

الجمهورية الشعبية الديمقراطية الجزائرية  
**RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي  
**MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR  
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**



جامعة الاخوة منتوري قسنطينة  
**Université des Frères Mentouri Constantine**  
**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
**Département de Biologie Animale**

**Mémoire présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master**

**Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie**

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Génétique Moléculaire**

**Intitulé :**

**Polymorphisme C677T du gène de la MTHFR  
et risque de cancer du rectum**

**Présentée et soutenue par : BOUSSEHABA Louiza et MECILI Ikram le : 01/07/2015**

**Jury d'évaluation**

**Président du jury : SATTI DALILA**

Professeur- Université Constantine 1.

**Rapporteur : BOUDAOUK KHADIDJA**

MCA Hospitalo-Universitaire,  
Faculté de médecine, UC3

**Co-encadreur : BOUCENA AMIRA**

Doctorante- unversité constantine 1

**Examineurs : TALEB SALOUA**

Maître assistante, Hospitalo-Universitaire,  
Faculté de médecine, UC3

**Année universitaire  
2014 - 2015**

# *Remerciements*

*Au terme de ce travail, nous tenons à exprimer tous nos remerciements à DIEU tout puissant, qui en son nom et avec sa protection, nous avons réussi à réaliser ce travail.*

*Nos profonds remerciements vont au **Boudaoued Khadidja** professeur en Onco-radiothérapie au CHUC, qui a accepté d'encadrer nos travaux, pour tout le temps qu'elle nous a consacré malgré ces occupations, pour ses directives précieuses, pour avoir été patiente et compréhensive tout au long de notre période d'encadrement.*

*A Madame **SATTA Dalila** Professeur au département des sciences de la nature et de la vie et responsable de la filière de Génétique pour sa générosité, son aide, son orientation, sa disponibilité et ses conseils, et pour avoir accepté de présider le jury.*

*Un merci bien particulier adressé également à **Monsieur** le professeur **ABADI N**, chef de service du laboratoire de biochimie et de biologie moléculaire du CHU pour nous avoir accueillie dans son laboratoire.*

*Un grand merci aussi adressé à mademoiselle **Boucenna Amira** doctorante en génétique moléculaire pour ses conseils et pour son aide précieuse.*

*nos remerciements: A madame **TALEB SALOUA** Maître assistante au CHUC, qui ont accepté d'évaluer notre travail, et pour sa gentillesse.*

*A tout le personnel du service d'onco-radiothérapie CHUC.*

*Nous adressons nos sincères remerciements à tous les professeurs, intervenants et toutes les personnes qui par leurs paroles, leurs écrits, leurs conseils et leurs critiques ont guidé nos réflexions jusqu'à l'obtention du diplôme de master.*

# *Dédicace*

*Je dédie ce mémoire à :*

*Mes parents :*

*Ma mère, qui a œuvré pour ma réussite, par son amour, son soutien, tous les sacrifices consentis et ses précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, reçois à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.*

*Mon père, qui peut être fier et trouver ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie. Puisse Dieu faire en sorte que ce travail porte son fruit ; Merci pour les valeurs nobles, l'éducation et le soutien permanent venu de toi.*

*Mes frères Mounder, Housseem et Mehdi qui n'ont cessé d'être pour moi des exemples de persévérance, de courage et de générosité.*

*Mon fiancé Chouaib sans ton aide, tes conseils et tes encouragements ce travail n'aurait vu le jour, Que dieu réunisse nos chemins pour un long commun serein, je t'aime.*

*Ma belle-famille, la famille Lemdaoui, Je prie dieu qu'il vous prodigue santé et longue vie.*

*tous ceux et toutes celles que j'aime. Fatima, Laila, Ikram, Lyna, Khadijha, Narimen, Rayen, Amina et Roumaissa ... je vous dédie ce travail en témoignage de mon attachement et mon amour, que dieu vous donne santé, bonheur et prospérité.*

*LOUIZA BOUSSEHABA*

*Je dédie ce modeste travail :*

*A mes très chère mère et père*

*Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et affection tout au long de mon parcours. Tu n'as cessé de me soutenir et de m'encourager durant toutes les années de mes études, tu as toujours été présente à mes côtés pour me consoler quand il fallait. En ce jour mémorable, pour moi ainsi que pour toi, reçoit ce travail en signe de ma vive reconnaissance et ma profonde estime. Puisse le tout puissant te donner santé, bonheur et longue vie afin que je puisse te combler à mon tour. QU'ALLAH vous garde et vous procure une bonne santé et une longue vie je vous aime très fort « Maman Papa ».*

*A mes chères sœurs « maroua, manar, fériel » Tous les mots ne sauraient exprimer la gratitude, l'amour, la reconnaissance et le respect que j'ai pour vous.*

*A ma chère grand-mère, Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Que Dieu vous préserve santé et longue vie.*

*A tout ma famille du côté paternel et maternelle  
Sans oublier mes très chères sœur et amies « mimi, imén, soumia, sara, ikhilas » et mes fidèles amis : liza lyna, khadidja, Narimen, rayen, ... »  
tous ceux et toutes celles que j'aime.  
Que dieu vous donne santé, bonheur et prospérité.*

*Mecili Akram*

Introduction.....	1
CHAPITRE 1.....	3
I. RAPPELS.....	4
1. ANATOMIE DU RECTUM .....	4
2. Histologie du rectum.....	5
II. Cancer du rectum .....	6
II.1 Definition.....	6
II.2 Epidémiologie.....	7
2.1 Epidémiologie descriptive .....	7
2.2 Epidémiologie analytique et facteurs de risque .....	7
2.3 Les cancers épidémiologiquement liés.....	8
II.3 ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE .....	9
LES FORMES HISTOLOGIQUES DES CANCERS COLORECTAUX PRIMITIFS.....	9
II. 4 ETUDE CLINIQUE .....	9
4.1 Les circonstances de découverte.....	9
4.2. L'examen clinique .....	10
4.3 Les examens paracliniques a visée diagnostique .....	10
4.4 le bilan d'extension.....	10
4. 4 Classification TNM .....	11
II.5 TRAITEMENTS.....	11
5-1 La chirurgie .....	11
5-2. La radiothérapie .....	12
5. 3. Chimiothérapie et thérapies ciblées.....	12
III. Cancérogénèse du cancer du rectum.....	12
Origine du cancer .....	12
III.1 Voie de la carcinogénèse .....	12
III.2 Vois moléculaires .....	13
III.3 les cancers colorectal héréditaires .....	14
III.4 Les cancers colorectaux sporadiques.....	15
VI.5 Les étape de la cancérogenèse colorectal .....	15
IV. MTHFR.....	16
1. La protéine de la MTHFR.....	16
2. Rôle de la MTHFR.....	16
3. Gène de la MTHFR.....	16

4. Polymorphisme de la MTHFR.....	17
4.1 Le polymorphisme C677T .....	17
5. Association entre MTHFR et cancer.....	18
6. Polymorphisme C677T de la MTHFR et cancérogenèse colorectale .....	18
Chapitre II.....	19
II.Méthodologie.....	20
1. RECRUTEMENT des individus.....	20
2. PRELEVEMENT sanguin .....	21
3. Etude moléculaire .....	22
4. ANALYSE statistique .....	26
III. Résultats et discussion .....	26
III.1. Résultats.....	26
III. 2 Discussion.....	31
Conclusion .....	33

### Liste des figures

<b>Figure 1 :</b> Anatomie du rectum.....	4
<b>Figure 2 :</b> Coupe sagittale du petit bassin chez une femme et un homme.....	5
<b>Figure 3 :</b> Schéma montrant les différentes couches tissulaires de la paroi du rectum.....	6
<b>Figure 4 :</b> Localisation du gène de la MTHFR au niveau du chromosome humain.....	17
<b>Figure 5 :</b> Structure schématique du gène et de la protéine.....	(Annexe 3)
<b>Figure 6 :</b> Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des fragments issus par clivage de HinfI présentant différents génotypes de la MTHFR.....	25
<b>Figure 7 :</b> Répartition des malades par tranches d'âge .....	27
<b>Figure 8 :</b> Répartition des malades selon le sexe .....	27
<b>Figure 9 :</b> Répartition par wilaya d'origine.....	28
<b>Figure 10 :</b> répartition selon le siège de la tumeur .....	30
<b>Figure 11 :</b> les symptômes révélateurs du cancer du rectum.....	30

### Liste des tableaux

<b>Tableau I :</b> La Classification des lésions rectales précancéreuses.....	(Annexe 1)
<b>Tableau II :</b> Répartition par wilaya.....	28
<b>Tableau III :</b> Répartition des patients selon les antécédents personnels.....	29
<b>Tableau VII :</b> Répartition des patients selon les antécédents familiaux.....	30

**LISTE DES ABRÉVIATIONS**

1. AA Acide Aminé
2. ACE Antigène Carcino Embryonnaire
3. ADN Acide DésoxyriboNucléique
4. ADNc l'Acide Désoxyribonucléique Complémentaire
5. AINS Anti-inflammatoires non stéroïdiens
6. APC Adénomateux Polyposis Coli
7. Arg Acide aminé arginine
8. BBP Bleu de BromoPhénol
9. BSA Bovine Sérum Albumine
10. CA.19.9 Carbohydrate Antigen
11. CCR Cancer Colorectale
12. CGH Hybridation Génomique Comparative
13. CpG dinucléotide Cytosine Posphate Guanine
14. CR Cancer Rectale
15. DALM Dysplasia-associated lesion or mass
16. DCC Deleted in Colorectal Cancer
17. EDTA Ethylene Diamine Tetracetic Acid
18. FAD Dinucléotide Adénine Flavine
19. Glu L'acide amine glutamine
20. HNPCC Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer
21. IRM Imagerie par Résonance Magnétique
22. Kras Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
23. LMNH Lymphomes Malins Non Hodgkiniens
24. LOH Loss Of Heterozygotis
25. Lys Acide aminé Lysine
26. MICI Maladies Inflammatoires Chroniques de l'intestin
27. MMR Mis-Match Repair
28. MSI Microsatellite Instability
29. MTHFR Méthylène Tetra Hydro Folate Réductase
30. Na Cl Chlorure de Sodium
31. NADPH Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate



---

<b>32.OR</b>	<b>Odds Ratio</b>
<b>33.P53</b>	<b>Gène de la protéine P53</b>
<b>34.PAF</b>	<b>Polypose Adénoateuse Familiale</b>
<b>35.PCR</b>	<b>Polymérase Chain Réaction</b>
<b>36.PM</b>	<b>Poid Moléculaire</b>
<b>37.RCH</b>	<b>Rectocolite Hémorragique</b>
<b>38.RER</b>	<b>Replicative Error</b>
<b>39.RFLP</b>	<b>Restriction Fragment Length Polymorphism</b>
<b>40.SAM</b>	<b>S-AdenosylMéthionine</b>
<b>41.SDS</b>	<b>Sodium Dodécyle Sulfate</b>
<b>42.TE</b>	<b>Tris EDTA</b>
<b>43.TBE</b>	<b>Tris Borate EDTA</b>
<b>44.TGF<math>\beta</math></b>	<b>Transforming Growth Factor</b>
<b>45.TNM</b>	<b>Tumor,Node,Métastase</b>

## Introduction

Les cancers colorectaux (CCR) viennent en deuxième position sur la liste des cancers les plus répandus en Algérie hommes et femmes confondus [1], après les cancers broncho-pulmonaires chez l'homme et le cancer du sein et du col utérin chez la femme. Ils constituent de plus en plus un problème majeur de santé publique.

Il existe une variation géographique importante de l'incidence du cancer colorectal dans le monde, influencée par le mode de vie des populations, le type d'alimentation et la prédisposition héréditaire. Il survient souvent de manière sporadique et il ne s'agit d'une affection héréditaire que dans 5% des cas.

Au cours de cette dernière décennie des progrès considérables ont été apportés à l'étude des facteurs de risque de CCR, en particulier ceux liés à certaines voies métaboliques fortement corrélées à cette maladie.

Les folates interfèrent avec les phénomènes de la carcinogénèse en modulant la méthylation de l'ADN et en contrôlant la synthèse de l'ADN.

Le rôle des folates dans la prévention de la carcinogénèse est fortement suspecté. Ainsi, une étude prospective Américaine incluant 14 407 personnes suivies pendant 20 ans a mis en évidence l'association d'un apport alimentaire suffisant en folates avec une réduction significative du risque de cancer colique [2]. Ces données posent la question de l'intérêt d'une supplémentation systématique de notre alimentation en folates.

Le statut cellulaire en folates dépend non seulement de l'apport alimentaire en folates mais aussi de déterminants génotypiques, les polymorphismes de deux enzymes du cycle des folates : la méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) et la méthionine synthase (MTR). La MTHFR est une enzyme clé qui catalyse la conversion du 5,10 méthylène tétrahydrofolate en 5, méthyl tétrahydrofolate, et qui assure le cycle des folates et permet à l'homocystéine d'être reméthylée en méthionine et d'être épurée de l'organisme [3]. Elle est codée par un gène localisé au niveau du chromosome 1 en position 1p36 et dont la mutation la plus fréquente est la C677T, une telle mutation crée une enzyme thermolabile qui possède une activité réduite. La mutation a lieu en position 677 et transforme la base C en T, ceci a pour conséquence la formation d'un acide aminé, valine au lieu d'alanine en position 222 de la chaîne protéique. Cette mutation est reconnue dans quelques études comme étant un facteur de risque de cancer du rectum.

L'objectif de notre étude était d'explorer l'association possible entre la variante du gène de la MTHFR C677T, et la survenue du cancer du rectum chez les patients admis au service d'Onco-radiothérapie du Centre Anticancéreux de Constantine (CAC). Nous avons également étudié les caractéristiques épidémiologiques, cliniques et histologiques des patients atteints du cancer du rectum admis au service d'oncologie radiothérapie du CHU de Constantine.

CHAPITRE 1

# Etude bibliographique

## I. RAPPELS

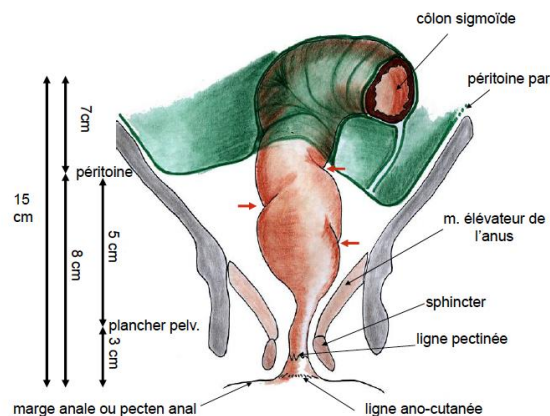
### 1. ANATOMIE DU RECTUM

#### 1.1 Anatomie descriptive

Le rectum est le segment terminal du tube digestif, il fait suite au colon sigmoïde au niveau de la troisième vertèbre sacrée et se termine à la ligne ano-cutanée ou marge anale.

Il comporte deux parties totalement différentes :

- **Le rectum pelvien** ou **ampoule rectale** : c'est un réservoir contractile situé dans la concavité sacro-coccygienne.
- **le rectum périnéal** ou **canal anal** : c'est la zone sphinctérienne entourée de deux muscles, le sphincter anal interne et le sphincter anal externe.



**Figure 2: Anatomie du rectum [4]**

#### 1.2 Les limites du rectum

Le rectum est limité en bas par la jonction ano-rectale. Sa limite haute est très variable, appelée jonction ou charnière recto-sigmoïdienne. Il est subdivisé en 3 parties différentes :

**Le haut rectum**, est située au-dessus du cul-de-sac de Douglas ; de 10 à 15 cm de la marge anale ou à plus de 7 cm par rapport au bord supérieur du sphincter.

**Le moyen rectum**, 5 à 10 cm de la marge anale, ou 2 à 7 cm par rapport au sphincter

**Le bas rectum**, de 0 à 5 cm de la marge anale ou à moins de 2 cm du bord supérieur du sphincter. Il est le siège des différentes tumeurs rectales à savoir les carcinomes épidermoïdes d'origine cutané, les adénocarcinomes rectaux. le terme de cancer du canal anal est souvent réservé aux carcinomes épidermoïdes [5].

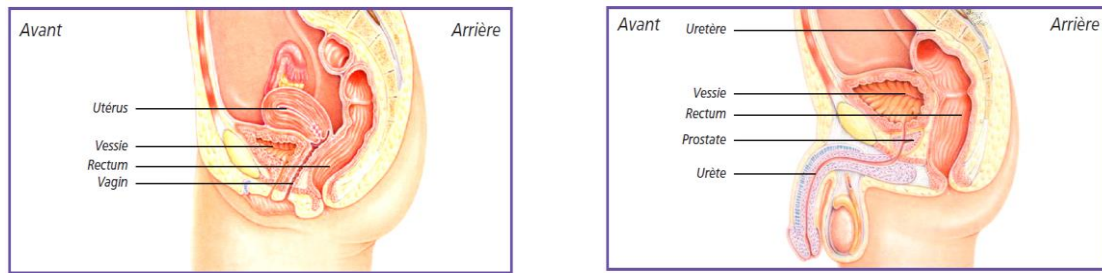


Figure 2 : Coupe sagittale du petit bassin chez une femme et un homme [6]

## 2. Histologie du rectum

La paroi colorectale est constituée de 5 couches (figure 3), dont le degré d'infiltration en profondeur est apprécié par l'écho-endoscopie en préopératoire ou par l'étude histologique de la pièce opératoire permettant ainsi la stadification tumorale.

- **La muqueuse** : elle est constituée par l'épithélium de surface glandulaire cylindrique et des glandes de Leiberkhün muco sécrétantes, bordés par une membrane : la lamina propria.
  - **La musculaire muqueuse ou muscularis mucosae** : C'est une couche fine de tissu musculaire lisse séparant la muqueuse de la sous muqueuse. Sur le plan carcinologique le respect de cette couche définit le cancer in-situ.
  - **la sous muqueuse** : elle est formée de tissu conjonctif assez dense comportant des formations lymphoïdes et les plexus sous muqueux.
  - **La musculuse** : elle est formée de 02 couches
    - Une couche interne avec des fibres circulaires
    - Une couche externe avec des fibres longitudinales qui se continuent au niveau du canal anal.
1. **La séreuse** : Elle est représentée par le feuillet péritonéal viscéral qui n'existe que dans la partie haute du rectum, sur ses faces antérieures et latérales. Dans sa portion sous péritonéale, ce feuillet est remplacé par un tissu fin qui dérive du fascia pelvien : c'est le fascia péri-rectal ou fascia récti qui enveloppe le méso rectum [7].

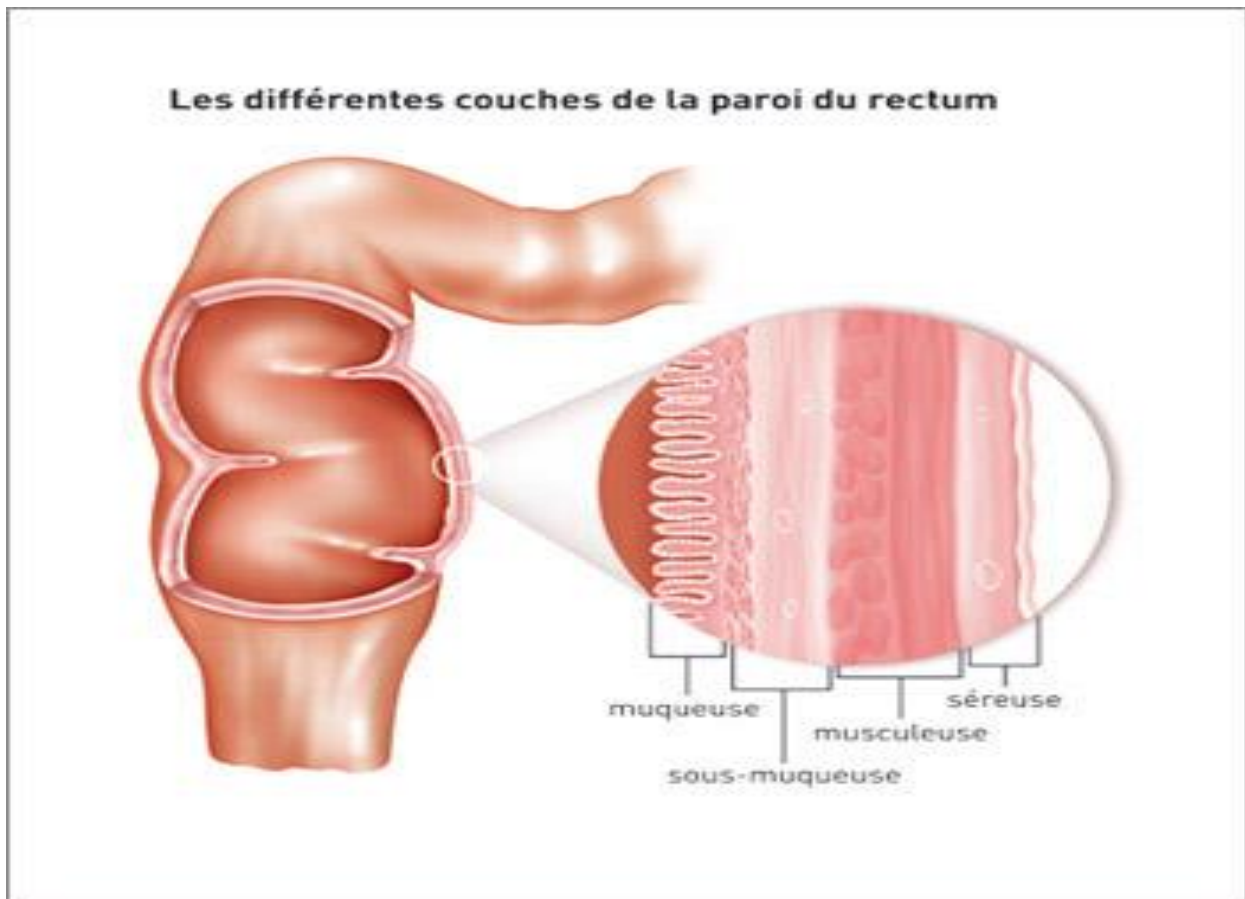


Figure 3 : Schéma montrant les différentes couches tissulaires de la paroi du rectum [8]

## II. Cancer du rectum

### II.1 Définition

Selon Hill et al (1978), le cancer colorectal est un cancer siégeant dans la région du côlon et du rectum (partie terminale du colon) caractérisé par une prolifération anormale de cellules dans le gros intestin et par la formation de carcinomes glandulaires ou adénocarcinomes. La tumeur pénètre alors en profondeur et peut atteindre successivement les différentes couches de la muqueuse colique jusqu'au péritoine qui l'enveloppe, puis les ganglions lymphatiques. La progression se fait par accumulations des mutations de gènes au sein des cellules (*APC*, *k-Ras*, *DCC*, *p53*) provoquant divers stades d'adénomes, puis d'adénocarcinomes.

Lors de la transformation maligne, la prolifération peut suivre deux voies :

- La voie lymphatique qui est responsable de l'envahissement ganglionnaire
- La voie hématogène qui donne des métastases à distance (les deux premiers organes atteints sont le foie et les poumons [9]).

## ***II.2 Epidémiologie***

### **2.1 Epidémiologie descriptive**

#### **2.1.1 Incidence et mortalité**

##### **- Dans le monde**

Les données épidémiologiques du cancer rectal sont le plus souvent associées à celles du colon, rendant leur individualisation difficile. Globalement, le CCR est un problème, mondial, de santé publique. Son incidence, annuelle, est d'environ 1,2 million de nouveaux cas et une mortalité, annuelle, de plus de 600.000 décès, le nombre, absolu, de cas est en augmentation, constante, du fait du vieillissement et de l'expansion des populations, dans le monde. L'incidence, la plus élevée, est trouvée en Amérique du nord et en Nouvelle Zélande ; la plus faible, en Afrique et en Asie [10].

Le cancer colorectal est la seconde cause de mortalité, dans le monde, tous sexe confondu

##### **- En Algérie**

Le cancer colorectal est classé en deuxième position, après le cancer du poumon chez l'homme et en 3ème position après le cancer du sein et du col utérin, chez la femme [11].

#### **2.1.2 Age et sexe**

L'incidence des cancers colorectaux augmente significativement après l'âge de 50 ans dans 94% des cas. L'âge moyen au diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et 72,8 ans chez la femme [12].

## **2.2 Epidémiologie analytique et facteurs de risque**

Le cancer colorectal résulte de l'interaction complexe entre susceptibilité héréditaire et facteurs environnementaux [13].

### **1. Régime et mode de vie**

Une alimentation riche en viande et en graisse, pauvre en fibres alimentaires et en vitamines, augmenterait le risque de cancer colorectal [14], Le calcium, la Vitamine D, certains médicaments comme les oestrogènes, les anti-inflammatoires non stéroïdiens (AINS) et l'aspirine auraient eu un rôle protecteur [15], La sédentarité augmente le risque de CCR [16]. Plusieurs études épidémiologiques ont montré une association positive avec l'abus d'alcool et le tabagisme [17].

### **2. Les maladies inflammatoires**

Les maladies inflammatoires du tube digestif, la Rectocolite hémorragique RCH et la maladie de Crohn, présentent un risque d'évolution vers une forme cancéreuse après 8 à 10



ans d'évolution [18].

### 3. Agents infectieux

Un parasite (*Schistosema japonicum*) peut augmenter le risque de CCR [19].

### 4. Syndromes héréditaires

La polypose adénomateuse familiale (PAF) à transmission autosomique dominante, rare à forte pénétrance. Causé par une mutation germinale du gène suppresseur de tumeur. *APC* (adenomatous polyposis coli), sur le bras long du chromosome 5q (5q21-22). Sa transformation maligne est inéluctable et impose une coloprotectomie totale d'emblée.

Les cancers coliques héréditaires sans polypose, Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) ou syndrome de Lynch. La transmission se fait sur un mode héréditaire autosomique dominant, le risque est alors multiplié par 02 à 5 par rapport à la population générale [20].

### 5. Lésions précancéreuse

Les lésions précancéreuses recto-coliques sont représentées essentiellement par :

**Les adénomes,** Les adénomes sont associés à un risque accru de cancer rectal. Ils sont connus comme des lésions pré néoplasique. La plupart, des CCR (60-80%) se développent à partir d'un adénome.

### 6. Les lésions polypôides (Type I)

Se définissant comme ayant une hauteur > à 3mm. Elles sont pédiculées ou sessiles.

### 7. Les lésions non polypôides (Type II)

Ont une hauteur  $\leq$  3mm. L'épaisseur de la lésion correspond à 2 fois (ou moins) celle de la muqueuse avoisinante.

La Classification des lésions rectales précancéreuses (**Annexe 1, tableau I**)

## 2.3 Les cancers épidémiologiquement liés

Le cancer du sein: Une prédisposition au cancer colorectal existe chez les femmes porteuses d'un cancer du sein, mais le risque est d'autant plus accentué qu'un cancer du sein survient chez les femmes jeunes, de moins de 45 ans.

Le cancer de l'endomètre et de l'ovaire : Le risque de survenue d'un cancer colorectal est multiplié par 1.5 après un carcinome de l'endomètre et, par 1.7 à 2.4 après un cancer de l'ovaire [21].

## **II.3 ETUDE ANATOMOPATHOLOGIQUE**

### **LES FORMES HISTOLOGIQUES DES CANCERS COLORECTAUX PRIMITIFS**

#### **3.1 LES ADENOCARCINOMES**

Les adénocarcinomes constituent l'immense majorité des cancers colorectaux, ils représentent 95% des cas. Ils compliquent un adénome dans 60% à 80% des cas.

#### **3.2 LES LYMPHOMES MALINS NON HODGKINIENS (LMNH)**

Les Lymphomes Malins Non Hodgkiniens (LMNH) primitifs colorectaux sont beaucoup plus rares que les adénocarcinomes de même localisation. Les localisations rectales sont exceptionnelles. Ils représentent environ 2 % de l'ensemble des cancers primitifs coliques

#### **3.3 LES TUMEURS CARCINOÏDES**

Les tumeurs carcinoïdes digestives sont les tumeurs endocrines les plus fréquentes. Cependant, elles ne représentent que 1,5 % des cancers digestifs. La localisation rectale représente (27%).

#### **3.4 LES MELANOMES MALINS**

Les mélanomes malins représentent 0,1 % des cancers rectaux et 2,5% des mélanomes C'est la localisation la plus fréquente après la peau et l'œil.

#### **3.5 LES SARCOMES COLORECTAUX**

Les sarcomes sont des tumeurs d'origine mésenchymateuse, c'est-à-dire, des tumeurs qui se développent à partir du tissu conjonctif embryonnaire [22] [23] [24].

## **II. 4 ETUDE CLINIQUE**

### **4.1 Les circonstances de découverte**

#### **➤ Dépistage systématique**

La recherche de sang dans les selles par le test *Hemocult* peut amener à découvrir un polype ou un cancer asymptomatique et généralement de petite taille.

#### **➤ Saignement digestif**

C'est le symptôme le plus classique mais qui n'est pas toujours présent. À type de rectorragie (sang rouge) le plus souvent. Peut passer inaperçu et se révéler finalement par une anémie par carence en fer.

➤ **Modifications du transit**

Troubles du transit à type de constipation inhabituelle, opiniâtre, d'apparition récente ou à type de diarrhée rebelle, ne répondant pas aux traitements usuels, à type d'alternance de diarrhée constipation.

➤ **Douleurs pelviennes ou périnéales**

Persistantes, souvent de mauvais pronostic, car témoignant en général d'un envahissement péri rectal.

➤ **Altération de l'état général**

(Asthénie, amaigrissement, fièvre au long cours, anémie) témoignant d'un cancer déjà évolué

➤ **Anémie ferriprive**

Secondaire à un saignement occulte de longue durée ;

➤ **Complications révélatrices**

Occlusion digestive par une tumeur colique sténosante, péritonite par perforation de la tumeur ou du côlon.

## 4.2. L'examen clinique

**Le toucher rectal** : c'est le temps capital de l'examen clinique dans le diagnostic du cancer du rectum. Il permet d'apprécier la taille de la tumeur, son siège exacte par rapport aux parois rectales et par rapport à la marge anale et surtout par rapport au bord supérieur du sphincter. Le toucher rectal apprécie le caractère infiltrant, mobile ou fixé de la tumeur par rapport aux parois pelviennes, et aux structures pelviennes antérieures.

## 4.3 Les examens paracliniques à visée diagnostique

**La rectoscopie** : permet de préciser le siège exact de la tumeur, ses mensurations exactes, le caractère circonférentiel ou non, son aspect bourgeonnant ou ulcéro-infiltrant, et surtout d'évaluer la distance entre le pôle inférieur de la tumeur et la marge anale. Elle permet également de réaliser des biopsies.

**La coloscopie** : peut être utilisée dans le diagnostic des cancers du rectum.

## 4.4 le bilan d'extension

➤ **Les marqueurs tumoraux**

Les données relatives aux marqueurs tumoraux (ACE, CA19.9) sont communes au cancer du côlon et au cancer du rectum.

➤ **Bilan radiologique**

✓ **Échographie endorectale**

Le bilan d'extension locorégionale du cancer du rectum a été transformé depuis l'avènement de l'écho-endoscopie rectale. Elle est devenue l'examen majeur dans le bilan pré-thérapeutique du cancer du rectum. Cette exploration permet d'apprécier l'extension de la tumeur à travers la paroi rectale. Il permet aussi de déceler des adénopathies métastatiques péritumorales.

✓ **Résonance magnétique nucléaire (IRM) pelvienne**

Permet d'apprécier l'extension pariétale de la tumeur, l'envahissement ganglionnaire, L'imagerie par résonance magnétique est nécessaire pour évaluer l'envahissement par contiguïté des organes pelviens dans les cancers du rectum localement avancés et fixés aux organes de voisinage. Elle permet également l'exploration des tumeurs sténosantes, non accessibles à l'échoendoscopie.

✓ **La tomographie à émission de positons-tomodensitométrie**

✓ **Autres examens radiologiques :**

Le bilan d'extension à distance, abdominale hépatique et extra-hépatique fait appel à l'échographie abdominale complétée au besoin par un scanner abdominal. La résonance magnétique nucléaire abdominale est demandée en deuxième intention en cas de doute sur la nature métastatique d'une lésion hépatique au scanner abdominal. La recherche de métastases pulmonaires fait appel à la radiographie du thorax. Un scanner thoracique complète le cliché radiologique standard en cas de doute sur une localisation secondaire pulmonaire [25].

#### **4. 4 Classification TNM**

La classification TNM (**l'annexe2, Tableau II**) est celle qui décrit le mieux le degré d'envahissement de la tumeur et des ganglions régionaux : c'est la classification internationale de référence qui doit être utilisée [26].

### **II.5 TRAITEMENTS**

Trois types de traitements sont utilisés pour traiter les cancers du rectum: la chirurgie, la radiothérapie et les traitements médicamenteux (chimiothérapie et thérapies ciblées) Ces traitements peuvent être utilisés seuls ou associés les uns aux autres.

#### **5-1 La chirurgie**

La chirurgie est le traitement principal du cancer du rectum. Elle consiste à réséquer la tumeur avec une marge de tissu sain et le réseau de ganglions lymphatiques correspondant

contenu dans le mesorectum. Le type de chirurgie réalisé dépend du siège de la tumeur et de sa distance par rapport au sphincter anal.

## **5-2. La radiothérapie**

La radiothérapie utilise des rayonnements ionisants. Elle a pour but la stérilisation (destruction) des cellules cancéreuses tout en épargnant le mieux possible les organes ou les tissus sains avoisinants. La radiothérapie a pour objectif d'améliorer le contrôle local en diminuant le risque de récurrence locorégionale, d'augmenter dans certains cas sélectionnés le taux de conservation sphinctérienne, d'améliorer la survie sans augmenter la morbidité immédiate et à long terme.

La cible principale des rayonnements ionisants est l'ADN des chromosomes des cellules. Les lésions susceptibles d'être créées par les particules ionisantes au sein de la double hélice de l'ADN sont très variées : lésions des bases et sucres ; pontages ; rupture de l'un des montants de l'échelle de l'ADN (cassure simple brin) ; rupture des deux montants (cassure double brin).

La radiothérapie peut être réalisée en préopératoire, en post opératoire ou en peropératoire.

## **5. 3. Chimiothérapie et thérapies ciblées**

Plusieurs types de médicaments anticancéreux sont utilisés pour traiter les cancers du rectum : des médicaments de chimiothérapie et de thérapies ciblées. On les regroupe sous le nom de traitements médicaux [27].

# **III. Cancérogénèse du cancer du rectum**

## ***Origine du cancer***

Les cancers colorectaux surviennent plus souvent à partir d'une lésion précancéreuse potentiellement décelable, que de novo. Toutes les mesures de dépistage et de prévention secondaires de tumeurs colorectales sont fondées sur l'existence de cette filiation adénome-cancer [28].

## ***III.1 Voie de la carcinogénèse***

Si les cancers colorectaux sont des tumeurs très homogènes sur le plan de leurs caractéristiques anatomopathologiques (95 % sont des adénocarcinomes), les progrès récents de la biologie moléculaire ont montré que les mécanismes de cancérogénèse à l'origine de ces tumeurs ne sont pas univoques. Il est maintenant bien établi qu'au moins une quinzaine de gènes identifiés à travers les formes familiales et sporadiques sont susceptibles d'être

impliqués dans la cancérogenèse colorectale. Les gènes touchés par ces anomalies, ou gènes cibles, sont nombreux : ce sont potentiellement tous les gènes qui contrôlent le cycle cellulaire, l'apoptose, la migration des cellules. Globalement, ils sont regroupés dans deux catégories : les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur [29].

### Les proto-oncogènes

Ont une action positive sur la prolifération cellulaire. Leurs versions mutées, appelées oncogènes, sont actives de façon excessive ou inappropriée. Il suffit de la modification d'une seule copie du gène pour activer un oncogène. Le plus impliqué dans le CCR est *KRAS2* (K-ras).

### Les gènes suppresseurs de tumeur

Au contraire ont une action négative sur la prolifération cellulaire. Les deux copies du gène doivent être modifiées pour qu'il perde sa fonction inhibitrice. Les gènes suppresseurs les plus impliqués dans le CCR sont *APC* (Adenomatous Polyposis Coli), *TP53* (gène de la protéine P53) et *DCC* (Deleted in Colorectal Cancer) [30].

## III.2 VOIS moléculaires

### 2.1 L'instabilité chromosomique

Dans la majorité des tumeurs colorectales (polyadénomatoase familiale et 85 % des cancers sporadiques), il est observé une instabilité chromosomique résultant des pertes ou de gains de chromosomes entiers ou de fragments de chromosomes. Ces remaniements chromosomiques ont été mis en évidence par des études de perte d'hétérozygotie, d'hybridation génomique comparative (CGH), et de CGH array. Les régions les plus fréquemment perdues dans les tumeurs colorectales primitives se situent sur le bras court du **chromosome 1** (1p32-36, 30 à 50 %) ; le bras long du **chromosome 5** (5q21—q22) ; le bras court du **chromosome 8** (8p11.2-p12, 8p22-p22.3); le bras court du **chromosome 17** (17p13, 75 %) ;le bras long du **chromosome 18** (18q21->qter, 67 %) ; le bras long du **chromosome 22** (22q12-q13,40 %) . Un certain nombre de gènes suppresseurs de tumeurs ont été identifiés dans les régions délétées. Il s'agit du gène *APC* (adenomatous polyposis coli) en 5q21 ; le gène *P53* en 17p13.1 ; le gène *DCC* et 2 gènes médiateurs de la voie de signalisation du *TGFβ* (*SMAD2* et *SMAD4*) en 18q21. [31] cependant mécanismes à l'origine de l'instabilité chromosomique ne sont pas clairement établis. La survenue de mutations inactivatrices du gène *APC* semble jouer un rôle dans cette instabilité chromosomique.

En effet, le gène *APC* muté code une protéine tronquée de sa partie carboxy-terminale, il en résulte un défaut d'interaction de la protéine *APC* avec les microtubules qui se fait par l'intermédiaire de la protéine kinase BUB1, rendant impossible l'attachement des microtubules aux kinetochores provoquant ainsi un défaut de ségrégation des chromosomes. Ainsi, l'altération du gène *APC* pourrait conduire à l'instabilité chromosomique en favorisant les anomalies de ségrégation chromosomique [32].

### 2.3 Les altérations épigénétiques

A côté des mécanismes d'instabilité génétique, plusieurs phénomènes épigénétiques semblent impliqués dans une proportion importante dans la carcinogenèse des tumeurs colorectales. Les aberrations de la méthylation de la cytosine située à l'intérieur du dinucléotidecytosine-phosphateguanine (CpG) est de loin le phénomène épigénétique le plus fréquent. Dans l'ADN humain, seul di nucléotide CpG est méthylé. La méthylation ne s'effectue que sur les cytosines situées en 5' d'une guanine. Près de 70 % des dinucléotides C-p-G sont méthylés. Ils sont répartis de façon irrégulière dans le génome humain [33].

### III.3 les cancers colorectal héréditaires

#### Polypose adénomateuse familiales (PAF)

Le PAF est responsable de 1 % des cancers colorectaux. De transmission autosomique dominante, elle est due à une mutation constitutionnelle germinales au niveau du gène suppresseur de tumeur *APC* (Adenomatous Polyposis Coli) : ainsi, chez un patient ayant une PAF, chaque cellule colique a déjà, de façon innée, inactivé une copie de ce gène suppresseur de tumeur. L'inactivation des deux copies, étape clef de la cancérogenèse colique, est donc beaucoup plus rapide [34]. La maladie est caractérisée par l'apparition de plusieurs centaines de polypes au niveau du colon et du rectum apparaissant le plus souvent à la puberté, ces polypes grossissant progressivement pour dégénérer et se transformer en cancer malin dès l'âge de 20 ans [35].

#### Le Syndrome de Lynch ou Syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer)

Le syndrome HNPCC, caractérisé par une transmission autosomique dominante à forte pénétrance, représente la forme la plus fréquente de cancer colorectaux héréditaires (1 à 5% des cancers colorectaux). Il est parfois difficile de le distinguer des cancers colorectaux sporadiques. Il a une forme héréditaire non polyposique de cancers colorectaux liée à une mutation constitutionnelle d'un gène impliqué dans le système de réparation des

mésappariements de l'ADN appelé système MMR (MisMatch Repair). Cette altération est responsable d'une perte de la fidélité de la réplication de l'ADN qui peut être mise en évidence par la présence d'une instabilité des microsatellites au niveau tumoral [36].

### **Autres polypes**

Elles sont encore plus rares que la PAF. Ce sont autres polyposes à transmission dominante avec risque accru de cancer colorectal

### **III.4 Les cancers colorectaux sporadiques**

Le cancer colorectal sporadique n'a pas de contexte héréditaire évident et représente la majorité des cancers colorectaux (85 à 90%).

Les patients affectés par cette maladie ne présentent pas de mutations génétiques germinales mais acquièrent des mutations responsables du développement tumoral tout au long de leur vie par exposition à divers cancérrogènes chimiques, viraux, bactériens ou encore alimentaires.

Comme pour les CCR d'origine héréditaire, les CCR sporadiques (CCRS) peuvent suivre deux types de voies pathogénétiques différentes [37].

- La majorité des CCRS (85%) est causée par une mutation somatique du gène *apc*. Au contraire, dans le cas de la FAP, cette mutation touche les cellules germinales [38].
- 15 % des CCRS sont causés par une MSI due à des mutations somatiques des gènes du système MMR [38]. Cette même instabilité existe dans le cas du HNPCC mais touche alors les lignées germinales. Les cellules présentant une forte instabilité des microsatellites n'ont qu'un taux faible de mutation sur le gène *apc*.

### **VI.5 Les étapes de la cancérogenèse colorectale**

On a pu définir expérimentalement les différentes étapes de la cancérogenèse colorectale :

- 1ère étape : prolifération cellulaire clonale du tiers moyen et supérieur des cryptes, avec anomalie de différenciation, aboutissant à la formation d'adénome
  
- 2ème étape : croissance et modification architecturale des adénomes aboutissant à la formation d'adénomes tubuleux, tubuleux villosités ou villosités. La dysplasie apparaît à ce stade.



- 3ème étape : dégénérescence caractérisée par l'émergence d'un clone cellulaire pouvant franchir la membrane basale ;
- 4ème étape : envahissement de la paroi digestive et apparition de métastases ganglionnaires et viscérales.

Des facteurs environnementaux et génétiques pourraient intervenir au niveau des différentes étapes [40].

## IV. MTHFR

### 1. La protéine de la MTHFR

La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase, plus communément appelée MTHFR, représente l'enzyme clé du métabolisme des folates. C'est une flavoprotéine cytosolique qui agit avec le dinucléotide adénine flavine (FAD) comme cofacteur en catalysant la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate en 5-méthyl tétrahydrofolate, indispensable à la reméthylation de l'homocystéine en méthionine [41], la MTHFR utilise comme donneur d'électron le NADPH.

La protéine humaine a deux isoformes de PM de 77 KDa et 70KDa. Ce dernier a été retrouvé qu'au niveau du tissu hépatique mais dans le tissu rénal il n'est présent que chez l'enfant [42].

La structure protéique de la MTHFR est subdivisée en deux domaines l'un catalytique (N terminal) de PM 40 KDa et l'autre régulateur (C terminale) de PM 37 KDa. A l'union de ces deux domaines se trouve une région hydrophobe avec séquence d'AA : Lys-Arg- Arg-Glu-Glu, qui représente le site de clivage par la trypsine.

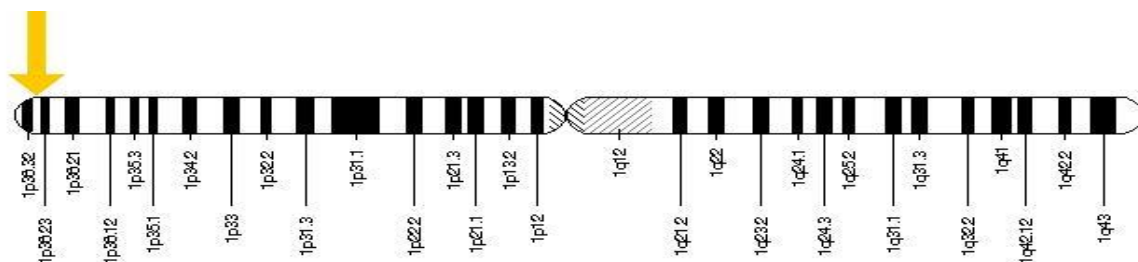
### 2. Rôle de la MTHFR

La MTHFR intervient dans le métabolisme de l'homocystéine. La 5,10-méthylène tétrahydrofolate réductase (MTHFR) catalyse la réduction irréversible du 5,10-méthylène tétrahydrofolate (CH<sub>2</sub>THF) en 5-méthyltétrahydrofolate (CH<sub>3</sub>THF) [43].

### 3. Gène de la MTHFR

Le gène de la MTHFR est localisé sur le bras court (p) du chromosome 1 en position 36.3. Plus précisément le gène est localisé dans la région des paires de bases 11.769.246 jusqu'à 11.788.568 du chromosome 1 [44]. L'ADNc de ce gène fait approximativement 2.2 kilo base de longueur et est constitué de 13 exons rangés selon leur taille de 103 paires de bases jusqu'à 432 paires de base [45] [46]. Les tailles des introns sont rangées de 250 paires

de bases jusqu'à 1.5 kilo base avec une exception d'un intron de 4.2 kilo base [47]. Le promoteur du gène ne contient pas de TATA box, mais contient des îlots CpG, une région CAAT et des sites de liaison pour les différents facteurs de transcription tels que le multiple potentiel SP1, AP1 et AP2 [48].



**Figure 4 : Localisation du gène de la MTHFR au niveau du premier chromosome humain [49]**

#### 4. Polymorphisme de la MTHFR

Un défaut d'activité de la protéine 5,10MTHFR avec une activité résiduelle est dû à plusieurs polymorphismes. La majorité d'entre eux sont découverts chez seulement une ou deux familles, il s'agit des polymorphismes T1317C, G1793A, T1081C, G1027T, T1084C et T1711C. Certains de ces polymorphismes ont été décrits en association avec le polymorphisme C677T et ceci diminue l'activité enzymatique de la protéine MTHFR de façon remarquable, alors que d'autres n'altèrent pas la séquence des acides aminés et leur rôle n'est pas bien décrit [50] [51].

##### 4.1 Le polymorphisme C677T

En 1988 Kang et al ont identifié un variant thermolabile du gène MTHFR corrélé avec des concentrations modérément élevées de l'homocystéine [52]. En 1995 Frosst et al ont démontré que ce variant est dû à la mutation C677T du gène MTHFR [39] qui correspond à une conversion d'une cytosine en une thymine au niveau de l'exon 4 du gène MTHFR transmise de façon autosomique récessive [53]. Cette mutation se traduit par une substitution d'une alanine en une valine en position 222 de la protéine MTHFR et se situe dans le domaine catalytique de l'enzyme au niveau du site de liaison avec le cofacteur Flavine Adénine dinucléotide (FAD). La protéine résultante de ce polymorphisme présente une activité enzymatique réduite à 37°C et plus, pour cela la protéine est souvent appelée thermolabile. In vitro il a été démontré que la mutation C677T réduit l'activité enzymatique de la protéine MTHFR jusqu'à 70% chez les individus homozygotes (TT) et 40% chez les individus hétérozygotes (CT) [54].

➤ Allèle normal

Séquence génétique : GCG GGA GCC GCC GAT

Séquence protéique : Ala Gly Ala Ala Asp

➤ Allèle muté

Séquence génétique : GCG GGA GCC GTC GAT

Séquence protéique : Ala Gly Ala Val Asp

### 4.3 Autres polymorphismes du gène MTHFR

#### 5. Association entre MTHFR et cancer

Plusieurs études épidémiologiques suggèrent l'implication du métabolisme des folates et ses enzymes dans la modulation du risque de cancer; parmi ces enzymes la MTHFR reste la mieux étudiée. L'allèle C677T du gène *MTHFR* présente un intérêt tout particulier dans ces recherches; l'association entre *MTHFR* et cancer a été examinée dans plusieurs études pour plusieurs cancers. Certaines de ces études ont rapporté que le génotype muté pour l'allèle C677T pourrait conférer une protection contre le cancer, surtout pour le cancer colorectal [55].

#### 6. Polymorphisme C677T de la MTHFR et cancérogenèse colorectale

Le polymorphisme C677T du gène *MTHFR* est celui parmi les polymorphismes des enzymes du métabolisme des folates qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études dans le cadre du cancer du côlon. Dans la plupart des études, les génotypes CT et CC ont été regroupés et comparés au génotype TT. Même si le génotype CT est associé à une diminution de l'activité enzymatique de la MTHFR, cette diminution est beaucoup moins importante qu'en cas de mutation homozygote TT et ne semble donc pas influencer le risque de CCR [56]. La structure schématique du gène et de la protéine MTHFR.

Chapitre II

# Etude pratique

## I. Type de l'étude

Il s'agit d'une étude descriptive, analytique transversale cas-témoins réalisées respectivement au service d'oncologie radiothérapie au CHUC et au laboratoire de recherche de biologie et génétique de la faculté de médecine de Constantine.

Notre étude s'est déroulée en deux étapes :

### *Première étape*

Il s'agit d'une étude rétrospective, descriptive, concernant les dossiers de **95 Patients** atteints d'un adénocarcinome leiberkhunien prouvé histologiquement et traités au service d'oncologie radiothérapie CHUC entre **Janvier 2014 et Mai 2015**. Les caractéristiques épidémiologiques cliniques et histologiques recueillies ont été rapportées et analysé.

### *Deuxième étape*

Il s'agit d'une étude prospective observationnelle, transversale de type cas témoin, de **Mars 2015 à Mai 2015**, incluant une population de **37 sujets** (17 patients atteints d'un adénocarcinome leiberkhunien prouvé histologiquement qui ont été traités au service d'oncologie radiothérapie et 20 témoins présumé sains). L'étude moléculaire a été réalisée au laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire de la faculté de médecine de Constantine.

## II. Méthodologie

### **1. RECRUTEMENT des individus**

L'échantillon de notre étude est subdivisé en deux populations : une population de malades et l'autre de témoins. Des critères d'inclusion et de non inclusion ont été établit pour chacune

#### **Population malade**

L'étude effectuée concerne 17 patients admis au service d'Oncologie radiothérapie du CHUC, Leur sélection a été faite en respectant des critères bien définis.

##### ➤ **Critères d'inclusion**

- Patients atteints d'un adénocarcinome leiberkhunien du rectum prouvé histologiquement
- Age > 18 ans
- En bon état général, (PS < 2) (**Annexe 4**)

- Consentement éclairé

➤ **Critères de non inclusion**

- Patients traités auparavant pour un autre cancer
- Cancers synchrones
- Sujet refusant de faire le prélèvement

### **Population témoins**

C'est une population générale de référence, sujets sains (présumée en bonne santé) et âgé de plus de 18 ans entre 30 et 80 ans. Sélectionnée en nombre de 20.

➤ **Critères d'inclusion**

- Sujets âgés de 30 à 80 ans
- Originaire et demeurant à l'Est algérien
- Sans antécédents de cancer

➤ **Critères de non inclusion**

- Sujets présentant des antécédents personnels d'une maladie néoplasique quel que soit sa localisation

## **2. PRELEVEMENT sanguin**

Le prélèvement sanguin destiné à l'extraction de l'ADN est recueilli à partir du sang total périphérique (5 à 10 ml), dans des tubes vacutainer contenant de l'Ethylene Diamine Tetracetic Acid (l'EDTA) comme anticoagulant.

- ❖ Ces prélèvements ont été réalisés, après avoir eu le consentement du patient, par des infirmiers du service d'oncologie radiothérapie du CHU de Constantine. Un questionnaire comprenant toutes les données épidémiologiques et cliniques a été établi pour la population d'étude. Tous les renseignements nécessaires ont été enregistrés, à partir du dossier médical et de l'interrogatoire avec le patient.
- ❖ L'identification des tubes a été réalisée en mentionnant le nom, le prénom du sujet prélevé, et le service d'oncologie radiothérapie sur les étiquettes des tubes.
- ❖ Les prélèvements ont été conservés à une température de 4° C jusqu'au moment de la réalisation de l'étude.

### 3. Etude moléculaire

#### 3.1 Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée par la méthode utilisant des solvants non organiques (La méthode au Na Cl). L'ADN de chaque sujet a été extrait à partir de leucocytes du sang périphérique.

#### Principe

**a- Préparation des leucocytes :** les leucocytes ont été séparés du sang total par lyse hypotonique des globules rouge selon les étapes suivantes :

- Dans un tube Falcon de 50 ml, mettre le sang et compléter à 30 ml avec du TE (Tris-EDTA) 20:5, laisser 10 mn dans la glace (la composition du tampon d'extraction TE 20:5 est mentionnée dans l'**Annexe 5**).
- Centrifuger 12 mn à 3900 tpm (tours par minute),
- Jeter le surnageant,
- Ajouter quelques ml de TE 20:5 au culot et le remettre en suspension,
- Compléter à 25 ml avec du TE 20:5 et laisser 10 mn dans la glace,
- Centrifuger dans les mêmes conditions,
- Jeter le surnageant pour l'obtention d'un culot leucocytaire.

**b- Extraction de l'ADN :**

- ❖ Transvaser le culot des leucocytes dans un tube Falcon de 15 ml,
- ❖ Ajouter 3 ml de tampon de lyse en dilacérant le culot (la composition du tampon de lyse est mentionnée dans l'**annexe 6**)
- ❖ Ajouter 200 µl de SDS (Sodium Dodécyle Sulfate) à 10 %. C'est un détergent qui possède une action lytique sur les membranes cellulaires, dénature les protéines par destruction de leur structure tertiaire et inhibe l'action des nucléases,
- ❖ Ajouter 100 µl de protéinase K à 10 mg/ml. Cette enzyme dénature et dégrade les protéines,
- ❖ Agiter le tube sur une roue à 27° C pendant une nuit,
- ❖ Le lendemain, refroidir dans la glace 5 mn,

- ❖ Ajouter 1 ml de Na Cl 4M et agiter vigoureusement à la main. L'ADN nucléaire est libéré dans le lysat et les protéines qui lui sont associées sont digérées et éliminées par précipitation au NaCl. La pelote d'ADN est formée dans le surnageant par précipitation avec l'éthanol pur,
- ❖ Remettre 5 mn dans la glace (précipitation des protéines),
- ❖ Centrifuger 12 mn à 3900 tpm,

### 3.2 Géotypage de la MTHFR

Pour la mise en évidence du géotype du polymorphisme C677T de la MTHFR, nous avons utilisé la technique PCR/RFLP qui consiste à la réalisation des étapes suivantes :

- Amplification par PCR (Polymérase Chaîne Réaction).
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour le contrôle du produit PCR (s'assurer qu'il n'y a pas de contamination)
- Digestion du produit de « PCR » par l'enzyme de restriction *HinfI*
- Une migration électrophorétique sur gel d'agarose pour la séparation des produits de PCR
- digestion

#### 3.2.1 l'amplification par PCR

La PCR est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier des séquences d'ADN cibles et définies (l'Amplicon) en plusieurs millions d'exemplaires. La PCR est une réaction en chaîne qui consiste à effectuer *n* cycles successifs d'amplification, au cours desquels deux amorces dirigent l'amplification du fragment d'ADN double brin qu'elles encadrent. Un cycle d'amplification est composé de trois étapes : dénaturation, hybridation et élongation. Après la préparation du mix de la PCR (**Annexe 7**), nous avons pris 49 µl de ce mélange avec 1µl d'ADN pour chaque tube. Ensuite le déroulement des cycles de la PCR a été assuré par le thermocycleur selon les conditions d'amplification suivantes:

- Dénaturation à 94 °C pendant 30 secondes
- Hybridation à 65 °C pendant 30 secondes
- Élongation à 72 °C pendant 30 secondes

#### A. Préparation du milieu réactionnel de la PCR :

Le milieu réactionnel de PCR comprend tous les constituants nécessaires à la réalisation d'une PCR. Pour préparer le milieu réactionnel ou le mix, il faut multiplier la quantité de



chaque composant par le nombre de tubes voulu plus un, ce dernier représente le tube témoin «blanc» dans lequel on avait mis uniquement le mix sans ADN.

➤ **L'enzyme**

La Taq DNA Polymérase (Kit Bioline) est utilisée à une concentration de 5 U/μl. La Taq polymérase est extraite de la bactérie *Thermophilus aquaticus*, elle est thermorésistante, sa température optimale d'action est de 72° C. C'est une enzyme capable d'associer des nucléotides en polymère d'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3'.

➤ **La solution tampon**

On utilise 1 μl de tampon pour un volume final de 10 μl par tube de PCR. Le tampon de la Taq (Kit Bioline) nommé 10X NH4 Réaction Buffer est composé de : 160 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 670 mM Tris- HCL (pH 8,8 à 25° C), 0,1 % stabiliser

➤ **Les oligonucléotides ou dNTP (désoxy-Nucléotides-Tri-Phosphates)**

Les dNTP sont composés de dATP, dTTP, dGTP et dCTP. Ce sont les éléments de bases utilisés par la Taq polymérase pour synthétiser les brins d'ADN complémentaires lors de l'élongation. La concentration de la solution stock est de 25 mM pour chaque base. La concentration finale de chaque base dans la réaction de PCR est de 0,2 mM.

➤ **Le MgCl<sub>2</sub>**

Il s'agit d'un cofacteur pour la Taq polymérase. Il est utilisé à une concentration stock de 50 Mm.

À cela on ajoute :

➤ **Les Amorces**

Sens : 5'-TGAAGGAGAAGGTGTCTGCGGGA-3'

Anti sens : 5'- AGGACGGTGCGGTGAGAGTG-3'

### **B. Le contrôle des produits PCR**

Le contrôle de la PCR s'effectue par une électrophorèse sur un gel d'agarose 2 % additionné (**Annexe 8**). Le gel est déposé sur une plaque d'une cuve horizontale. Dans chaque puits du gel, nous déposons 10 ul d'amplificat en présence de 3 ul du colorant Bleu de Bromophénol (BBP) qui permet de suivre le front de migration.

Parallèlement un échantillon sans ADN (blanc), est inclus dans la série à amplifier et sert de control négatif. Le dépôt se fait du coté cathode et le système est soumis à une migration sous un courant de 60 à 120 volts pendant 30 mn. Après la migration, le gel est soumis au rayon UV. Les molécules de bromure d'éthidium fixées aux ADN émettent une lumière

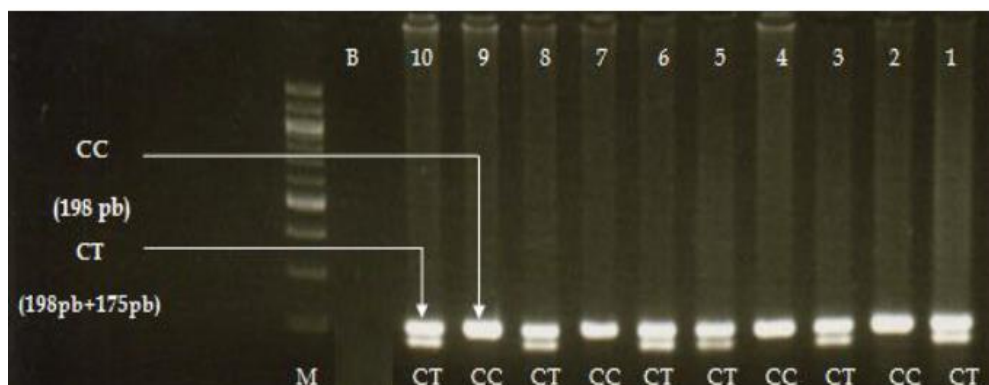
visible et photographiable et permettent de visualiser les fragments amplifiés sous forme de bandes fluorescentes de même taille. Ce control permet aussi de vérifier si une éventuelle contamination de l'ADN est survenue au cours de la PCR grâce au puits contenant le blanc.

### C. Digestion des produits de PCR

Les produits de la PCR sont soumis à une digestion enzymatique par l'enzyme de restriction *HinfI*. Pour cela nous préparons une quantité d'un mix pour digestion selon le nombre des amplificats à être digérés + 1. Ce mix contient un tampon, H<sub>2</sub>O, l'enzyme de restriction *HinfI* et la BSA (Bovine serum albumine) (**Annexe 9**). Nous prenons 10 µl du mix pour digestion et 30 µl du produit de PCR. Le tout est incubé pendant une nuit dans une étuve à 37°C. Après incubation nous concentrons les ADN digérés au speed -vac (System ISS 40-SAranta) pendant quelques minutes.

### 3.2.2 Electrophorèse : Les fragments d'ADN obtenu seront de

- 198 bases en cas d'absence de la mutation et les fragments d'ADN amplifiés et digérés apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote sauvage (CC),
- 175 bases s'il y a mutation et les fragments d'ADN apparaissent sur le profil électrophorétique sous forme d'une seule bande qui correspond au type homozygote muté (TT),
- les deux bandes ensemble de 175 bases et 198 bases, correspondent au type hétérozygote (CT),
- une bande de 23 bases qui ne sera pas visible sur le profil électrophorétique à cause de son intensité trop faible.



**Figure 6 : Profil d'électrophorèse sur gel d'agarose 2% des fragments issus par clivage de *HinfI* présentant différents génotypes de la MTHFR.**

#### 4. ANALYSE statistique

Nous avons procédé à une étude statistique pour déterminer une association entre le polymorphisme de la MTHFR et le cancer du rectum. Notre étude est basée sur l'OR (Odds Ratio) et la P value; ceci se fait par la comparaison du nombre de fois où l'allèle est observé chez les patients par rapport au nombre de fois où il est présent chez les témoins.

- a. **Calcul de l'OR :** pour calculer l'OR nous avons établi un tableau de contingence. Il est présenté sous forme de tableau croisé 2x2. Le statut malade/non malade des sujets de l'étude est présenté en colonne et le caractère exposé/non exposé en ligne.

	Malades	Non-malades	Total
Exposés (Présence du facteur préssumé de risque de maladie)	A	b	a + b
Non-exposés (Absence du facteur préssumé de risque de maladie)	C	d	c + d
Total	a + c	b + d	a + b + c + d

$$OR = \frac{a/b}{c/d}$$

- b. **Calcul de la P value :** le seuil critique a priori est de 0,05 (risque  $\alpha$ ). Si la valeur de p calculée à posteriori est inférieure à ce seuil, la différence entre les paramètres est déclarée statistiquement significative.

### III. Résultats et discussion

#### III.1. Résultats

##### Caracterestiques épidémiologiques

##### Répartition des patients selon l'âge

La moyenne d'âge de nos patients était de **58,41 ans** avec des extrêmes de 22 - 89 ans (figure7). La tranche d'âge la plus concernée était entre 50 et 64 ans (43%),

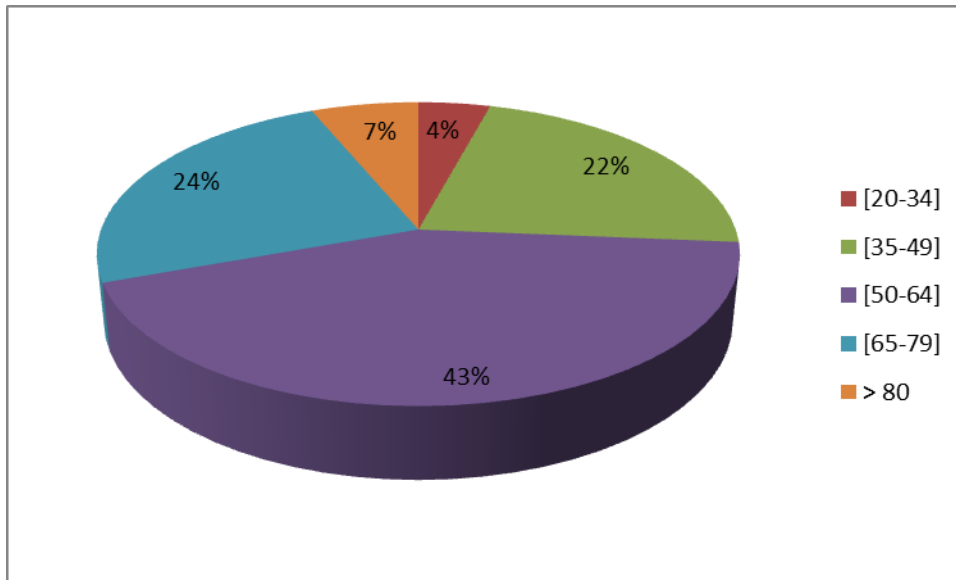


Figure 7 : Répartition des malades par tranches d'âge

### Répartition selon le sexe

Nous avons noté une prédominance masculine, avec un sex-ratio = 1,70 (figure

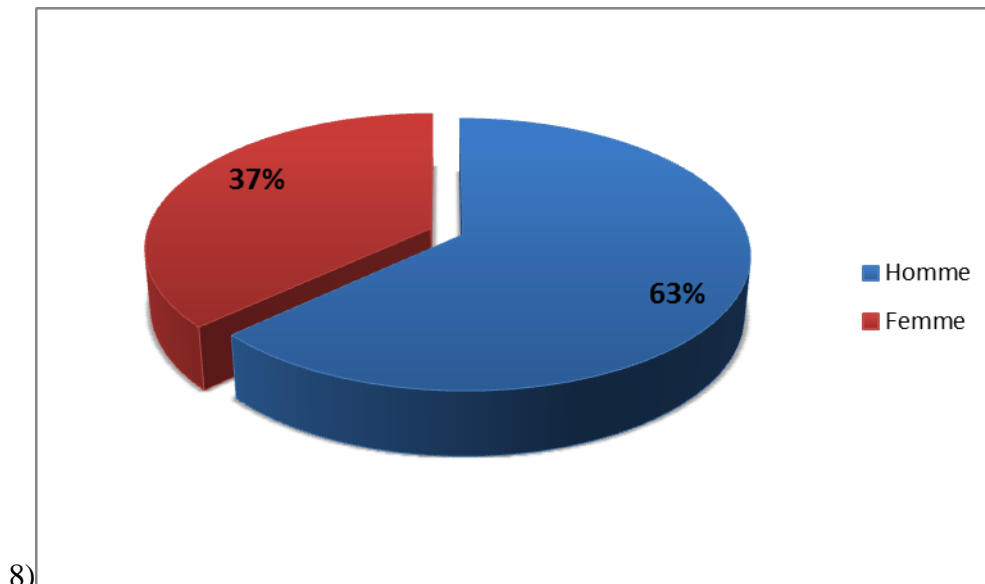


Figure 8 : Répartition des malades selon le sexe

### Répartition selon la wilaya de résidence

La majorité de nos patients résidés à Constantine (21%) suivi de la Wilaya de Mila (13%) (Figure 9).

Tableau II Répartition par wilaya

wilaya	effectifs	pourcentage
Constantine	20	21,05%
Mila	13	13,68%
Guelma	10	10,53%
Skikda	9	9,47%
Annaba	8	8,42%
Jijel	8	8,42%
Taref	6	6,32%
Sétif	5	5,26%
Batna	4	4,21%
Soukahrass	4	4,21%
Ain el baida	2	2,11%
Khanchla	2	2,11%
Colo	1	1,05%
Djelfa	1	1,05%
Messila	1	1,05%
Oum el bouaghi	1	1,05%

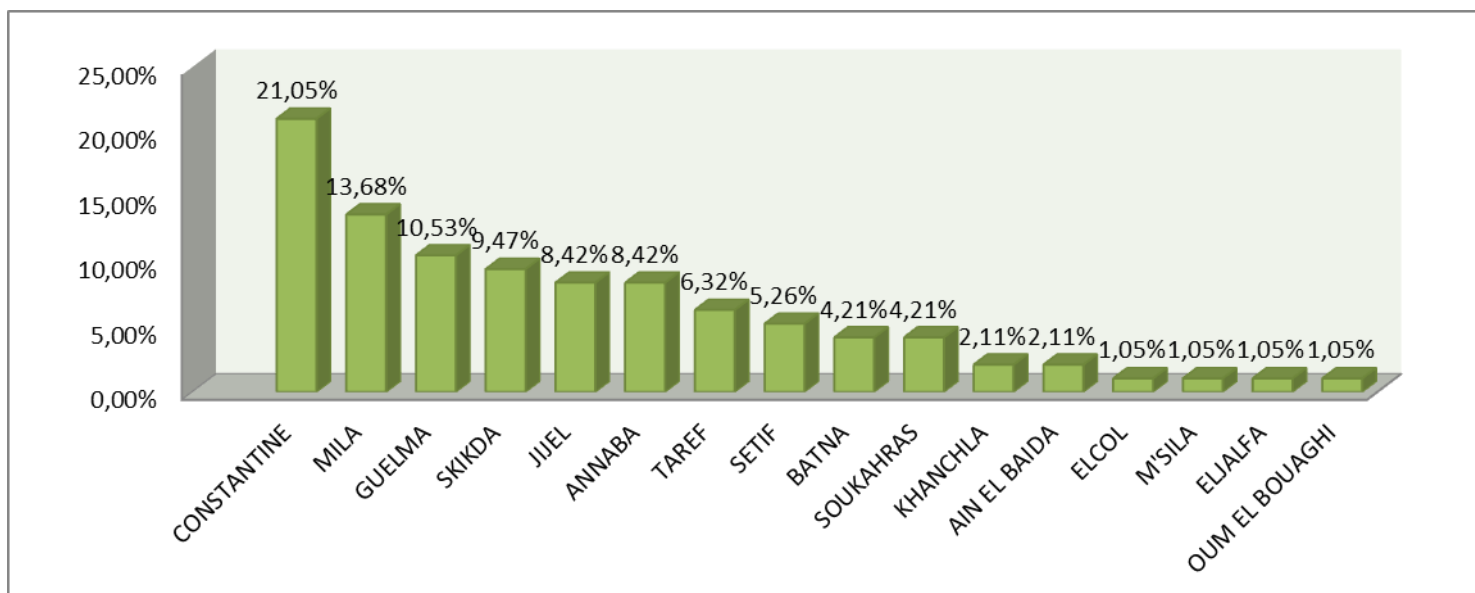


Figure 9 : Répartition par wilaya d'origine

## Répartition en fonction des antécédents

### - *Antécédents personnels*

24 patients présentaient des antécédents de diabète et d' HTA (25,25%)

**Tableau III Répartition des patients selon les antécédents personnels**

	effectifs	Pourcentage
<b>HTA</b>	<b>15</b>	<b>15,78%</b>
<b>DIABETE</b>	<b>9</b>	<b>9,47%</b>

### - *Antécédent familiaux*

Les antécédents familiaux de cancer étaient présents chez 12 % de nos patients. Les cancers digestifs représentaient 9,47 %.

**Tableau VI : Répartition des patients selon les antécédents familiaux**

	effectifs	Pourcentage
<b>Cancers digestifs</b>	<b>3</b>	<b>3,15%</b>
<b>Autres Cancers</b>	<b>9</b>	<b>9,47%</b>

## Caractéristiques cliniques

### Répartition selon le siège de la tumeur

Dans notre série, le cancer du bas-rectum a été la forme anatomique la plus fréquente (49%). La localisation de la tumeur au niveau du moyen rectum restait considérable (38%), ainsi que celles du haut rectum qui a été retrouvé dans 13% (figure 10).

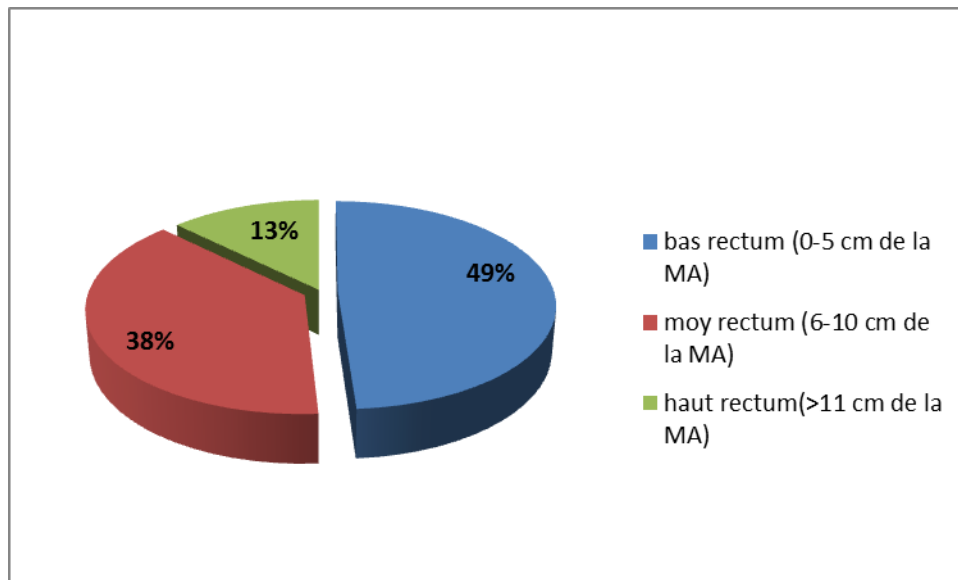


Figure 10 : répartition selon le siège de la tumeur

### La répartition selon le délai de diagnostic

La durée moyenne entre le début des symptômes et le diagnostic histologique était de 7,17 mois avec des extrêmes de 1 mois et 24 mois.

### Répartition selon la symptomologie clinique

Les rectorragies représentaient le symptôme clinique prédominant (59%), suivi de syndrome rectal 25% puis les douleurs pelviennes dans 16% des cas (figure11).

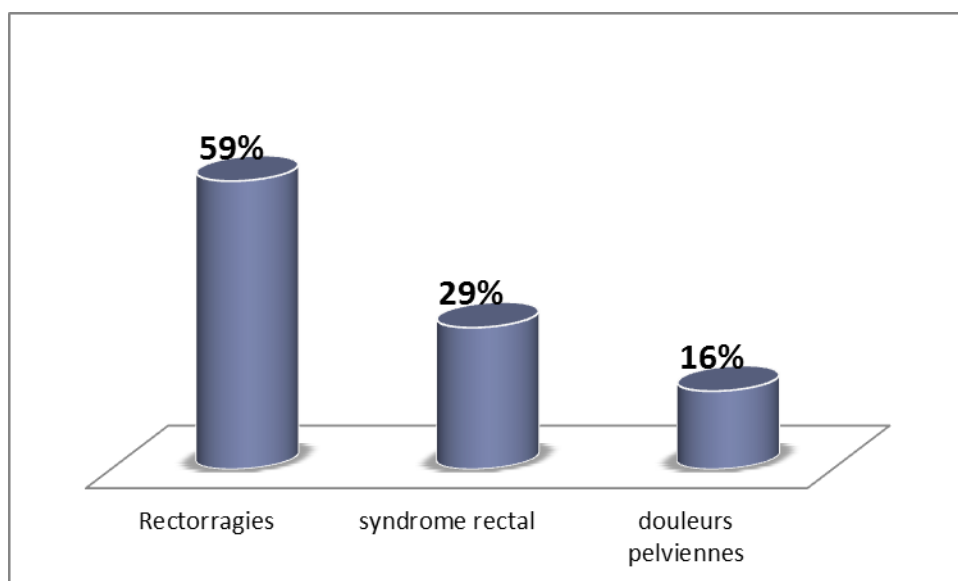


Figure 11 : les symptômes révélateurs du cancer du rectum

### **III. 2 Discussion**

Dans notre série, on constate que le cancer colorectal apparaît à un âge plus précoce que celui rapporté dans la littérature. En effet, l'âge moyen au diagnostic est inférieur d'une dizaine d'années par rapport à l'âge moyen dans la littérature occidentale, il est de 58,41 ans dans notre série alors que celui-ci est situé entre 65 et 75 ans dans la littérature occidentale [57]. Une étude rétrospective réalisée par K. Bouzid et al. Sur une série de 1186 patients porteurs d'un cancer colorectal admis au service d'oncologie médicale du centre de Pierre et Marie Curie à Alger entre l'année 1994 et 2002, a trouvé un âge moyen voisin de celui de notre série (55 ans). Dans une étude rétrospective tunisienne menée par S.Tebra Mrad et al [58], portant 165 cas de cancer du rectum colligés et traités au service de radiothérapie du CHU Sousse entre 1995 et 2004, l'âge moyen au moment du diagnostic était de 56 ans.

Dans notre étude il apparaît une nette prédominance du sexe masculin avec un sex-ratio de 1,7 en faveur des hommes. Cette prédominance masculine a été rapportée par la littérature aussi bien dans la plupart des séries internationales comme celle de Belot A et al [59], par contre le registre d'Oran a enregistré une légère prédominance féminine [60].

Dans l'étude marocaine réalisée par Benseddik [61], ainsi que dans notre série, le cancer du bas rectum représentait la forme anatomique la plus fréquente 49%. Cependant selon l'étude réalisée par Boumedien et al [62], en Algérie la forme la plus fréquente et celle du cancer de moyen rectum (45%).

La symptomatologie clinique prédominante a été représentée par les rectorragies dans 59% des cas. L'étude Tunisienne réalisée par S.Tebra Mrad [58], a observé également la prédominance des rectorragies dans 75% des cas. Dans l'étude Marocaine de Abid et al [63], Les 3/4 des patients atteints d'un cancer du rectum présentaient des rectorragies.

Le polymorphisme C677T du gène de la *MTHFR* est parmi les polymorphismes des enzymes du métabolisme des folates qui a fait l'objet du plus grand nombre d'études dans la pathologie cancéreuse colorectale. Dans la plupart des études, les génotypes CT et CC ont été regroupés et comparés au génotype TT. Même si le génotype CT est associé à une diminution de l'activité enzymatique de la *MTHFR*, cette diminution est beaucoup moins importante qu'en cas de mutation homozygote TT et ne semble donc pas influencer le risque de CCR.

Dans notre travail nous avons essayé d'étudier la relation entre la mutation C677T de la *MTHFR* et le cancer colorectale. Cette étude a porté sur 17 prélèvements sanguins. Elle s'est déroulée en deux étapes, l'extraction d'ADN suivie d'une étape de PCR. Malheureusement nous n'avons pas obtenu des résultats concernant l'étude du polymorphisme du gène C677T de la *MTHFR* parce que nous avons rencontré un problème technique au niveau du



laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire. Nous avons procédé aux résultats du travail qui a été réalisé par le Dr K. Boudaoud et ses collaborateurs.

Dans l'étude Algérienne réalisée par K. Boudaoud et al [25], incluant 43 patients atteints du cancer du rectum localement avancé, le génotypage homozygotes CC représente une 37,2% qui était similaire au résultats de l'étude française publié dans le British Journal of Clinical Pharmacology [64], en 2009 ou le génotype CC représentait 37,6%. Cette fréquence était plus élevée que celle de l'étude publiée par Salvatore [65], en 2006 qui a trouvé une fréquence de 33%. Une autre étude Américaine [66] publiée en 2011, a trouvé une fréquence plus élevée de 45,8% pour le même génotype.

Pour l'hétérozygote CT, K. Boudaoud a trouvé une fréquence de 39,5% qui était moins élevée que celles retrouvée dans les études de salvatore en 2006 et l'étude française en 2009 et l'étude américaine de 2011 les fréquences sont est respectivement 46%,49,5% et 45,03%.

Pour la mutation TT, Boudaoud et salvatore ont trouvé des fréquences proches qui sont respectivement 20,9 % et 22 %. Alors que les deux études américaine et française ont trouvé des fréquences similaires et qui étaient inférieurs aux deux précédentes, respectivement (9,16 % et 11,9 %). Après une comparaison entre ces études nous constatons que les fréquences correspondant aux génotypes CT, CC, TT présente le même ordre décroissant respectivement. La majorité des études ainsi que deux méta-analyses ont trouvé que la réduction du risque du cancer colorectal est associée au variant homozygote TT [67] [68] [69] [70] [71].

En 2009 la méta-analyse menée par Taioli et al, indiquent que, dans l'Asie le génotype 677TT disposait d'une réduction significative du risque [72].

L'étude de N Matevska a trouvé une association inverse statistiquement significative entre l'allèle MTHFR T (35,35% pour les patients et 41,35% pour les témoins) l'odds ratio (OR) 0.776; avec un interval de confiance 95% (95% CI) 0.603-0.997;  $p = 0.047$ ) [73]

## Conclusion

L'identification des gènes de prédispositions dans les maladies complexes comme le cancer est un défi pour la génétique, mais la difficulté principale est l'intégration aux analyses de la contribution des facteurs environnementaux en particulier de l'alimentation.

Depuis la découverte en 1995 de la mutation C677T du gène MTHFR, de nombreuses études ont permis de mieux comprendre les relations complexes existant entre les polymorphismes de la MTHFR et la cancérogenèse colorectale.

Dans notre étude on s'est intéressé à trouver un lien possible entre un facteur génétique qui est la mutation C677T de la MTHFR et le cancer du rectum.

Suite aux résultats des études obtenus nous avons observé que l'association entre la mutation C677T du gène de la MTHFR et le risque de la survenue du cancer colorectal est controversée. Nos résultats ouvrent des perspectives intéressantes à travers l'étude moléculaire sur le plan de recherche fondamentale pour l'association entre la MTHFR et les CCR.

En perspectives :

- une étude approfondie incluant une population plus large qui sera réalisée en Algérie afin d'étudier la relation entre le polymorphisme de gène MTHFR et CCR.

## Références

- [1] D. Hammouda ; N. Aït-Hamadouche; M. Afiane et al , Enquête nationale sur l'incidence et la prévalence des cancers,registre du cancer Algerie;INSP 2002.
- [2] L. Peyrin-Biroulet, H. Barraud, D.Ancel, F. Petit-Laurent,et al; Métabolisme des folates et cancérogène colorectale Gastroenterol Clin Biol;28:582-592,2004.
- [3] Su LJ, Arab L. Nutritional status of folate and colon cancer risk:evidence from NHANES I epidemiologic follow-up study. Ann Epidemiol;11:65-72,2001.
- [4] Pr Ph.CHAFFANJON, Université Joseph Fourier de Grenoble,Rectum et canal anal, 2012
- [5] H.Rouvière,Anatomie humaine descriptive,topographique et fonctionnelle. Paris: Masson;. p. 421–431, 1974.
- [6] S.Rivera. ; A.Toledano ; F.Mornex ; la radiothérapie de cancer de rectum ; 2009
- [7] K.Sato,T. Sato,The vascular and neuronal composition of the lateral ligaments of the rectum and the rectosacral fascia. Surg Radiol Anat;13:17–22,1991
- [8] Cancers info,les traitements du cancer du rectum,2010
- [9] M. J.Hill, B.C;Marson, H.J.Bussey, Aetiologie of adenoma-carcinoma sequence in large bowel. Lancet 1: 245-247, 1978
- [10] J.Ferlay,F.Bray,P.Pisani, DM « Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. IARC Cancer Base N° 5 » GLOBOCAN 2002.
- [11] Hammouda ; N. Aït-Hamadouche; M. Afiane; A. Bouhadef Enquête nationale sur l'incidence et la prévalence des cancers INSP Alger 2002.
- [12] J.Viguier,P.Bourlier,D. Karsenti,et al. « Cancer du côlon » Encycl méd Chir, Gastro-entérologie, 9-068-A-10, 18 p,2003.
- [13] Potter, J. D, "Colorectal cancer: molecules and populations." J Natl Cancer Inst 91(11): p 916--32, 1999.
- [14] G.Howe, E.Benito, R.Castellato, Dietary intake of fiber and decreased risk of cancer of the colon and rectum: Evidence from combined analysis of 13 cases control studies, J Natl Cancer inst, 1992, 84, 1987, 1896
- [15] A.Rullier et al,Which classification for pathological assesement of tumor response after preoperative treatment for rectal carcinoma, European Society of Coloproctology,24-27, Nantes, France. Colorectal Dis ; 10(abstract), September 2008.
- [16] Cancer colorectal : guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.1

- [17] Cancer colorectal : guide pour les patients – Basé sur les recommandations de l'ESMO – v.2013.1
- [18] C.D.Gillen, R. S. Walmsley, et al. "Ulcerative colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis." *Gut* 35(11): 1590,1994.
- [19] P. Boyle, M. Tubiana; P. AUTIER et al, Les Causes du cancer en France Nouvelles données scientifiques RAPPORT.
- [20] J.Groden, A. Thliveris, et al, "Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene." *Cell* 66(3) ; 589-6002,1991
- [21] M. EL-Haouari, Evaluation de la technique comportant la résection totale du mésorectum (TME) dans le traitement chirurgical du cancer du rectum, Centre Anti-Cancer de BLIDA, Hôpital Frantz-Fanon.
- [22] AM.Benhamiche, Cancer du côlon : épidémiologie descriptive et groupes à risque élevé *Gastroenterol Clin Biol* ; 22 (suppl 3 bis) : S3 – S11 ;1998.
- [23] J.Viguiet, P.Bourlier, D.Karsenti, et al, Cancer du côlon *Encycl méd Chir, Gastro-entérologie* , 9-068-A-10, 18 p, 2003
- [24] J.Chir, Carcinogénèse colorerctale : mécanismes génétiques et épigénétiques de la progression tumorale et classification moléculaire des cancers colorectaux »
- [25] K.Boudaoud, S. Taleb, A, Brihmat, T. Filali et al, l'étude des polymorphismes du gène de la Méthylène tétrahydrofolate Réductase (MTHFR) et leur impact sur la tolérance et l'efficacité thérapeutique des fluoropyrimidines associés à la radiothérapie néoadjuvante chez des patients ayant un cancer du rectum localement avancé. *JAM*, V XXII, N°5 ( septembre-octobre 2014; P 16-21
- [26] J.F. Seitz, G. Houvenaeghel, L. Dahan, Tumeurs du colon et du rectum (148) Juin 2005 (mise à jour 2006-2007)
- [27] les traitements du cancer du rectum, collection guide de références cancer info, INCa, juillet 2010
- [28] P.Lasser, Cancer du rectum. *Encycl Méd Chi, gastro-neurologie*, 9-084-A-10, 23P, 2000
- [29] C.Lengauer, KW.Kinzler, B.Vogelstein, Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396:643-9, 1998.
- [30] M. Ferron ,F. Praz, M. Pocard, The genetics of colorectal cancer, p602-607, décembre 2005
- [31] Carcinogénèse colorerctale : mécanismes génétiques et épigénétiques de la progression tumorale et classification moléculaire des cancers colorectaux » *J Chir* 2007

- [32] V.BOIGE,D.MALKA, J.TAÏEB,Cancer colorectal : altérations moléculaires pronostiques,Gastroenterol Clin Biol;28:21-32,2004
- [33] Bertario. L, Russo. A, Sala. P, et al. Gentye and phenotype factors as determinants of desmoid tumors in patients with familial adenomatous polyposis » Int J Cancer 2001
- [34] M. Ferron, F. Praz, M. Pocard. The genetics of colorectal cancer, pages 602-607 (décembre 2005)
- [35] Haffen. C ; surface luminale d'un polype vilieux au niveau du colon ; inserm ; janvier 2012
- [36] B. Buecher, D. Molière, A.De Pauw .New trends in hereditary colorectal cancers. Springer-Verlag France 2009
- [37] Frattini. M, Balestra. D, Suardi. S et al, Different genetic features associated with colon and rectal carcinogenesis. Clin Cancer Res 10:4015-21. (2004)
- [38] Kinzler. KW, Vogelstein. B , Lessons from hereditary colorectal cancer. Cell 87:159-70, (1996).
- [39] Jass. JR, HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. Fam Cancer 3:93-100. (2004)
- [40] COTTE E, LIFANTE JC, et al. Amputation du rectum par voie périnéale pure avec colostomie coelio-assistée : une option palliative pour les cancers du bas rectum ou de l'anus chez le sujet âgé ou multitaré. Ann Chir; 131 : 100-3. 2006
- [41] Miner. SE, Evroski. J, Cole. DE ; Clinical chemistry and molecular biology of homocysteine metabolism,,: an update. Clin Biochem. 30 : 189-201, 1997
- [42] Rozen. R ; Methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphism – clinical implications. New York : Taylor and Francis Group. DOI : 10.1081/E-EDGP-120030861.2005.
- [43] FROSST. P., BLOM. H., MILOS. R., et al, candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. Nature Genet,1995
- [44] SAFFROY. R., LEMOINE. A., DEBUIRE. B. MTHFR 5,10Methylenetetrahydrofolate reductase. Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol,2005.

- [45] LORENZO. D., BOTTO. D, YANG. Q, 5, 10-Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) Gene Variants and Congenital Anomalies. *Epidemiol May*; 1;151(9):862-877, 2000.
- [46] GOYETTE. P., PAI. A., MILOS. R., FROSST. P, et al, Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Springer New York,2004.
- [47] GOYETTE P., PAI A., MILOS R., FROSST P., TRAN P., CHEN Z., CHAN M., ROZEN R. Gene structure of human and mouse methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR). Springer New York,2004..
- [48] HOMBERGER. A., LINNEBANK. M., WINTER. C., WILLENBRING H. et al. Genomic structure and transcript variants of the human methylenetetrahydrofolate reductase gene. *European Journal of Human*
- [49] Franco. RF, Morelli. V, Lourenço. D, et al. A second mutation in methylenetetrahydrofolate reductase gene and the risk of venous thrombotic disease. *British Journal of Haematology* 1999; 105(2): 556-559.
- [50] ROBIEN K. , CORNELIA M. , ULRICH C. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk. *Epidemiol* 157 (7) :571-82, 2003.
- [51] ROBIEN. K, CORNELIA. M, ULRICH C. 5, 10-Methylenetetrahydrofolate Reductase Polymorphisms and Leukemia Risk. *Epidemiol* 157 (7) :571-82, 2003.
- [52] CORTESE. C., MOTTI. C, MTHFR gene polymorphism, homocysteine and cardiovascular disease. *Public Health Nutrition* Volume 4: Issue 2(B): Copyright Nutrition Society, 2001.
- [53] CASSANDRA. L, KNIFFIN. A. 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase; mthfr. *omin* 2002.
- [54] GOYETTE P., SUMNER J., MILOS R., DUNCAN A., ROSENBLATT D., MATTHEWS R., ROZEN R. Human methylenetetrahydrofolate reductase: isolation of cDNA, mapping and mutation identification. *Nature Genet* 7: 195-200,1994.
- [55] Ma J, Stampfer M. J., Giovannucci E et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer.*Cancer Res.*, 57: 1098-1102, 1997
- [56] L. PEYRIN-BIROULET, H. BARRAUD, D. ANCEL, et al ; Métabolisme des folates et cancérogenèse colorectale ; *Gastroenterol Clin Biol* 2004;

- [57] Boutron. R, **Laurant** Puig P. Épidémiologie, cancérogène, facteurs de risque, prévention et dépistage du cancer colorectal. Traité de gastro-entérologie. Deuxième édition Flammarion.: 538 – 550, 2005.
- [58] Tebra Merad S, Harrabi I, Beljouza S, et al, Le cancer du rectum dans le centre de la Tunisie : à propos de 165 cas. Annales de Chirurgie; volume 131 : 104 – 111, 2006.
- [59] Belot A et al. Cancer incidence and mortality in France over the period: 1980-2005. Revue d'Épidémiologie et de Santé Publique, 56:159–175, 2008.
- [60] Fouatih Z et al. The cancer registry of Oran. Ten years of registration: 1996–2005. Oran, University of Oran, Faculty of Medicine, 2008
- [61] Benseddik. N, Les aspects épidémiologiques des cancers colorectaux (A propos de 116 cas) maroc 2008. Service d'Hépatogastroentérologie. CHU Hassan II. Fès – thèse n°060/08
- [62] BOUMEDIENE. M, BAHRI. F, Cancer du rectum, 2013/2014-
- [63] Abid I, Ali Benamara F, Bouaza A, Lachouri A, Les cancers colorectaux : à propos de 269 cas. Santé Maghreb. Com
- [64] Marie-Christine Etienne-Grimaldi,<sup>1</sup> Gérard Milano,& al, Methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene polymorphisms and FOLFOX response in colorectal cancer patients; British Journal of Clinical Pharmacology 1365-2125.2009.
- [65] Salvatore Terrazzinoa, Marco Agostinib, Salvatore Pucciarellib,& al; A haplotype of the methylenetetrahydrofolate reductase gene predicts poor tumor response in rectal cancer patients receiving preoperative chemoradiation ; Pharmacogenetics and Genomics, Vol 16 No 11 ; 818-824, 2006.
- [66] F Thomas<sup>1,2</sup>, A A Motsinger-Reif<sup>1,3,4</sup>, J M Hoskins<sup>1</sup>,& al; Methylenetetrahydrofolate reductase genetic polymorphisms and toxicity to 5-FU-based chemoradiation in rectal cancer British Journal of Cancer 105, 1654–1662, 2011.
- [67] Ma J, Stampfer MJ, Giovannucci E, Artigas C, Hunter DJ, Fuchs C, Willet WC, Selhub J, ennekens CH, Rozen R. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism, dietary interactions, and risk of colorectal cancer. Cancer Res; 57(6): 1098-1102, 1997
- [68] Chen J, Giovannucci E, Kelsey K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase polymorphism and the risk of colorectal cancer. Cancer Res; 56(21): 4862-4864, 1996.
- [69] Yin G, Kono S, Toyomura K, et al. Methylenetetrahydrofolate reductase C677T and A1298C polymorphisms and colorectal cancer: the Fukuoka Colorectal Cancer Study. Cancer Sci; 95(11): 908-913, 2004

- [70] Hubner RA, Houlston RS. MTHFR C677T and colorectal cancer risk: A meta-analysis of 25 populations. *Int J Cancer*; 120(5): 1027-1035, 2007.
- [71] Huang Y, Han S, Li Y, Mao Y, Xie Y. Different roles of MTHFR C677T and A1298C polymorphisms in colorectal adenoma and colorectal cancer: a meta-analysis. *J Hum Genet.*; 52(1): 73-85, 2007.
- [72] E. Taioli, M. A. Garza, Y. O. Ahn et al., “Meta-and pooled analyses of the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism and colorectal cancer: a HuGE-GSEC review,” *American Journal of Epidemiology*, vol. 170, no. 10, pp. 1207–1221, 2009.
- [73] N Matevska, T Josifovski, A Kapedanovska, Z Sterjev, Z Serafimoska, M Panovski, N Jankulovski, N Petrusevska, B Angelovska, G Petrusevska1 / L Suturkova, A Dimovski



# *Annexes*

## Annexe 1 : tableau II : La Classification des lésions rectales précancéreuses

### LESIONS NON POLYPOIDES

- Cryptes aberrantes (Aberrant Crypt Foci)
- Adénome plan
- Néoplasie intra-épithéliale associée au MICI

### LESIONS POLYPOIDES

- Adénome classique
  - tubulaire
  - tubulo-villeux
  - villeux

- Polypes festonnés sans prolifération
- 1.3** Polype hyperplasique avec prolifération anormale
- 1.4** Adénome sessile festonné
- 1.5** Adénome festonné traditionnel
- 1.6** Polype mixte hyperplasique / adénomateux
- DALM\* associées aux MICI
- Lésions précurseurs dans les conditions héréditaires
- 1.7** adénome (dans le cadre de la PAF, HNPCC)
- 1.8** syndrome de Peutz-Jeghers
- 1.9** polypose juvénile/ polypose hyperplasique

## Annexe 2 : classification TNM

### Tumeur primitive (T)

**Tis** Carcinome in situ : tumeur intra-épithéliale ou envahissant la lamina propria (intra-muqueuse) sans extension à la sous-muqueuse à travers la muscularis mucosae

**T1** La tumeur envahit la sous-muqueuse sans la dépasser

**T2** La tumeur envahit la musculature sans la dépasser

**T3** La tumeur envahit, à travers la musculature, la sous-séreuse sans atteinte du revêtement mésothélial et le tissu péricolique non péritonéalisé ou le tissu périrectal

**T4** La tumeur perce le péritoine viscéral et/ou envahit les organes de voisinage

### Ganglions régionaux (N)

**N0** Absence de métastase ganglionnaire régionale

**N1** Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux

**N2** Métastase dans 4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

**Nx** Statut ganglionnaire non évaluable

### Métastases (M)

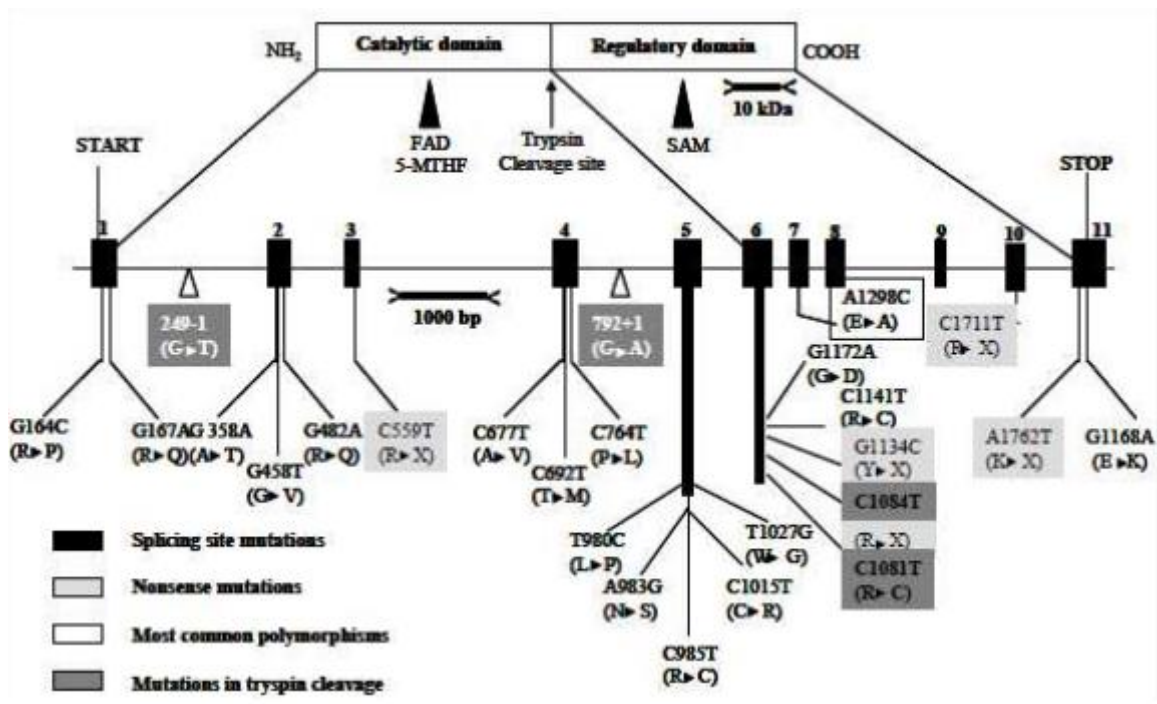
**M0** Pas de métastases

**M1** Présence de métastases (l'atteinte des ganglions iliaques externes ou iliaques communs est considérée comme M1)

**Mx** Statut métastatique inconnu

<b>STADE 0</b>	Tis	N0	M0
<b>STADE I</b>	T1	N0	M0
	T2	N0	M0
<b>STADE II</b>	T3	N0	M0
	T4	N0	M0
<b>STADE III</b>	Tout T	N1-	M0
<b>STADE IV</b>	Tout T	Tout N	M1

### Annexe 3 : Structure schématique du gène et de la protéine



### Annexe 4

PS c'est l'indicateur le plus simple et le plus rapide pour juger de l'état d'autonomie d'une personne (très utilisé en particulier en cancérologie)

**O.M.S. 0:** personne normale – activité physique intacte – efforts possibles sans limitation

**O.M.S. 1:** réduction des efforts – autonomie complète

**O.M.S. 2:** personne encore autonome – se fatigue facilement – nécessité de se reposer plus de 6 heures / jour

**O.M.S. 3:** personne dépendante – lever possible – ne fait pas sa toilette seul

**O.M.S. 4:** dépendance totale – état quasi grabataire

## **Annexe 5 : la composition du tampon d'extraction TE 20:5**

**TE 20 :5 : (Tris 20 mM, EDTA 5 mM, pH 7.5) auto clivé**

- Tris : 2,422 g/l
- EDTA : 1,86 g/l
- Ajuster le pH avec HCL 1 N

## **Annexe 6 : Tampon de lyse**

- NaCl 400 Mm
- EDTA 2 Mm
- Tris 10 Mm
- pH 8,2

## **Annexe 7 : préparation du milieu réactionnel de la PCR pour MTHFR**

- MIX Pour un nombre x D'ADN
- H2O - 35,2 µl
- Tampon 10 X sans mg c12 -5 µl
- Dntp 2niM – 5 µl
- MgC12 25 Mm (1,5 Mm) 3 µl
- Oligo F (100 pmol/ µl) 0,2 µl
- Oligo R (100pmol/ µl) 0,2 µl
- Taq polymérase 0,4 µl

## **Annexe 8 : Préparation des gels d'agarose**

Pour le contrôle PCR: 1, 5 g d'agarose + 100 ml TBE iX + 10 pi BET (Bromure d'Ethidium)

Pour la digestion: 3 g d'agarose + 100 ml TBE iX + 10 pi BET

### Dépôts des échantillons

- 15 µl de produits de digestion +2 à 3 µl de Bleu de promophénol
- 3 pi de marqueur (PM 20pb LADDER ref.0 18206) + 2 à 3 µl de Bleu Bromophénol.

## Annexe 9 : Préparation du milieu de digestion par l'enzyme Hinf I

- 5 µl du tampon.
- 1 µl de l'enzyme de restriction HinfI.
- 4 µl de l'eau distillé.
- 0.2 µl de bovine sérum albumine

## Annexe 10 : Fiche de renseignements

Date du questionnaire : \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_ \_ \_/

Service

OM

RT

Numéro du dossier: \_\_\_\_/\_\_\_\_/

Initiales de la patiente \_\_\_\_/\_\_\_\_/

Sexe

F

M

Age

poids

taille

Profession :

lieu de naissance :

Adresse :

Tel :

Situation familiale

M

C

D

V

Date de la consultation: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/

ATCD personnel :

Tabac:

A

P

Alcool :

positif

negatif

ATCD familiaux:

**Les circonstances de découverte :**Fortuite Signes cliniques **Signes cliniques :**Rectorragies Douleurs Troubles du transit Anémie Altération de l'état général occlusion intestinale **Aspect de la tumeur :**Ulcéro-végétant bourgeonnant infiltrant **Taille de la tumeur :****Siège de la tumeur :**

Haut rectum

Moyen rectum 

Bas rectum

**Diagnostic de certitude :**

Biopsie endoscopique

Biopsie chirurgicale

Exérèse

**Type histologique (différenciation) :****Bien****Moyennement****Bas****Classification TNM :****T****N****M****Traitement :****Chirurgie****Radiothérapie post opératoire****Radio chimiothérapie concomitante préopératoire****pTNM :**

pT

pN

pT

**Date du prélèvement :** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_



## Résumé

La variation géographique importante de l'incidence du cancer colorectal dans le monde, est influencée par le mode de vie des populations, le type d'alimentation et la prédisposition héréditaire. Il survient souvent de manière sporadique et il ne s'agit d'une affection héréditaire que dans 5% des cas. Certaines voies métaboliques sont considérées comme facteurs de risque qui sont fortement corrélées à cette maladie. Le rôle des folates dans la prévention de la carcinogenèse est fortement suspecté. La MTHFR est une enzyme clé qui catalyse la conversion du 5,10 méthylènetetrahydrofolate en 5, méthyltetrahydrofolate, et qui assure le cycle des folates et permet à l'homocystéine d'être reméthylée en méthionine et d'être épurée de l'organisme. La mutation du gène C677T de la MTHFR qui est la plus fréquente est reconnue dans quelques études comme étant un facteur de risque de cancer du rectum. Notre travail a pour objectif de faire une mise au point du cancer rectale en général et sa prise en charge biologique de façon particulière est d'explorer l'impact du polymorphisme de la mutation C677T de la MTHFR sur la survenue du cancer du rectum.

### Patients et méthodes

Dans une première partie nous avons essayé d'étudier les caractéristiques épidémiologiques, et cliniques des patients atteints du cancer du rectum traités au service d'oncologie radiothérapie du CHUC. Nous avons également réalisé un prélèvement du sang total périphérique de 37 sujets (17 patients et 20 sujets présumé sains) afin d'étudier le polymorphisme du gène C677T de la MTHFR et de déterminer sa relation dans la survenue du cancer du rectum. Cette étude a été réalisée au laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire de la faculté de médecine de Constantine.



### الملخص

التباين الجغرافي يلعب دور كبير في الإصابة بسرطان القولون والمستقيم في العالم، ويتأثر بأسلوب حياة الناس، ونوع النظام الغذائي والاستعداد الوراثي. في كثير من الأحيان يحدث بشكل عرضي و لا يكون وراثيا الا في 5% من الحالات. وتعتبر المسارات الأيضية من بعض عوامل الخطر التي ترتبط بقوة مع المرض. ويشتهر بقوة دور حمض الفوليك في الوقاية من السرطان.

MTHFR هو الأنزيم الرئيسي الذي يحفز تحويل 5،10-الميثيلين تتراهيدروفولات إلى 5، ميثيل تتراهيدروفولات، والذي يضمن دورة حمض ويسمح للهوموسيسيتين ان يتحول الى ميثونين.

ان الطفرة الوراثية C667T في الجين المسؤول عن تكوين الانزيم MTHFR هي الاكثر شيوعا و هي معروفة في بعض الدراسات كعامل خطر لسرطان المستقيم. ويهدف عملنا لدراسة سرطان المستقيم بشكل عام والتكفل البيولوجي به بطريقة خاصة و هو استكشاف تأثير تعدد الأشكال من طفرة C667T في حدوث سرطان المستقيم.

### المرضى والطرق

في الجزء الأول حاولنا دراسة التجارب الوبائية، والسرييرية للمرضى الذين يعانون من سرطان المستقيم الذين تم علاجهم على مستوى مستشفى قسنطينة. أجرينا أيضا اخذ عينة كاملة من الدم ل 37 شخصا (17 مريضا و 20 الأصحاء) لدراسة الجينات وتحديد علاقتها مع حدوث سرطان المستقيم. وقد أجريت هذه الدراسة في مختبر أبحاث علم الأحياء وعلم الوراثة الجزيئية في كلية الطب في قسنطينة.

## Abstract

### **Risk of colorectal cancer associated with the methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism**

The significant geographical variation in the incidence of colorectal cancer in the world is influenced by the lifestyle of people, the type of diet and hereditary predisposition. It often occurs sporadically and it is an inherited disease just in 5% of cases. Some of metabolic pathways are considered as risk factors that are strongly correlated with the disease. The role of folat in the prevention of carcinogenesis is strongly suspected. MTHFR is a key enzyme which catalyses the conversion of 5,10-methylenetetrahydrofolate to 5, methyltetrahydrofolate, and which ensures the folate cycle and allows the homocystrein be remethyle methionine and be purified from the organism. The mutation of the C677T MTHFR gene, which is the most common, is known in some studies as a risk factor of rectal cancer. Our work aims to make development of rectal cancer in general and taking biological load in a particular way is to explore the impact of polymorphism of MTHFR C677T mutation of the occurrence of rectal cancer.

#### **Patients and methods**

In the first part we tried to study the epidemiological, and clinical characteristics of patients with rectal cancer treated with radiotherapy oncology CHUC. We also conducted a sample of whole blood device 37 subjects (17 patients and 20 healthy subjects presumed) to study the polymorphism of MTHFR C677T gene and determine its relationship to the occurrence of rectal cancer. This study was conducted in the laboratory of biology and Molecular Genetics research of the Faculty of Medicine of Constantine

**Key words:** rectal cancer, MTHFR, polymorphism, mutation C677T .

<b>Année Universitaire : 2014-2015</b>	<b>Présentée par MECILI Ikram et BOUSSEHABA Louiza</b>
<b>Risque de cancer du rectum associé au polymorphisme du gène MTHFR C667T</b>	
<b>Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master 2 en Génétique moléculaire</b>	
<p>La variation géographique importante de l'incidence du cancer colorectal dans le monde, est influencée par le mode de vie des populations, le type d'alimentation et la prédisposition héréditaire. Il survient souvent de manière sporadique et il ne s'agit d'une affection héréditaire que dans 5% des cas. Certaines voies métaboliques sont considérées comme facteurs de risque qui sont fortement corrélées à cette maladie. Le rôle des folates dans la prévention de la carcinogenèse est fortement suspecté. La MTHFR est une enzyme clé qui catalyse la conversion du 5,10 méthylènetetrahydrofolate en 5, méthyltetrahydrofolate, et qui assure le cycle des folates et permet à l'homocystéine d'être reméthylée en méthionine et d'être épurée de l'organisme. La mutation du gène C677T de la MTHFR qui est la plus fréquente est reconnue dans quelques études comme étant un facteur de risque de cancer du rectum. Notre travail a pour objectif de faire une mise au point du cancer rectale en général et sa prise en charge biologique de façon particulière est d'explorer l'impact du polymorphisme de la mutation C677T de la MTHFR sur la survenue du cancer du rectum.</p> <p><b>Patients et méthodes</b></p> <p>Dans une première partie nous avons essayé d'étudier les caractéristiques épidémiologiques, et cliniques des patients atteints du cancer du rectum traités au service d'oncologie radiothérapie du CHUC. Nous avons également réalisé un prélèvement du sang total périphérique de 37 sujets (17 patients et 20 sujets présumé sains) afin d'étudier le polymorphisme du gène C677T de la MTHFR et de déterminer sa relation dans la survenue du cancer du rectum. Cette étude a été réalisée au laboratoire de recherche de biologie et génétique moléculaire de la faculté de médecine de Constantine.</p>	
<b>Mots clés :</b> Cancer du rectum, MTHFR, polymorphisme, mutation C677T	
<b>Laboratoire de recherche :</b> Laboratoire de biologie et génétique moléculaire (UC3)	
<p><b>Jury d'évaluation :</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Président du jury :</b> SATTI DALILA (Professeur- Université Constantine)</p> <p style="text-align: center;"><b>Rapporteur :</b> BOUDAOUED KHADIDJA (- Constantine).</p> <p style="text-align: center;"><b>Examineurs :</b> TALEB SELOUA (- UFM Constantine)</p>	
<b>Soutenu publiquement le mercredi 01-07-2015</b>	