTS MOLÉCULAIRES DE LA CHIMIORÉSISTANCE DANS LES CANCERS OVARIENS AVANCÉS. Université Laval.
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C., Bouizegarène, P., & Bogard, M.** (2009). KRAS et cancer colorectal : Un pas de géant vers la médecine personnalisée. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 24(4), 196-209. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2009.05.001>
- Lejeune, julie.** (2011). Caractéristiques médico-légales de l'examen gynécologique normal comparé à celui de victimes d'agression sexuelle. Henri I Poincaré, NANCY 1.
- Lièvre, A.** (2010). Mutations du gène KRAS et réponse aux anticorps anti-EGFR dans les cancers colorectaux : Ce qu'il faut retenir. *MISE AU POINT*, 192-195.

M

- Mazidimoradi, A., Momenimovahed, Z., Allahqoli, L., Tiznobaik, A., Hajinasab, N., Salehiniya, H., & Alkatout, I.** (2022). The global, regional and national epidemiology, incidence, mortality, and burden of ovarian cancer. *Health Science Reports*, 5(6). <https://doi.org/10.1002/hsr2.936>

Mittal, B., Chaturvedi, P., & Tulsyan, S. (2013). Restriction Fragment Length Polymorphism. In Brenner's Encyclopedia of Genetics (2^e éd., p. 190-193). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01314-0>

Moisan, A.-M. (2007). CONTRIBUTION DES MUTATIONS DANS LES GÈNES BRCA1 ET BRCA2 CHEZ LES CANADIENNES-FRANÇAISES À RISQUE ÉLEVÉ DE DÉVELOPPER UN CANCER DU SEIN ET/OU DE L'OVAIRE. UNIVERSITÉ LAVAL QUÉBEC.

Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., & Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world : Epidemiology and risk factors. International Journal of Women's Health, Volume 11, 287-299. <https://doi.org/10.2147/IJWH.S197604>

Murugan, A. K., Grieco, M., & Tsuchida, N. (2019). RAS mutations in human cancers : Roles in precision medicine. Seminars in Cancer Biology, 59, 23-35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.06.007>

N

Nshizirungu, J. P. (2015). Evaluation de deux gènes : HER2 et KRAS dans le cancer de l'estomac. UNIVERSITE SIDI MOHAMED BEN ABDELLAH.

O

Organ, S. L. (2014). c-MET and KRAS : Signalling and Clinical Implications in Colorectal Cancer [Thesis]. <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/43691>

P

Palmirotta, R., Savonarola, A., Ludovici, G., De Marchis, M. L., Covello, R., Ettorre, G. M., Ialongo, C., & Guadagni, F. (2011). Concurrent mutation in exons 1 and 2 of the K-ras oncogene in colorectal cancer. Folia Histochemica Et Cytobiologica, 49(4), 729-733. <https://doi.org/10.5603/fhc.2011.0097>

Pierson, W. E., Peters, P. N., Chang, M. T., Chen, L., Quigley, D. A., Ashworth, A., & Chapman, J. S. (2020). An integrated molecular profile of endometrioid ovarian cancer. Gynecologic Oncology, 157(1), 55-61. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2020.02.011>

Poitras, E., & Houde, A. (2003). La PCR en temps réel : Principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology*, 2, 2-11.

Prat, J. (2015). FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum : Abridged republication. *Journal of Gynecologic Oncology*, 26(2), 87. <https://doi.org/10.3802/jgo.2015.26.2.87>

R

Rampersad, A. C., Wang, Y., Smith, E. R., & Xu, X.-X. (2015). Menopause and ovarian cancer risk : Mechanisms and experimental support. 2(1), 14-23.

Rampersad, A. C., Wang, Y., Smith, E. R., & Xu, X.-X. (2015). Menopause and ovarian cancer risk : Mechanisms and experimental support. 2(1), 14-23.

Rásó, E. (2020). Splice variants of RAS—translational significance. *Cancer and Metastasis Reviews*, 39(4), 1039-1049. <https://doi.org/10.1007/s10555-020-09920-8>

Rechsteiner, M., Zimmermann, A.-K., Wild, P. J., Caduff, R., von Teichman, A., Fink, D., Moch, H., & Noske, A. (2013). TP53 mutations are common in all subtypes of epithelial ovarian cancer and occur concomitantly with KRAS mutations in the mucinous type. *Experimental and Molecular Pathology*, 95(2), 235-241. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2013.08.004>

Ruuth-Praz, J. (2019). Valeur pronostique des sous-types de mutations de KRAS dans les adénocarcinomes pulmonaires en récurrence traités par immunothérapie dans une cohorte française rétrospective (p. NNT : 2019LORR1202) [Other, Université de Lorraine]. <https://hal.univ-lorraine.fr/hal-03298378>

S

Sait, K. H., Alam, M. Z., Haque, A., Sait, H. K., Sait, M. K., & Anfinan, N. M. (2022). Survival and prognostic factors in women treated for epithelial ovarian cancer in western region of Saudi Arabia. *Saudi Medical Journal*, 43(2), 146-155. <https://doi.org/10.15537/smj.2022.43.2.20210626>

Sakai, K., Ukita, M., Schmidt, J., Wu, L., De Velasco, M. A., Roter, A., Jevons, L., Nishio, K., & Mandai, M. (2017). Clonal composition of human ovarian cancer based

on copy number analysis reveals a reciprocal relation with oncogenic mutation status. *Cancer Letters*, 405, 22-28. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.07.013>

Salehi, F., Dunfield, L., Phillips, K. P., Krewski, D., & Vanderhyden, B. C. (2008). Risk Factors for Ovarian Cancer : An Overview with Emphasis on Hormonal Factors. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, 11(3-4), 301-321. <https://doi.org/10.1080/10937400701876095>

Shao, Y., Li, H., Du, R., Meng, J., & Yang, G. (2018). Involvement of non-coding RNAs in chemotherapy resistance of ovarian cancer. *Journal of Cancer*, 9(11), 1966-1972. <https://doi.org/10.7150/jca.24550>

Shen, F., Chen, S., Gao, Y., Dai, X., & Chen, Q. (2017). The prevalence of malignant and borderline ovarian cancer in pre- and post-menopausal Chinese women. *Oncotarget*, 8(46), 80589-80594. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.20384>

Soygur, B., & Laird, D. J. (2021). Ovary Development: Insights From a Three-Dimensional Imaging Revolution. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 698315. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.698315>

T

Takai, Y., Sasaki, T., & Matozaki, T. (2001). Small GTP-Binding Proteins. *Physiological Reviews*, 81(1), 153-208. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.1.153>

Tantray, J. A., Mansoor, S., Wani, R. F. C., & Nissa, N. U. (2023). Agarose gel electrophoresis. In *Basic Life Science Methods* (p. 103-106). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-19174-9.00024-6>

Therachiyil, L., Anand, A., Azmi, A., Bhat, A., Korashy, H. M., & Uddin, S. (2022). Role of RAS signaling in ovarian cancer. *F1000Research*, 11, 1253. <https://doi.org/10.12688/f1000research.126337.1>

Therachiyil, L., Anand, A., Azmi, A., Bhat, A., Korashy, H. M., & Uddin, S. (2022). Role of RAS signaling in ovarian cancer. *F1000Research*, 11, 1253. <https://doi.org/10.12688/f1000research.126337.1>

Torre, L. A., Trabert, B., DeSantis, C. E., Miller, K. D., Samimi, G., Runowicz, C. D., Gaudet, M. M., Jemal, A., & Siegel, R. L. (2018). Ovarian cancer statistics, 2018 : Ovarian Cancer Statistics, 2018. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 68(4), 284-296. <https://doi.org/10.3322/caac.21456>

Trifanescu, O. (2018). Clinical Prognostic Factors in pre-and Post-Menopausal Women with Ovarian Carcinoma. Acta Endocrinologica (Bucharest), 14(3), 353-359. <https://doi.org/10.4183/aeb.2018.353>

U

Uhel, F., Zafrani, L., & Commission de la recherche translationnelle de la Société de réanimation de langue française. (2019). Nouvelles techniques de biologie moléculaire. Médecine Intensive Réanimation. <https://doi.org/10.3166/rea-2019-0119>

V

Varol, U., Kucukzeybek, Y., Alacacioglu, A., Somali, I., Altun, Z., Aktas, S., & Oktay Tarhan, M. (2018). BRCA genes : BRCA 1 and BRCA 2. Journal of B.U.ON.: Official Journal of the Balkan Union of Oncology, 23(4), 862-866.

<https://doi.org/10.1126/science.1062023>

W

Wainsten, J.-P. (2012). Le Larousse médical (Nouvelle éd). Larousse.

Walker, J. L., Powell, C. B., Chen, L., Carter, J., Bae Jump, V. L., Parker, L. P., Borowsky, M. E., & Gibb, R. K. (2015). Society of Gynecologic Oncology recommendations for the prevention of ovarian cancer : Salpingectomy to Prevent Ovarian Cancer. Cancer, 121(13), 2108-2120. <https://doi.org/10.1002/cncr.29321>

Wambecke, A. (2019). Implication du long ARN non-codant «UCA1» dans la chimiorésistance des cancers de l’ovaire. l’Université de Caen Normandie.

Webb, P. M., & Jordan, S. J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology, 41, 3-14. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2016.08.006>

Westcott, P., & To, M. (2012). The Genetics and Biology of KRAS in Lung Cancer. Chinese journal of cancer, 32. <https://doi.org/10.5732/cjc.012.10098>

X

Xiao, X., Melton, D. W., & Gourley, C. (2014). Mismatch repair deficiency in ovarian cancer—Molecular characteristics and clinical implications. Gynecologic Oncology, 132(2), 506-512. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2013.12.003>

Xie, W., Sun, H., Li, X., Lin, F., Wang, Z., & Wang, X. (2021). Ovarian cancer : Epigenetics, drug resistance, and progression. Cancer Cell International, 21(1), 434. <https://doi.org/10.1186/s12935-021-02136-y>

Y

Yachida, N., Yoshihara, K., Yamaguchi, M., Suda, K., Tamura, R., & Enomoto, T. (2021). How Does Endometriosis Lead to Ovarian Cancer? The Molecular Mechanism of Endometriosis-Associated Ovarian Cancer Development. Cancers, 13(6), 1439. <https://doi.org/10.3390/cancers13061439>

Yang, L., Ijaz, I., Cheng, J., Wei, C., Tan, X., Khan, Md. A., Fu, X., & Fu, J. (2017). Evaluation of amplification refractory mutation system (ARMS) technique for quick and accurate prenatal gene diagnosis of CHM variant in choroideremia. The Application of Clinical Genetics, Volume 11, 1-8. <https://doi.org/10.2147/TACG.S144383>

Z

Zhang, Y., Cao, L., Nguyen, D., & Lu, H. (2016). TP53 mutations in epithelial ovarian cancer. Translational Cancer Research, 5(6), 650-663. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.08.40>

Zilfi W. 2012. Les tumeurs ovariennes d'aspect épidémiologique, diagnostiques, et thérapeutique. (Thèse), MARRAKCH. 96 p.

➤ *Sites web :*

Web 1 : <https://gco.iarc.fr/today/home>

Web 2: <https://www.maxicours.com/se/cours/fonctionnement-de-l-appareil-reproducteur-feminin/>

Web 3 : <https://www.e-cancer.fr/Patients-et-proches/Les-cancers/Cancer-de-l-ovaire/Les-ovaires>

Web 4 : <https://www.cancer.org/cancer/ovarian-cancer/about/what-is-ovarian-cancer.html>

Web 5 : <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-ovaire/symptomes-diagnostic-cancer>

Web 6 : <https://www.fondation-arc.org/cancer/cancer-ovaire/traitement-cancer>

ANNEXES

Annexe 1

Questionnaire 1(Témoins)

Information générale :

Service :

Numéro du dossier :

Date :

Nom : Prénom :

Date de naissance : Age :

Adresse actuelle :

Origine :

Poids : (Kg) Taille :(Cm)

Situation familiale : Marié (e) Célibataire Divorcé Autres

si mariée : année du mariage Et nombre de partenaires :

Profession :

Antécédents personnels :

Antécédents familiaux : cas similaire dans la famille : Oui Non

Si oui précisez le membre de la famille atteint :

Autre tumeurs : Oui Non

Si oui, précisez les membres de la famille atteint :

Autres antécédents familiaux :

Mode de contraception :

Questionnaire 2 (Patientes)**Information générale :**

Service :

Numéro du dossier :

Date :

Nom : Prénom :

Date de naissance : Age :

Adresse actuelle :

Origine :

Poids : (Kg) Taille :(Cm)

Situation familiale : Marié (e) Célibataire Divorcé Autres

si mariée : année du mariage Et nombre de partenaires :

Profession :

Antécédents personnels :

Antécédents familiaux : cas similaire dans la famille : Oui Non

Si oui précisez le membre de la famille atteint :

Autre tumeurs : Oui Non

Si oui, précisez les membres de la famille atteint :

Autres antécédents familiaux :

Mode de contraception :**Diagnostic de la maladie :**

Découverte en : (Mois)/..... (Année)

Type histologique :

Résultat biopsie :

Traitement : Chirurgie : Oui Non Chimiothérapie : Oui Non Radiothérapie : Oui Non Autres traitements : Oui Non

Etat actuel du patient :

Stationnaire rechute rémission guérison

Annexe 2

Préparation des solutions utilisées pour l'extraction d'ADN

1. Solution de lyse du RBC

NH₄Cl (chlorure d'ammonium) 150 mM

NaHCO₃ (bicarbonate de sodium) 10 mM

EDTA disodique 0,1 mM

1. Solution saline tamponnée au phosphate (PBS)

NaCl (chlorure de sodium) 137 mM

KCl (chlorure de potassium) 2,7 mM

Na₂HPO₄ (phosphate de sodium dibasique) 10 mM

KH₂PO₄ (phosphate de potassium monobasique) 1,8 mM

pH est ajusté à 7,4

2. Tampon de lyse pH 8

Tris HCl 20mM

EDTA disodique 0,1mM

NaCl 25 mM

Annexe 3

1. Préparation de la solution TBE

Préparation de la solution TBE 10X

108 g Tris base

55 g Acide borique

7,5 g sel disodique EDTA

H₂O pure

Préparation de la solution TBE 1X

100 ml de solution TBE 10X

900 ml ultra H₂O

2. Préparation du gel d'agarose

Le gel d'agarose à 2% peut être préparé selon le protocole suivant :

- Peser 2 g d'agarose en utilisant une balance de précision.
- Mélanger l'agarose avec 100 ml de tampon TBE 1X.
- Mettre le mélange sur un agitateur thermomagnétique jusqu'à la dissolution totale des cristaux d'agarose dans le tampon.
- Ajouter 0.8 µl de SYBR green au mélange ;
- Couler délicatement le gel sur le portoir spécial et placer les peignes soigneusement ;
- Après refroidissement, enlever les peignes ; le gel est polymérisé et prêt à l'emploi.

Résumés

Résumé :

Le cancer de l'ovaire est l'un des cancers gynécologiques les plus courants en Algérie avec un taux de mortalité élevé. Ce cancer est lié à de nombreuses mutations génétiques à savoir les mutations du gène KRAS. Dans ce cadre s'inscrit notre objectif qui vise à évaluer l'implication du polymorphisme de la mutation G12D du gène KRAS au risque de développement d'un cancer de l'ovaire.

Une analyse moléculaire de 25 patientes et 25 témoins a été effectuée par la PCR-RFLP.

L'analyse descriptive de la population d'étude a révélé que les femmes ménopausées sont plus susceptibles d'avoir un cancer de l'ovaire et que le type épithélial est le plus dominant. Les résultats obtenus de l'étude moléculaire ont montré la présence du génotype muté au sein de la population malade avec des fréquences de 12% pour l'hétérozygote (GA) et 4% pour l'homozygote muté (AA) cependant l'analyse de l'ADN des témoins a montré la présence du génotype sauvage à 100%. Aussi une différence statistiquement significative a été remarquée dans la distribution allélique du polymorphisme du gène KRAS ($P=0.021$).

L'association entre ce polymorphisme et le risque de cancer de l'ovaire n'a pas été confirmée, en raison de la difficulté du calcul de l'odds ratio.

Mots clés : cancer de l'ovaire, gène KRAS, mutation. PCR-RFLP, génotype, allèle, polymorphisme.

الملخص:

سرطان المبيض هو أحد أكثر أنواع السرطانات النسائية شيوعًا في الجزائر مع ارتفاع معدل الوفيات. يرتبط هذا السرطان بالعديد من الطفرات الجينية، منها الطفرات في جين KRAS. في هذا الإطار، هدفنا هو تقييم مشاركة تعدد الأشكال للطفرة G12D لجين KRAS المعرضة لخطر الإصابة بسرطان المبيض.

تم إجراء تحليل جزيئي لـ 25 مريضًا و25 شاهد بواسطة PCR-RFLP. كشف التحليل الوصفي لمجموعة الدراسة أن النساء بعد سن اليأس أكثر عرضة للإصابة بسرطان المبيض وأن النوع الظهاري هو الأكثر انتشارًا.

أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها من الدراسة الجزيئية وجود نمط جيني متحور في السكان المريضين بترددات 12% للزيجوت المتغاير (GA) و4% للزيجوت المتماثل المتحور (AA)، ومع ذلك، أظهر تحليل الحمض النووي للضوابط وجود 100% نمط جيني بري.

كما لوحظ اختلاف ذو دلالة إحصائية في توزيع الأليل لتعدد أشكال جين KRAS ($P = 0.021$). لم يتم تأكيد الارتباط بين تعدد الأشكال هذا وخطر الإصابة بسرطان المبيض، بسبب صعوبة حساب نسبة الاحتمالات.

الكلمات الرئيسية: سرطان المبيض، جين KRAS، طفرة. PCR-RFLP، نمط جيني، الأليل.

Abstract:

Ovarian cancer is one of the most common gynecological cancers in Algeria with a high mortality rate. This cancer is linked to many genetic mutations, including mutations in the KRAS gene. In this context, our objective is to evaluate the involvement of polymorphism in the G12D mutation of the KRAS gene at the risk of developing ovarian cancer.

A molecular analysis of 25 patients and 25 controls was performed by PCR-RFLP.

Descriptive analysis of the study population revealed that postmenopausal women are more likely to have ovarian cancer and that the epithelial type is the most dominant type. The results obtained from the molecular study showed the presence of mutated genotype in the diseased population with frequencies of 12% for heterozygous (GA) and 4% for mutated homozygous (AA) however, DNA analysis of the controls showed the presence of 100% wild genotype.

Also, a statistically significant difference was noted in the allele distribution of the KRAS gene polymorphism ($P=0.021$).

The association between this polymorphism and the risk of ovarian cancer has not been confirmed, due to the difficulty of calculating the odds ratio.

Key words: Ovarian cancer, KRAS gene, mutation. RFLP-PCR, genotype, allele, polymorphism.

Année universitaire : 2022-2023

Présenté par : DIABI Sabrine
DJEGHMOUNE Djihad
Nasreddine

Étude des mutations du gène KRAS dans le cancer de l'ovaire

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master en Biochimie

Le cancer de l'ovaire est l'un des cancers gynécologiques les plus courants en Algérie avec un taux de mortalité élevé. Ce cancer est lié à de nombreuses mutations génétiques à savoir les mutations du gène KRAS. Dans ce cadre s'inscrit notre objectif qui vise à évaluer l'implication du polymorphisme de la mutation G12D du gène KRAS au risque de développement d'un cancer de l'ovaire.

Une analyse moléculaire de 25 patientes et 25 témoins a été effectuée par la PCR-RFLP.

L'analyse descriptive de la population d'étude a révélé que les femmes ménopausées sont plus susceptibles d'avoir un cancer de l'ovaire et que le type épithélial est le plus dominant. Les résultats obtenus de l'étude moléculaire ont montré la présence du génotype muté au sein de la population malade avec des fréquences de 12% pour l'hétérozygote (GA) et 4% pour l'homozygote muté (AA) cependant l'analyse de l'ADN des témoins a montré la présence du génotype sauvage à 100%. Aussi une différence statistiquement significative a été remarquée dans la distribution allélique du polymorphisme du gène KRAS ($P=0.021$).

L'association entre ce polymorphisme et le risque de cancer de l'ovaire n'a pas été confirmée, en raison de la difficulté du calcul de l'odds ratio.

Mots-clefs : cancer de l'ovaire, gène KRAS, mutation. PCR-RFLP, génotype, allèle, polymorphisme

Laboratoires de recherche : Labo 4 au centre national de la recherche en biotechnologie (CRBt)-Constantine-

Encadrante 1 : MOUSSAOUI Samira (MCB-UFM, Constantine 1).

Encadrante 2 : AYACHI Ouarda Sariyah (MCB- CRBt Constantine)

Présidente de jury : MEDOUKALI Imane (MCB-UFM, Constantine1).

Examinatrice : OUNIS Leyla (MCA -UFM, Constantine 1).