

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



**جامعة الاخوة منتوري قسنطينة I**  
**Frères Mentouri Constantin I University**  
**Université Frères Mentouri Constantine I**

Université Frère Mentouri Constantine

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département De Biologie animale

قسم بيولوجيا الحيوان

**Thèse présentée en vue de l'obtention du diplôme de master**

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

**Filière : Sciences Biologiques**

**Spécialité : Génétique**

N° d'ordre :

N° de série :

Titre :

**Détection par séquençage de SNP -118T>C sur le gène MSH2 chez  
des familles algériennes ayant un Syndrome de Lynch**

**Présentée par : Gasmi Sahrui**

**Heouaine Amina**

**Jury d'évaluation :**

**Président : D. SATTA (Pr – Université Frères Mentouri, Constantine1)**

**Superviseuse : H. Ziada (MCB- Université Frères Mentouri, Constantine1)**

**Examineur : D. Gherzouli. R (MCA -Université Frères Mentouri, Constantine1)**

2020 /2021



*Nos premiers remerciements vont à « ALLAH »*

*Qui nous a honorés d'être parmi ceux qui savent lire et écrire, et a guidé nos pas sur le chemin de la science, ce qui nous a permis de réaliser ce travail.*

*Notre plus sincère gratitude va à Sa Majesté pour nous avoir donné le courage et la patience de mener à bien ce travail.*

# Remerciement

*La première personne que nous tenons à remercier notre  
encadreur de thèse Mme*

*Bouchaar-ZIADA Hadia , Maître de conférences A à  
l'Université Frères Mentouri*

*Constantin 1. Qui a toujours été disponible à chaque fois que  
nous avons une question ou que nous avons besoin d'un conseil.*

*Sans sa participation  
passionnée, son apport et son soutien, ce travail n'aurait pas  
été possible.*

*Nous tenons à remercier Mme D. SATTA, Professeur à  
l'Université les frères Mentouri Constantine 1. Pour avoir  
accepté de juger ce travail et de nous faire l'honneur de sa  
présidence du jury.*

*Nos remerciements vont également à Mme D. Gherzouli ,  
Maître de conférences B à l'Université Frères Mentouri  
Constantine 1, pour avoir accepté d'examiner notre travail et  
de nous honorer de sa présence.*

*Nous tenons à remercier Monsieur ML. REZGOUNE et tous les  
professeurs qui  
ont consacré tout leur temps et leurs efforts pour nous  
enseigner tout au long  
de notre parcours académique.*

*Nous tenons également à remercier qui nous a permis de  
réaliser des extractions d'ADN dans le laboratoire.*

*Enfin je remercie tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin  
dans la réalisation de ce travail .*

# Dédicace

*Je voudrais dédier mon travail à ma mère SAMIA .*

*L'âme la plus tendre, la plus douce et la plus généreuse,  
mais aussi la plus volontaire, qui m'a appris à faire  
confiance à Allah, à croire au travail acharné et au fait  
qu'on peut faire beaucoup avec peu. Celui qui a fait de  
moi la personne que je suis aujourd'hui. La seule  
personne au monde qui m'aime vraiment et qui se  
soucie autant de moi sans condition et sans limite. Tu  
es la meilleure maman qui soit.*

*Mon père RABEH*

*L'homme le plus cool, le plus honorable, le plus gentil,  
le plus courageux et le plus courageux que j'ai jamais  
vu. Tu m'as appris la PATIENCE, l'honneur, la décence,  
le respect de soi et ce que signifie être un homme.*

*Merci Mon péré , tu es le meilleur .*

*À vous deux, maman et papa.*

Merci pour votre bonne éducation et vos sages conseils,  
merci de

M'avoir enseigné tout ce que vous savez, merci pour  
votre courage,

votre soutien et votre appui, et merci de croire en moi.

Ma grand-mère « Ma fatima »

Merci « Ma » pour ton amour inconditionnel, et pour  
tout le soutien, l'aide, ton soutien et tes dons.

Mes défunts grands-parents zohra , « Sahraoui » et  
Mohamed TaHer

dont je souhaitais qu'ils soient avec moi aujourd'hui  
pour voir ce que je suis devenu.

Je suis ce que je suis en partie grâce à vous. Je souhaite  
que tu sois

très fière de moi. Qu'ALLAH soit miséricordieux envers  
toi, te pardonne et te récompense avec le Ciel. R.I.P. Tu  
me manques.

Mes frères Anis, OKBA, Abd Errahim ET SiD ALi

Vous êtes tout simplement les meilleurs frères et amis  
que l'on puisse avoir. Je souhaite que nous soyons  
TOUJOURS ensemble.

*A toute ma famille*

*À TOUS mes amis, en particulier Kamel , Salah ,  
AyMeN , RamZI , ANiS , OuSSaMa , HamZa et Yacer  
Merci pour votre amitié, je suis très fière d'être amie  
avec des gens aussi géniaux, mes frères*

*A mon partenaire AMiNA*

*MERCI pour ton travail acharné, ton soutien et ton  
dévouement*

*exceptionnel au travail et surtout MERCI pour ta  
patience à mon égard. Tu es un si GRAND  
PARTENAIRE.*

*SahRaOui*

# Dédicace

En témoignage d'amour et d'affection, je dédie ce modeste travail avec une grande fierté à tous ceux qui me sont chers :

La première raison de mon succès et la plus belle bénédiction de Dieu sur moi

## **Mes parents**

\* **Maman** « Dahbya » et **Papa** « Zouaoui », qui peut être fier et trouves ici le résultat de longues années de sacrifices et de privations pour m'aider à avancer dans la vie pour leur amour, leur tendresse. J'espère qu'un jour, je pourrai leur rendre un peu de ce qu'ils ont fait pour moi, que Dieu leur prête tout le bonheur.

\* Mes chers frères **Mostafa, khaled** et mes belles sœurs surtout **Linda, ismahan**. Pour leurs encouragements et pour leur soutien moral et physique.

\* A ma chère grand-mère **Mariam**, ma tante **Fatima, Horaya** et ma cousine **chadya** et mon beau-frère **Samir** merci beaucoup de me soutenir

*\* A tous les autres que je n'ai pas cités mais à qui je pense aussi.*

*\* A toute ma famille **Heouaine**.*

*\* A toute mes chères amies **Hanane**, **Chayama**, **Soumaya** et surtout **Mahdi** qui m'a beaucoup aidé avec un soutien moral.*

*A toi **Sahraoui***

**AMINA**

## Liste des abréviations

**ACP** : Amplification en Chaîne par Polymérase  
**APC** : Adenomatous Polyposis Coli  
**BET** : Bromure d’Ethidium  
**BER** : Base Excision Repair  
**CCR** : Cancer Colorectal  
**CIMP** : CpG Island Methylator Phenotype  
**CIN** : Chromosomal Instability  
**CMS** : Consensus Molecular Subtypes  
**CpG** : Cytosine–phosphate–Guanine  
**DCC** : Deleted in Colon Cancer  
**EDTA** : Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid  
**EpCAM** : Epithelial Cell Adhesion Molecule  
**FCA** : Foyers de Cryptes Aberrantes  
***hMLH1*, 3,6** : Human MutL Homologue 1,3,6  
**HNPCC** : Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer  
**IDL** : Insertion/Deletion Loop  
**LOH** : Loss Of Heterozygoty  
**MAP** : MUTYH Associated Polyposis  
**MICI** : Maladies Inflammatoires Chroniques de l’Intestin  
***MLH1*, 3** : MutL Homologue 1,3  
**MMR** : Mismatch Repair  
***MSH2,3,6*** : MutL Homologue 2,4,5,6  
**MSI** : Microsatellite Instability  
**MSI+** : MSI-Positive, High Grade of Microsatellite Instability  
***MYH*** : MutY Homolog  
**MUTYH** : MUTY Homolog  
**PCNA** : Proliferating Cell Nuclear Antigen  
***PMS1*** : Postmeiotic Segregation 1 Gene  
***PMS2*** : Postmeiotic Segregation 2 Gene  
**RER** : Replication ERror  
**SL** : Syndrome Lynch  
**SNP** : Single Nucleoid Polymorphism  
**SNP** : Single Nucleoid Polymorphism

**TACSTD1** : Tumor-Associated Calcium Signal Transducer1

**TBE** : Tris-Borate-EDTA

**TNM** : Tumor Node Metastasis

**TP53** : Tumour Protein 53

## Liste des figures

- Figure 01 : Anatomie du colon et du rectum (Arne et Nicole, 2002)
- Figure 02 : structure de la paroi colique chez le chien
- Figure 03 : Représentation schématique des différents stades du cancer colorectal.
- Figure 04 : Mode d'action du système MMR chez l'Homme
- Figure 05 : Représentation schématique du gène *MSH2*.
- Figure 06 : Représentation schématique de la protéine MSH2
- Figure 07 : Co localisation des gènes *EPCAM* et *MSH2*
- Figure 08 : Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch
- Figure 09 : Programme PCR de gène *MSH2*
- Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe
- Figure 11 : Répartition des malades atteints d'un CCR selon l'âge et le sexe
- Figure 12 : Répartition des patients SL selon la localisation de tumeur
- Figure 13 : Répartition des patients SL selon le stade de la tumeur
- Figure 14 : Répartition des cas SL selon les critères d'Amsterdam I/II et de Bethesda avec ou sans antécédents familiaux
- Figure 15 : Arbre généalogique de la famille F1
- Figure 16 : Arbre généalogique de la famille F4
- Figure 17 : Arbre généalogique de la famille F3
- Figure 18 : Arbre généalogique de la famille F4
- Figure 19 : Arbre généalogique de la famille F5
- Figure 20 : Arbre généalogique de la famille F10 porteuse de la mutation

## Listes des tableaux

- Tableau 01 : Classification CMS et corrélation phénotypique
- Tableau 02 : Cancres du spectre étroit et spectre large associés au syndrome de Lynch
- Tableau 03 : les autres cancer Associés au cancer colorectale héréditaire
- Tableau 04 : Composition du milieu réactionnel des PCR

# Table des matières

## Liste des abréviations

## Liste des figures

## Listes des tableaux

## Introduction.....1

## Partie 1 : Synthèse bibliographique

### Chapitre I : Cancer Colorectal

1- Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles du Colon et Rectum .....	3
1-1-Anatomie.....	3
1-2 Histologie.....	4
1-3 Fonctions.....	4
2- Cancer coloréctal.....	5
2-1- Données épidémiologiques.....	5
2-2- Étapes de la progression tumorale dans le CCR .....	6
2-3- Les stades de cancer colorectal selon la classification TNM .....	7
3- Carcinogenèse colorectale .....	8
3-1 Instabilité chromosomique.....	9
3-2 Instabilité microsatéllitaire.....	9
3-3 Instabilité épigénétique .....	10
4- Facteurs de risque et facteurs protecteurs.....	10
4-1 Habitudes de vie.....	10
4-2 Age et sexe.....	10
4-3 Comportement alimentaire .....	11
4-4 Antécédents de maladies .....	12

### Chapitre II : Formes héréditaires du cancer colorectal

1- Les formes héréditaires de CCR) .....	14
1-1 Polypose adénomateuse familiale (PAF).....	14
1-2 Polypose liée à MUTYH.....	14
Syndrome de Lynch	
1- Incidence, découverte et historique.....	15
2- Caractéristiques cliniques.....	15

2-1- Variétés cliniques.....	15
2-2- Critères d'Amsterdam et de Bethesda.....	16
3- Génétique et mécanisme moléculaire du syndrome de Lynch.....	17
3-1- Système MMR .....	17
3-2- Gènes MMR...../.....	18
3-3- Mutations germinales dans le gène <i>MSH2</i> .....	20
3-4- Polymorphismes et variants des gènes MMR impliqués... ..	21
4- Polymorphisme -118 C<T (rs2303425).....	21
4-1- Association polymorphisme rs2303425 et cancer CCR.....	21
4-2- Association polymorphisme rs2303425 et autres cancers .....	22
5- Stratégies de diagnostic de Syndrome de Lynch.....	22
6- Prise en charge de syndrome de Lynch... ..	23

## **Partie 2 : Étude Expérimentale**

### **Patients et méthodes**

1 - Patients .....	25
1-1-Recrutement des sujets .....	25
1-2-Questionnaire, enquête familiale et consentement... ..	25
1-3-Prélèvement sanguin.....	26
2-Méthodes... ..	26
2-1-Extraction de l'ADN.....	26
2-2-Amplification par PCR des exons de gènes <i>MSH2</i> .....	27
2-3-Réalisation du produit de PCR .....	30
2-4-Réalisation des réactions de séquençage.....	31
2-5-Purification des produits de séquence.....	31
2-6-Électrophorèse capillaire.....	32
2-7-Bioinformatiques. ....	33
2-8-Statistiques... ..	33

### **Résultats et discussion**

1- Répartition des sujets selon l'âge et le sexe .....	34
2- Répartition des probands SL selon les caractéristiques cliniques... ..	36
3- Répartition des patients SL selon le stade d'évolution de la tumeur... ..	37
4- Répartition des patients SL par rapport aux critères d'Amsterdam et de Bethesda.....	38
5- Les Arbres généalogiques de quelque patient .....	39
6- Polymorphismes sur les parties régulatrices .....	42
<b>Conclusion et perspectives .....</b>	<b>44</b>

**Références bibliographiques** ..... 45

**ANNEXES**

**RESUMES**

# *Introduction*

Le cancer colorectal (CCR) regroupe sous cette dénomination le cancer du côlon et celui du rectum étant assez semblable. Le CCR constitue un impact important sur le fardeau mondial du cancer. Il est en deuxième position en terme de mortalité après le cancer du poumon avec environ 1 849 518 nouveaux cas enregistrés qu'en 2018 (*Vekic et al., 2020*).

En Algérie, ce cancer constitue actuellement un problème majeur de santé publique. Les taux de CCR classent l'Algérie à la première place parmi les pays du Nord africains, avec environ 3000 morts et plus de 5500 nouveaux cas. Néanmoins, l'incidence du CCR dans l'Algérie est inférieure à celle de nombreux pays méditerranéens en Europe du Sud (*Negrichi et al., 2020*).

Le CCR est caractérisé par une prolifération anormale de cellules dans le gros intestin et par la formation de carcinomes glandulaires ou adénocarcinomes. La carcinogenèse colique est une séquence de multiples étapes aboutissant à l'accumulation d'anomalies génétiques héritées et acquises suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN (*Jones et al., 2002 ; Tariq and Ghias, 2016*).

Dans les CCRs, il existe les formes sporadiques et les formes héréditaires. Les formes sporadiques sont fréquentes et peuvent être liées à une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux. Cependant les cancers héréditaires sont souvent dus à une prédisposition génétique héréditaire. La forme la plus fréquente des CCR héréditaires est le syndrome de Lynch (SL) également connu sous le nom HNPCC (Hereditary Non-polyposis Colorectal Cancer).

Le SL présente entre 2-4% de tous les CCR (*Vasen et al., 2010*). Des critères, dits d'Amsterdam I, énoncés en 1991 par le consortium international sur le SL, définissant ce syndrome sur le plan clinique. Ces critères de reconnaissance reposent sur des informations individuelles et généalogiques (*Vasen et al., 1991 ; Boland et Lynch, 2013*).

Le SL est caractérisé par l'apparition précoce de CCR mais également par un risque plus élevé du développement d'autres cancers, en particulier, de l'endomètre, de l'ovaire, de l'estomac, de l'intestin grêle, de l'épithélium biliaire et urinaire (*Balaguer et Castells, 2007*) et, certaines tumeurs cutanées et cérébrales (*Cohen et Leininger, 2014*).

Sur le plan génétique, ce syndrome est associé à des altérations constitutionnelles dans les gènes de réparation des mésappariements (Mismatch Repair : MMR) de l'ADN (*Berginc et al., 2009*). Les variations dans les gènes *MLH1* et *MSH2* représentent environ 80-90% de toutes les mutations germinales trouvées dans les familles. Cependant la présence de certains polymorphismes comme le SNP -118C>T dans le promoteur du gène *MSH2* semblent avoir une liaison étroite avec un risque élevé de CCR.

Les objectifs de notre travail visent à :

- Décrire le profil épidémiologique, clinique, pathologique et génétique du CCR.
- Étudier les différents facteurs de risque génétiques et environnementaux et leur relation avec le CCR.
- Explorer le syndrome de lynch par une étude statistique des caractéristiques cliniques, généalogiques et moléculaire afin de rechercher une éventuelle mutation constitutionnelle dans le promoteur du gène *MSH2* par séquençage direct.
- Déterminer le polymorphisme c.-118C>T sur le promoteur du gène *MSH2* dans le but d'évaluer son association au risque d'atteinte par le SL chez les familles incluses dans cette étude.

*Partie 1*  
*Synthèse*  
*bibliographique*

## 1- Caractéristiques anatomiques et fonctionnelles du Colon et Rectum

### 1-1- Anatomie

#### ❖ Colon

Le colon ou gros intestin est la partie de l'intestin qui s'étend du caecum où se déverse l'intestin grêle et le rectum. Il mesure environ 1,5 mètre avec un diamètre initial de 8cm, diminuant progressivement pour atteindre 3 à 4cm à sa partie terminale. Le colon comprenant plusieurs parties distinctes (figure 01).

- Le caecum.
- Le colon ascendant (droit).
- Le colon transverse.
- Le colon descendant (gauche).
- Le colon sigmoïde.

#### ❖ Rectum

Le rectum est la partie terminale du tube digestif s'étendant depuis le côlon sigmoïde auquel il fait suite jusqu' à l'orifice anal.

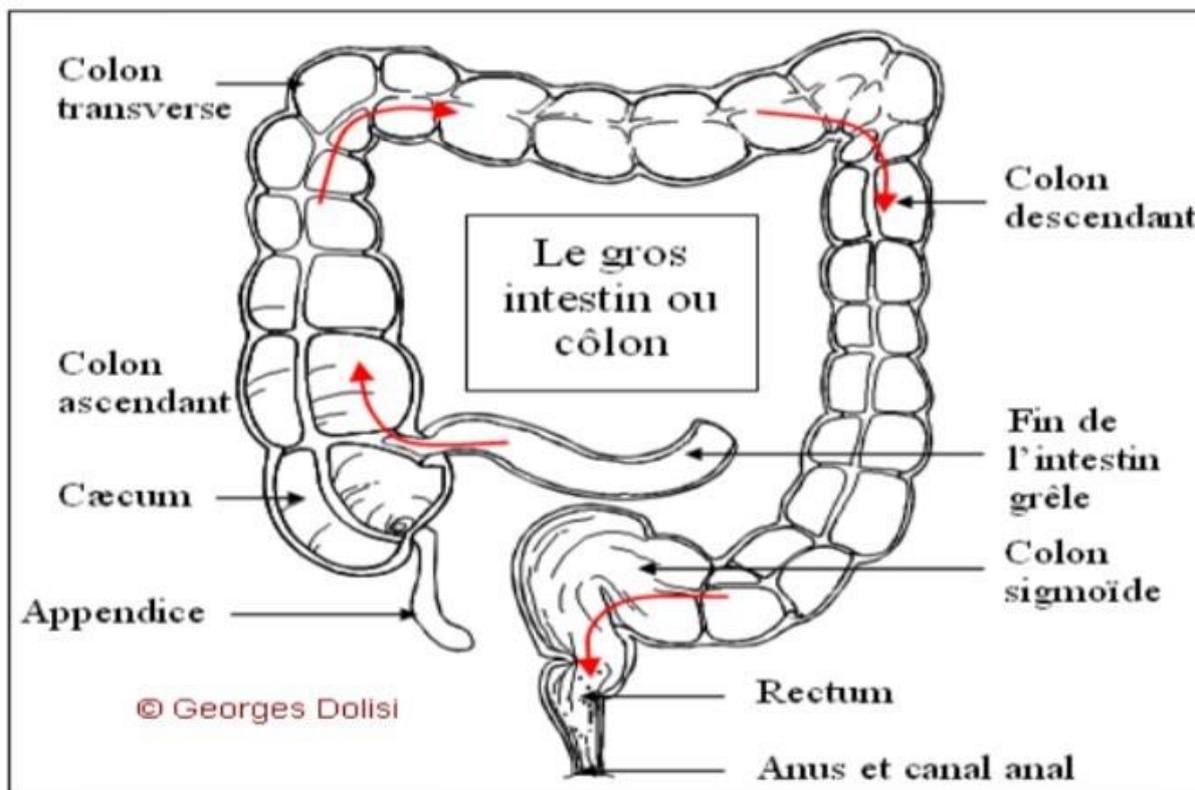


Figure 01 : Anatomie du colon et du rectum (Arne et Nicole, 2011)

## 1-2- Histologie

**Structure de l'épithélium intestinal :** Le côlon, comme tous les organes du tractus gastro-intestinal, est formé de 4 couches concentriques. En partant de l'extérieur vers l'intérieur, se trouvent une couche externe (sérouse), une couche constituée de muscles lisses innervés (musculaire), une couche intermédiaire (sous-muqueuse) où se trouve le tissu stromal et enfin la couche interne (muqueuse) qui est composée de l'épithélium et de muqueuse. La surface du côlon est plate formée uniquement de cryptes et non de villosités comme dans l'intestin grêle (Figure 02).

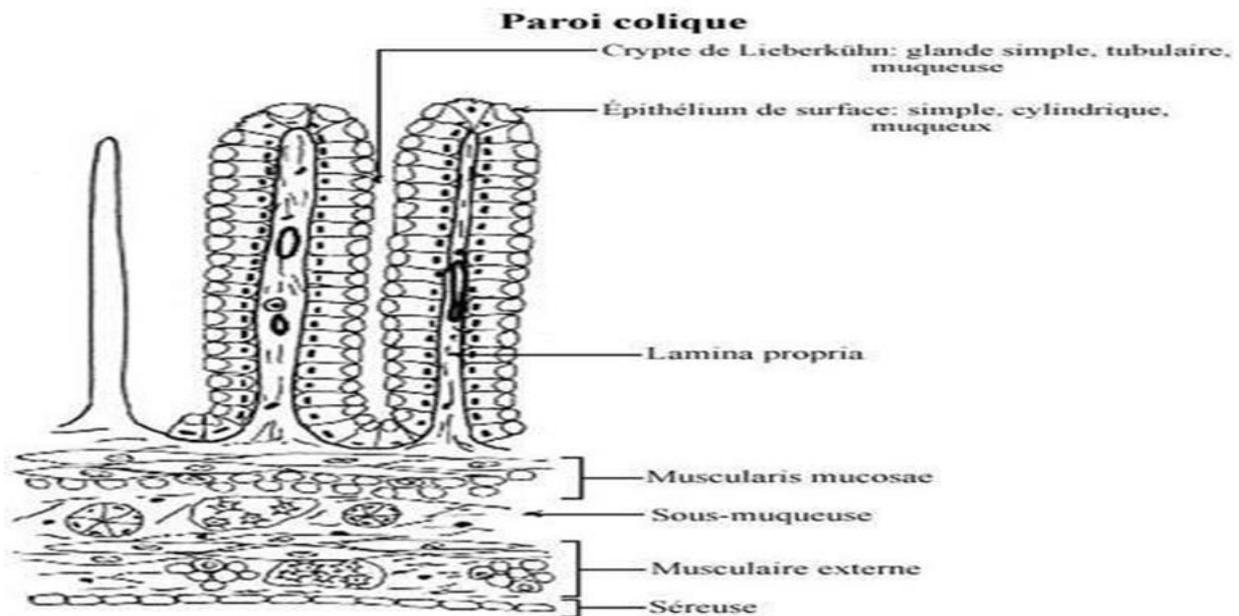


Figure 02 : Les couches du colon et du rectum Validire, P. (2011)

La paroi du gros intestin comprend les quatre caractéristiques du tube digestif, mais ne contient ni valvules conniventes, ni villosités intestinales **W**<sub>2</sub>.

## 1-3- Fonction du colon et du rectum

Le gros intestin possède au premier chef des fonctions de motricité mais il reste encore impliqué dans les digestions (absorption, sécrétion, dégradation des aliments) Les principales fonctions sont :

- motricité : celle -ci constituent surtout dans le stockage et le brassage des matières alimentaires et se traduisent par des mouvements de contraction segmentaire.
- absorption : il s'agit principalement de la réabsorption d'eau, des éléments minéraux, de vitamines et de sels minéraux.
- sécrétion : la sécrétion exocrine concerne le mucus des cellules caliciformes qui permet la protection de la muqueuse vis-à-vis de matières fécales formant ainsi de plus en plus solides.

- digestion : la dégradation des matières alimentaires ayant échappées à l'absorption intestinale est assurée par flore bactérienne du côlon (*Hirayama, 1981*).

### 2- Cancer colorectal

Le cancer colorectal (CCR) prend naissance dans les cellules du côlon ou du rectum. Ces cancers sont regroupés dans la catégorie cancer colorectal puisque ces organes sont faits des mêmes tissus et qu'il n'y a pas de limite claire entre eux.

La tumeur cancéreuse est un groupe de cellules malignes qui peuvent envahir les tissus voisins et les détruire. La tumeur peut aussi se propager (métastases) à d'autres parties du corps.

Les cellules du côlon ou du rectum subissent parfois des changements qui rendent leur mode de croissance ou leur comportement anormal. Ces changements peuvent engendrer la formation de tumeurs non cancéreuses comme des polypes hyperplasiques ou inflammatoires.

Les changements subis par les cellules du côlon et du rectum peuvent aussi causer des états précancéreux. Cela signifie que ces cellules anormales ne sont pas encore cancéreuses, mais qu'elles risquent de le devenir si elles ne sont pas traitées. Les états précancéreux du côlon et du rectum les plus fréquents sont les adénomes et les syndromes du CCR héréditaire.

Mais dans certains cas, ces changements qui affectent les cellules du côlon ou du rectum peuvent causer un cancer colorectal. La plupart du temps, le CCR prend naissance dans les cellules glandulaires qui tapissent la paroi du côlon ou du rectum. Ce type de cancer porte le nom d'adénocarcinome **W3**.

#### 2-1- Données Epidémiologique

Le CCR est l'un des néoplasmes malins diagnostiqués les plus courants, considéré comme le troisième cancer parmi tous les cancers en termes d'incidence dans le monde, après le cancer du poumon et du sein, il est en deuxième position en termes de mortalité après le cancer du poumon (*Vekic et al., 2020*). Avec environ 1 849 518 nouveaux a enregistré qu'en 2018, le CCR a un impact important sur le fardeau mondial du cancer (*Negrichi et al., 2020*).

Selons l'étude de Sharma (2020) à l'échelle mondiale, le CCR ça fait environ 880 792 morts (hommes 484224 ; femmes 396568) avec 1,85 million de nouveaux cas (hommes 1,03 million ; femmes 823303) ont été diagnostiqués en 2018. À l'échelle mondiale, le taux d'incidence normalisé selon l'âge était de 19,7 / 100 000, alors que le taux de mortalité normalisé selon l'âge était de 16,3 / 100 000 en 2018. Les taux normalisés selon l'âge étaient les plus élevés dans les pays développés (*Sharma, 2020*).

En 2018, Les taux de CCR classent l'Algérie à la première place parmi les pays Nord africains, avec environ 3000 morts et plus de 5500 nouveaux cas. Néanmoins, l'incidence du CCR dans L'Algérie est inférieure à celle de nombreux pays méditerranéens en Europe du Sud (*Negrichi et al., 2020*).

### **2-2- Étapes de la progression tumorale dans le CCR**

Le CCR est une tumeur maligne de la muqueuse du côlon ou du rectum. La première étape dans le développement d'un CCR est l'apparition à la surface de l'épithélium du côlon ou du rectum, d'une hyperprolifération cellulaire. Sur le plan morphologique, cette anomalie de la muqueuse colique, mieux vue après application de colorant comme le bleu de méthylène à 0,2%, traduit un aspect élargi et déformé des cryptes appelées foyers de cryptes aberrantes (FCA) (*D. Heresbach et N. Heresbach Le Berre, 2003*).

Ces FCA existent sous la forme d'une hyperplasie, c'est à dire une augmentation de volume cellulaire ou une augmentation du nombre de ses cellules ou d'une dysplasie caractérisée par une malformation ou déformation résultant d'une anomalie du développement d'un tissu (*Stevens et al., 2007*).

La prolifération cellulaire anormale tend à l'accumulation des cellules dans la muqueuse et aboutit à la formation d'un polype. Le terme « polype » fait référence à une masse discrète qui fait saillie dans le lumen intestinal. Dans la majorité des cas, le CCR provient d'un polype adénomateux dégénéré. Un adénome est une lésion néoplasique qui peut évoluer vers un cancer. La prévalence rapportée des polypes adénomateux sur la base des données de dépistage par colonoscopie augmente avec l'âge et atteint 30% des sujets à partir de 65 ans (*Winawer et al., 2007*).

Certains types de polypes adénomateux ou adénomes peuvent, avec le temps, se transformer en cancer : 10 % des adénomes atteignent 1 cm de diamètre, et, parmi ceux-ci, environ un quart deviennent des cancers (*Bouvier et al., 2002*). Ce processus se développe habituellement sur une dizaine d'années.

Le développement d'un adénocarcinome est d'abord superficiel intra-épithélial puis intra muqueux sans franchissement de la lame basale et est désigné sous le terme « in place », stade précoce de cancer. Le carcinome invasif s'applique aux lésions entraînant une rupture de la lame basale et dépassant la muqueuse musculaire.

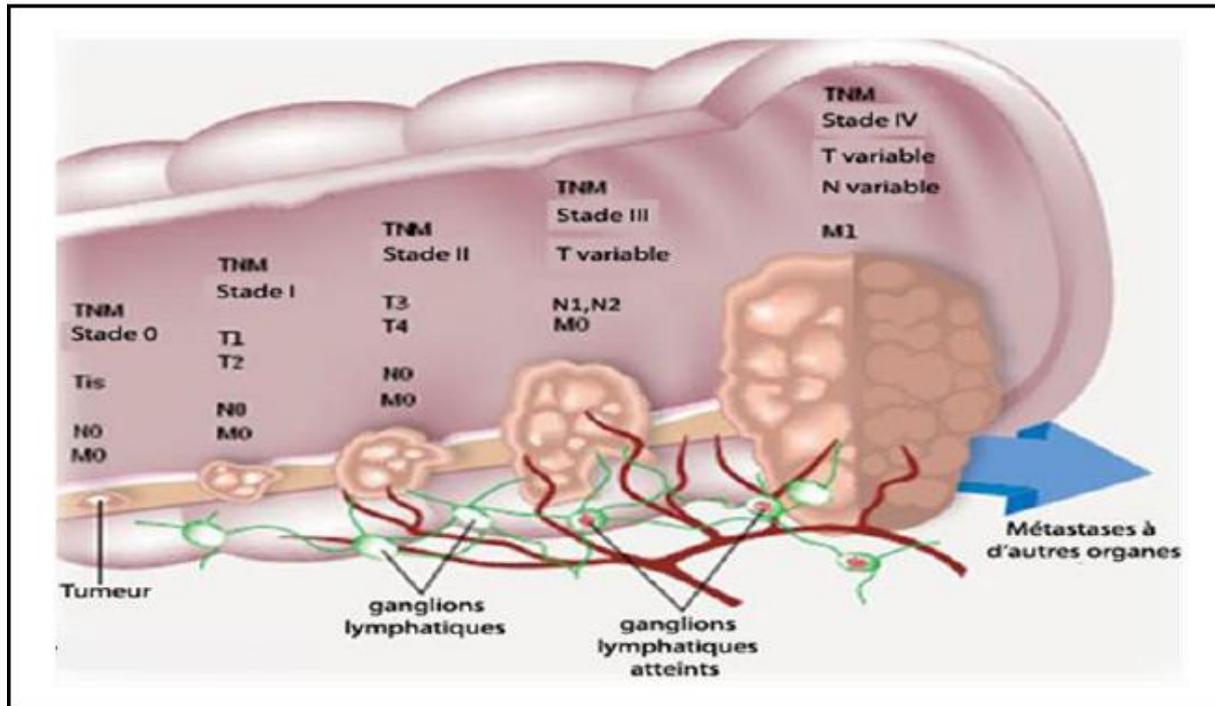
Le cancer va ensuite infiltrer progressivement en profondeur les différentes parois du côlon ou du rectum et diffuser dans les ganglions lymphatiques puis à distance. La séquence côlon-adénome-adénocarcinome est devenue bien caractérisée au plan histologique et génétique.

La plupart des CCR résultent d'adénomes sporadiques et de la transformation maligne d'un polype adénomateux bénin, mais quelques-uns résultent d'adénomes familiaux ou de syndromes de l'intestin irritable.

### 2-3- Les stades de cancer colorectal selon la classification TNM

Cette classification (Tableau A, Annexe I) repose après un échantillonnage précis de la pièce opératoire sur :

**L'envahissement en profondeur de la tumeur (pT)**, divisé en plusieurs niveaux (figure 03).



**Figure 03 : Représentation schématique des différents stades du cancer colorectal. W4**

Le CCR a été l'un des premiers cancers à avoir été caractérisé d'un point de vue moléculaire. Les CCR font l'objet d'une classification moléculaire consensuelle transcriptomique qui permet la catégorisation de la plupart des tumeurs en un des quatre sous-types robustes (consensus molecular subtypes, CMS).

Ces groupes sont strictement liés à des caractéristiques biologiques, génomiques et épigénétiques, ainsi qu'aux taux de survie. La classification CMS des CCR représente une avancée majeure dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de la transformation maligne des cellules épithéliales coliques, et ouvre la voie dans le développement d'une approche de médecine de précision dans ce cancer. (*camilla pilati, et al., 2020*).

Il existe une nouvelle classification CMS qui permet de donner un pronostic prédictif :

En cas de CCR non métastatiques le pronostic est favorable pour les tumeurs CMS-1 et dans une moindre mesure CMS-2 (Barault L et al., 2008). À l'inverse les tumeurs CMS-4 ont un mauvais pronostic.

Les cancers du côlon apparaissent donc comme un groupe de maladies très hétérogène.

Un consortium international d'experts a récemment permis de dégager, à partir de 6 classifications moléculaires et plus de 4000 patients, 4 sous-types de cancers colorectaux.

Il s'agit de la classification CMS en 4 groupes caractérisés par des facteurs moléculaires, biologiques et cliniques (Guinney J, et al.; 2015). Il faut noter que 21 % des CCR n'appartiennent à aucun de ces 4 groupes.

(Tableau 01) : Classification CMS et corrélation phénotypique (D'après Guinney J et al.)

(4 Sous types consensus)			
13%	35%	11%	20%
<b>OMS1</b> <b>MSI</b> <b>immunitaire</b> <b>14%</b>	<b>CMS2</b> <b>Canonique</b> <b>37%</b>	<b>CMS3</b> <b>Métabolique</b> <b>13%</b>	<b>CMS4</b> <b>Mésenchymateaux</b> <b>23%</b>
<b>MSI, CIMP</b> <b>haut,</b> <b>hypermutation</b>	<b>SCNA haut</b>	<b>Etat MSI mixte,</b> <b>SCNA</b> <b>BAS, CLIMP bas</b>	<b>SCNA haut</b>
<b>BRAF</b> <b>mutation</b>		<b>KRAS mutation</b>	
<b>Infiltration et</b> <b>activation</b> <b>immunitaires</b>	<b>Activation WNT</b> <b>et MYC</b>	<b>Dérégulation</b> <b>métabolique</b>	<b>Infiltration</b> <b>stromale, activation</b> <b>du TGF-<math>\beta</math>,</b> <b>angiogenèse</b>
<b>Pire survie</b> <b>après rechute</b>			<b>Pire survie sans</b> <b>rechute et survie</b> <b>globale</b>

### 3- Carcinogénèse colorectale

La carcinogénèse colique est un processus d'initiation et de transformation de cellules normales. Il est constitué de multiples étapes nécessitant l'accumulation d'anomalies génétiques héritées et acquises suite à des modifications génétiques et épigénétiques de l'ADN (Tariq et Ghias, 2016). L'instabilité génétique est une caractéristique des cellules cancéreuses. Les déterminants de cette instabilité génétique sont en majorité liés à des mécanismes cellulaires fondamentaux, comme le cycle cellulaire, la réplication ou la réparation de l'ADN. A ces mécanismes s'ajoutent les modifications épigénétiques qui sont transmises de cellules mères à cellules filles.

Trois mécanismes différents ont été individualisés dans la cancérogenèse colorectale :

- L'instabilité chromosomique (CIN : Chromosomal instability) ;
- L'instabilité des microsatellites : (MSI : Microsatellite instability ou RER : Replicative error).
- Les modifications épigénétiques : (CIMP : CpG Island Methylator Phenotype).

### 3-1- Instabilité chromosomique

Ce mécanisme est caractérisé par des pertes récurrentes de certains segments chromosomiques traduisant ainsi la perte allélique ou la perte d'hétérozygotie (LOH) « *Loss of Heterozygosity* ». Les fragments chromosomiques les plus fréquemment perdus sont le bras court du chromosome 17 et le bras long des chromosomes 5 et 18. Des gènes impliqués dans le processus tumoral ont été identifiés sur ces fragments chromosomiques. Il s'agit essentiellement de gènes supresseurs de tumeur : le gène *APC* sur le chromosome 5, le gène *Tp53* « *Tumor protein 53* » sur le chromosome 17 et le gène *DCC* « *Deleted in Colorectal Carcinoma* » sur le chromosome 18 (Kern et al, 1989 ; Vogelstein et al, 1988).

Ce sont des gènes clés qui sont impliqués dans le contrôle de la croissance cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose. L'instabilité chromosomique intervient précocement dans la formation de la tumeur et en accélère la progression. Ce mécanisme est décelé dans la grande majorité des cas de CCR (PAF et 80% des cancers sporadiques). Dans ce type de cancer, les cellules tumorales présentent un contenu anormal en ADN (aneuploïdie) avec un phénotype CIN.

### 3-2- Instabilité microsatellitaire

En raison de la structure répétée des microsatellites, ceux-ci sont particulièrement exposés à des erreurs de réplication qui sont normalement réparées par le système de réparation des mésappariements de l'ADN (MMR). Ce système sera détaillé ultérieurement.

La perte de l'une des fonctions des protéines du système MMR est responsable d'une déficience de la réparation conduisant à l'accumulation de mutations secondaires au niveau des séquences microsatellitaires, ce qui entraîne une instabilité génétique (Grady, 2004. Lamoril et al, 2006. Lengauer et al, 1998).

Les gènes mutés sont impliqués dans le système MMR ; il s'agit des gènes *MLH1* « *MutL Homolog 1* », *MSH2* « *MutS Homolog 2* », *MSH6* « *MutS Homolog 6* », *PMS1* « *Postmeiotic Segregation 1* » et *PMS2* « *Postmeiotic Segregation 2* » (Kinzler & Vogelstein, 1996. Laurent-Puig et al, 2010. Papadopoulos et al, 1994). Ces enzymes ont une grande importance dans le maintien du patrimoine génétique de la cellule épithéliale et par conséquent, dans le maintien de l'intégrité de l'épithélium colique.

Les cellules deviennent alors capables d'acquérir des modifications génétiques supplémentaires qui les conduiront dans un processus irréversible et accéléré de cancérogenèse. Cette instabilité microsatellitaire confère aux cellules tumorales un phénotype dit MSI+ ou, anciennement, RER+ « *Replication Error* ». Ce mécanisme est présent dans 15 % des CCR sporadiques et dans le cas de syndrome de Lynch (*Laurent-Puig et al, 2010*).

### **3-3- Instabilité épigénétique « Hyperméthylation »**

La méthylation est l'ajout d'un groupement méthyl sur une base cytosine de l'ADN. C'est un phénomène de régulation transcriptionnelle important dans la cellule. Plus récemment, des anomalies de la méthylation de l'ADN ont été mises en évidence dans les tumeurs colorectales (*Issa, 2004*). La caractéristique principale associée à ce groupe de CCR est l'hyperméthylation de la région promotrice de nombreux gènes. Ce dérèglement touche les cytosines des îlots CpG des régions régulatrices des gènes et entraîne leur inactivation transcriptionnelle aboutissant ainsi à l'abolition de leur expression. Dans le CCR, plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs peuvent être inactivés à travers ce phénomène. Les tumeurs appartenant à ce groupe ont un phénotype appelé CIMP (*Cheng et al, 2008*).

## **4 - Facteurs de risque de CCR**

### **4-1- Habitudes et mode de vie**

Le cancer colorectal est fortement associé au mode de vie des sujets et de son environnement. L'Age, sexe et le comportement alimentaire comme la viande rouge et les graisses animales sont des facteurs de risque du CCR auxquels s'ajoutent le tabagisme, l'alcool et le surpoids. En revanche, l'activité physique, les fibres, l'ail, le lait et le calcium semblent avoir un effet protecteur.

### **4-2- Age et sexe**

Le cancer colorectal est rare avant 50 ans où il ne représente que 6 % (*Rougier P, 2004*), alors qu'il est 15 fois plus élevé chez les adultes de plus de 50 ans que chez ceux âgés de 20 à 49 ans (*SEER, Stat Database 2007*). Globalement, 90 % des nouveaux cas et 94 % des décès surviennent chez des personnes de plus de 65 ans. En effet, la proportion de cas diagnostiqués double chaque décennie entre 40 et 70 ans dans les deux sexes (*Viguier J et al., 2003*).

L'incidence des cancers augmente manifestement avec l'âge du fait de multiples facteurs (baisse de la capacité de réparation de l'ADN, exposition prolongée aux carcinogènes, dysrégulation hormonale ou du système immunitaire) (*Morin et al.,2007*).

L'âge moyen du diagnostic est de 69,5 ans chez l'homme et de 72,8 ans chez la femme (*Viguier J et al., 2003*). Dans l'ouest de l'Algérie, l'étude de (*Maddah et al., 2009*) montre que

l'espérance de vie totale moyenne des personnes atteintes de CCR est d'environ 53,5 ans pour les deux sexes combinés. L'étude de (*Brenner et al., 2007*) montrent que les femmes ont un CCR 4 à 8 ans plus tard que les hommes. Il y a une légère prédominance masculine avec un sexe ratio de 1,5 (*Rougier P, 2004*).

### 4-3- Comportement alimentaire

#### ➤ La viande rouge

L'augmentation du risque de CCR avec une forte consommation de viande rouge a été rapportée dans des études menées pour la plupart en Amérique du Nord mais cette relation est beaucoup moins nette dans les études européennes (*WCRF, 1997*). Concernant les charcuteries, leur rôle éventuel pourrait être lié aux conservateurs utilisés tels que le nitrite. Le nitrite et les composés nitrés peuvent être transformés en dialkylnitrosamines qui sont des composés carcinogènes (*NORAT et al., 2001 ; Aykan, 2015*).

En matière de cuisson plusieurs études ont montré que les consommateurs qui cuisent de la viande à haute température ont un risque accru de cancer colorectal (*Sinha Et Al., 1999 ; Le Marchand Et Al., 2001*).

#### ➤ Graisses

Il existe une forte corrélation géographique entre la consommation de graisses et l'incidence du CCR. Ainsi, l'incidence du CCR est la plus élevée dans les régions à forte consommation de graisses animales autre que le poisson (Europe du Nord, Amérique du Nord). Elle est la plus basse dans les régions qui consomment les graisses d'origine marine (Japon) (*Howe et al., 1997*).

#### ➤ Fruits et légumes

La méta-analyse réalisée par RIBOLI et NORAT montrait une diminution significative de moins de 10 % du risque de CCR pour chaque augmentation de 100 g/j de la consommation de fruits ou de légumes (*Riboli Et Norat, 2003 ; Kunzmann Et Al., 2016*).

#### ➤ Tabagisme

Le tabagisme est associé à une augmentation du risque et de la mortalité par CCR. Des agents cancérigènes de la fumée de cigarette peuvent favoriser la formation de tumeurs du côlon et du rectum. Les études ont montré que relation significative n'a été trouvée que chez les fumeurs à long terme, qu'ils aient ou non arrêté de fumer (*Mármol et al., 2017*).

#### ➤ Consommation d'alcool

Plusieurs études soutiennent une association positive entre la consommation d'alcool et le risque de formation de polype adénomateux dans le CCR. Il existe une relation dose-effet.

En effet, le lien entre le risque d'alcool et de polype pourrait dépendre de la dose ; le nombre de verres consommées par semaine (*Rossi et al., 2018*). Les effets de l'alcool se combinent avec ceux du tabac selon un schéma multiplicatif du risque au CCR.

### ➤ **Activité physique**

Plusieurs données suggèrent que l'activité physique régulière, qu'elle soit professionnelle ou de loisir, semble être associée à une protection contre le cancer colorectal (*Teixeira C et al., 2014*). Il a été prouvé qu'une activité physique modérée augmente les taux métaboliques et la motilité intestinale et, à long terme, augmente l'efficacité métabolique et réduit la tension artérielle (*Mármol et al., 2017*).

### ➤ **Obésité**

Un apport calorique élevé, une obésité de type androïde ainsi que la sédentarité sont associés à un risque augmenté d'adénome ou de cancer colique (*Manceau et al., 2014*).

## **4-4- Antécédents de maladies**

L'exploration des antécédents permet d'obtenir des informations au sujet de troubles dont ont souffert les parents directs du patient. Cette exploration est extrêmement utile car, outre le fait que certaines maladies sont transmises selon les lois de la génétique, la présence de certaines d'entre-elles chez les parents peut accroître statistiquement le risque de CCR chez les descendants.

**Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI) :** La maladie de Crohn et la colite ulcéreuse sont associées à un risque accru de cancer colorectal (*Triantafillidis et al. 2009*). En effet, les patients affectés ont environ dix fois plus de risque de développer ce type de cancer (*Itzkowitz and Yio, 2004 ; Terzić et al., 2010*). Les cellules inflammatoires produisent des médiateurs, tels que des radicaux libres, des prostaglandines et des cytokines, qui participent aux différentes phases de la réaction inflammatoire. L'exposition chronique à ces médiateurs de l'inflammation engendre une augmentation de la prolifération cellulaire, une mutagenèse, une activation d'oncogènes et de l'angiogenèse (*Shacter et Weitzman, 2002*). Par ailleurs, les tissus enflammés constituent un environnement idéal pour la sélection et la croissance des cellules cancéreuses colorectales (*Beauchemin, 2011*).

**Antécédents de polypes colorectaux :** Les polypes sont considérés comme des lésions précancéreuses. Lorsque des polypes sont découverts dans le gros intestin, par exemple lors d'un examen de dépistage, ils doivent être supprimés pour les empêcher de se transformer en cancer (*Flejou, 2008*).

**Antécédents personnels de CCR ou d'autres types de cancer :** Les antécédents d'autres tumeurs, comme les lymphomes, le cancer du testicule ou le cancer de l'endomètre,

augmentent le risque de développer un cancer colorectal (*Capocaccia et al., 2015 ; Trabert et al., 2016*). Même si la tumeur a été complètement retirée durant le traitement précédent, il y a un risque accru de développer une nouvelle tumeur dans une autre partie du gros intestin ou du rectum.

**Antécédents familiaux de cancers :** Le risque de développer un cancer colorectal est augmenté si un parent du premier degré présente un cancer colorectal. Cela peut être dû à des facteurs génétiques héréditaires ou à des facteurs environnementaux communs. Il a été démontré que les parents de patients atteints de carcinome d'origine inconnue sont exposés à un risque accru de plusieurs néoplasmes malins, y compris le cancer du côlon (*Samadder et al., 2016*). A partir de ces différentes données, une évaluation des niveaux de risque a été proposée :

➤ **Sujets à risque moyen**

Ce sont les personnes de plus de 50 ans sans facteur prédisposant connu au cancer colorectal « sporadiques » (*Chan et al., 2011*).

➤ **Sujets à risque élevé**

Ce groupe comprend les sujets aux antécédents personnels de cancer colorectal ou d'adénome, et aux antécédents familiaux de CCR ou d'adénome de plus de 1 cm chez un ou plusieurs parents au premier degré. Les personnes atteintes d'une maladie inflammatoire chronique de l'intestin étendue sont également des sujets à risque élevé de développer un cancer colorectal (*Kirkegaard et al., 2010*).

➤ **Sujets à risque très élevé**

Ce niveau de risque est représenté par les personnes appartenant à une famille atteinte de cancers à transmission héréditaire autosomique dominante (*Chan et al., 2011*)

### 1-Les formes héréditaires de CCR

Deux formes cliniques caricaturales sont décrites : le syndrome de Lynch (SL) dû à une mutation ponctuelle au niveau des gènes impliqués dans le système MMR tels que *hMLH1*, *hMLH6*, *hMSH2* ; et la polypose adénomateuse familiale (PAF), qui conduisent à la recherche de mutations dans les gènes (*APC* et *MYH*). (Manceau G et al., 2011).

#### 1-1-Les polyposes familiales

Elles sont définies par la découverte d'un nombre élevé de polypes dans le côlon et le rectum. Dans la Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) liée au gène APC, les polypes sont souvent en très grand nombre (> 100), apparaissent à un âge moyen de 16 ans et à 35 ans, 95 % des patients ont une polypose (Petersen GM et al., 1991).

La découverte peut enfin être la conséquence d'un dépistage génétique ciblé chez des apparentés d'un cas index atteint.

La PAF est de transmission autosomique dominante avec une pénétrance complète (la présence de la mutation entraîne systématiquement l'apparition du phénotype). Cette maladie explique environ 1 % des cancers colorectaux. Le risque de transmission à la descendance est de 50 %. Dans 10 à 30% des cas, on observe une néomutation. Des cas de néomutation en mosaïque ont également été décrits et ne sont pas rares (20% des néomutations) (Aretz S et al., 2007).

La PAF est une des rares maladies qui permettent l'observation des premiers stades de la formation d'un adénome. Elle renforce la notion de séquence adénome-cancer. En effet, la PAF se manifeste par la formation de plusieurs centaines de polypes (présence de 100 à 1000 polypes) au niveau du côlon chez au moins un membre de la famille. Dès l'adolescence, ces adénomes évoluent naturellement vers des adénocarcinomes avec un âge moyen d'apparition de 40 ans mais très rarement avant 20 ans (Cp Penna et al., 1991). La plupart des adénomes mettent entre 6 à 10 ans pour subir une transformation maligne. En microscopie, l'adénome montre une architecture tubulaire identique à celle retrouvée chez les patients atteints d'un cancer sporadique (Gatalica et Torlakovic, 2008).

#### 1-2-Polypose liée à MUTYH

Cette polypose est appelée polypose associée à MUTYH (MAP pour MUTYH associated polyposis), représente entre 0.5% et 1% de la totalité des CCR (Al-Tassan et al., 2002). Les polypes observés sont moyennement dysplasiques, localisée préférentiellement dans le colon gauche. Le syndrome MAP est de transmission autosomique récessive avec mutation bi-allélique des allèles de MUTYH à naissance. L'absence d'activité de MUTYH (un gène qui appartient au système de réparation de l'ADN BER dont le rôle est de corriger les erreurs liées au métabolisme

aérobie des cellules lors de la réplication va entraîner l'accumulation de transversion G :C > T : A sur le gène *APC* au niveau des séquences GAA (*Jones et al., 2002*).

### **Syndrome de Lynch**

#### **1-Incidence, découverte et historique**

Le syndrome de lynch (SL) ou Syndrome HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colon Cancer) est la forme la plus fréquente des cancers colorectaux héréditaires, avec une incidence de 1 à 2 pour 1000 (*Boland, 2006*). Il représente de 0,5 à 5% de la totalité des cancers colorectaux.

La première description clinique de ce syndrome remonte à 1913 quand le Dr Warthin note une association de cancers colorectaux (non polyposiques), gastriques et endométriaux au sein d'une même famille. Il évoque alors la possibilité d'une hérédité sous-jacente.

En 1966, Henry Lynch rapporte à son tour dans 2 grandes familles une agrégation de cancers coliques en faveur d'une implication de l'hérédité évoquant une transmission autosomique dominante.

Ce syndrome fut un temps connu sous l'acronyme anglais de HNPCC (Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer) auquel est dorénavant préférée l'appellation de Syndrome de Lynch.

#### **2-Caractéristiques cliniques**

Le diagnostic clinique reposait initialement sur les critères d'Amsterdam, définis en 1990, puis revus en 1999 (*Vasen HF et al., 1999*).

Sur le plan histologique lorsqu'il est secondaire à un dysfonctionnement des gènes du DNA MMR, qu'il soit constitutionnel ou non, le cancer colorectal peut présenter des aspects morphologiques caractéristiques (*Hewish M et al., 2010*) qui doivent faire évoquer le diagnostic.

Sur le plan moléculaire, ces tumeurs HNPCC sont caractérisées majoritairement par un phénotype MSI ainsi que par la présence de certaines propriétés conventionnelles des adénomes comme les mutations sur les gènes *APC*, *β-catenine (CTNNB1)*, et /ou *K-ras* (*Arvelo et al., 2015*). Les CCR associés au SL sont généralement de meilleur pronostic que les CCR sporadiques, indépendamment du stade de la maladie (*Gryfe et al., 2000*).

##### **2-1-Variétés cliniques**

Deux types de SL ont été définis cliniquement : les patients ayant le type I présentent des tumeurs localisées exclusivement dans le colon (spectre étroit), alors que les patients, atteints de SL type II, sont associés à une augmentation significative du risque d'autres types tumoraux (spectre large) (Tableau 02).

**Tableau 02 : Cancers du spectre étroit et spectre large associés au syndrome de Lynch.**

Cancers du spectre Lynch étroit	Cancers du spectre Lynch élargi : ceux du spectre étroit + ceux ci-dessous	Référence
Adénocarcinome colorectal	Cancer de l'ovaire.	<i>Rustgi, 2007.</i>
Adénocarcinome de l'endomètre	Cancer de l'estomac	<i>Peltomäki, 2016.</i>
Adénocarcinome de l'intestin grêle	Cancer des reins et les voies biliaires	<i>Watson et al., 2008.</i>
Cancer des voies urinaires excrétrices	Glioblastomes	<i>Win et al., 2012. Engel et al., 2012.</i>
	Des tumeurs cutanées (sébacées) :Muir-Torre et cérébrales Turcot:	<i>Hamilton et al., 1995. Kleinerman et al., 2012.</i>
	Cancer du pancréas Cancer du sein Cancer de la prostate	<i>Niskakoski et al., 2013. Arvelo et al., 2015. Peltomäki, 2016.</i>

### 2-2-Critères d'Amsterdam et de Bethesda

Les critères d'Amsterdam II (Tableau B, Annexe I) n'identifient qu'environ la moitié des patients avec syndrome de Lynch et environ la moitié des familles qui valident ces critères n'ont pas de syndrome de Lynch (*Jenkins MA et al., 2007*). Chez les familles qui valident les critères d'Amsterdam sans mutation MMR avec un CCR ayant une stabilité microsatellitaire, on retient le diagnostic de CCR familial type X (*Lindor NM et al., 2005*). Il s'agit d'une nouvelle entité caractérisée par un risque accru de CCR mais sans surrisque pour les autres cancers (*Lindor NM, 2009*). C'est une maladie à transmission autosomique dominante dont le gène en cause est non encore déterminé. Les critères de Bethesda révisés (Tableau B, Annexe I) ont été développés pour améliorer la sensibilité des critères d'Amsterdam. Néanmoins, au sein des familles qui valident les critères de Bethesda sans valider les critères d'Amsterdam, une mutation d'un gène MMR n'est identifiée que dans 15 - 30% des cas (*Lynch HT, 2009*).

Génétique et mécanisme moléculaire du syndrome de Lynch.

## 3-Génétique et mécanisme moléculaire du syndrome de Lynch

### 3-1- Le système MMR

Le système de réparation des mésappariements, ou MisMatch Repair (MMR), a un rôle capital pour le maintien de l'intégrité génomique à travers deux fonctions. Il permet d'une part la réparation des mésappariements provoqués par les erreurs de la polymérase lors de la réplication de l'ADN et d'autre part la signalisation apoptotique de certains dommages à l'ADN.

Le système MMR est par ailleurs impliqué dans les processus de recombinaison pendant la mitose/méiose, de suppression de la recombinaison homéologue de diversité des immunoglobulines et d'expansion des répétitions trinuécléotidiques associées à certaines maladies dégénératives (*Reyes et al., 2015*).

Le système MMR est hautement conservé des procaryotes aux eucaryotes, la fidélité de la réplication de l'ADN est essentielle pour préserver l'intégrité du génome. Les erreurs de réplication ayant échappé au système de relecture de l'ADN polymérase sont alors corrigées par un système très efficace de réparation des mésappariements, qui contribue à abaisser le taux d'erreur de réplication à une mutation toutes les  $10^{10}$  Pb. Ce système, particulièrement conservé au cours de l'évolution, cible les mésappariements de nucléotides, mais également les petites boucles d'insertions/délétions (Insertion Deletion Loops ou IDL) qui résultent d'erreurs de réplication (*Hsieh et Yamane, 2008*). Ainsi, l'inactivation du système MMR confère un phénotype mutateur qui se caractérise par un taux de mutations spontanées élevé (Figure 04).

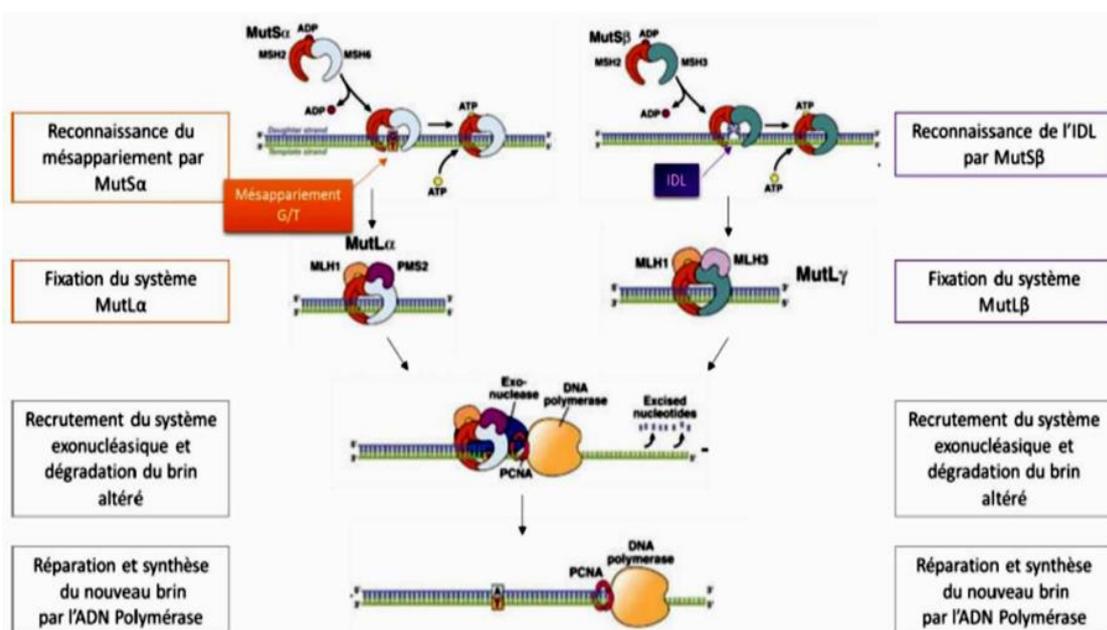


Figure 04 : Mode d'action du système MMR chez l'Homme (Boland et Goel, 2010).

Le complexe MutS $\alpha$  (MSH2 et MSH6) reconnaît les mésappariements de base et IDL de petite taille ( $\leq 2$  nucléotides) et adopte une conformation de pince coulissante entourant l'ADN. Cette étape nécessite l'échange de l'ADP en ATP. Ce complexe est ensuite lié à MutL $\alpha$  (MLH1 et PMS2). Celui-ci interagit avec la protéine PCNA et l'Exonucléase 1 qui va dégrader le brin fils jusqu'au mésappariement. Finalement, le complexe se dissout quand la synthèse du nouveau brin par l'ADN Polymérase est effectuée. Selon le même principe, le complexe MutL $\beta$  (MSH2-3) agit sur les IDL de plus grande taille ( $> 2$  nucléotides).

### 3-2-Gènes *MMR*

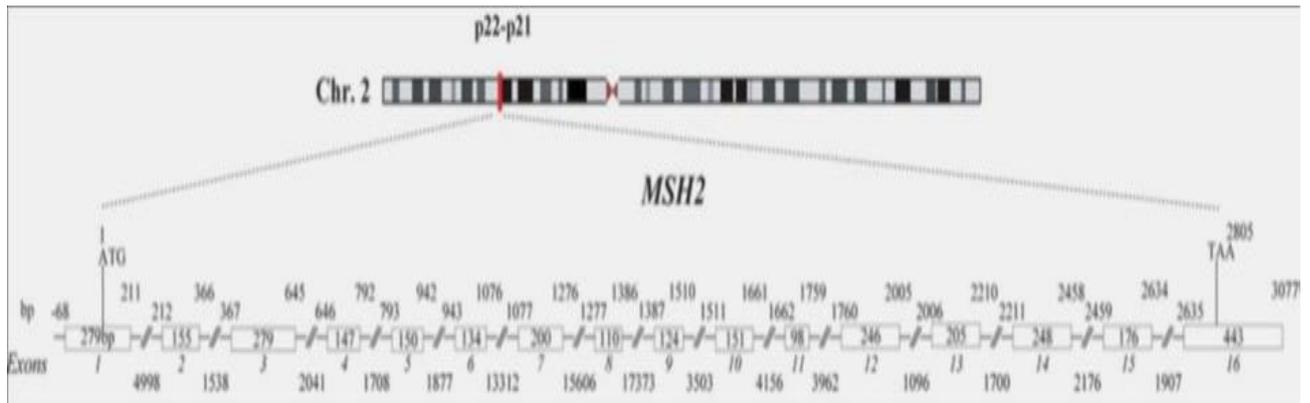
Les études de liaison génétique ont d'emblée révélé l'hétérogénéité génétique de ce syndrome en identifiant 2 locus morbides, 2p15-16 (plus tard redéfini en 2p22-21) et 3p21 (*Peltomaki et al., 1993*). Les gènes correspondant à ces loci morbides, appelés respectivement *MSH2* (MutS homolog 2, 16 exons) et *MLH1* (MutL homolog 1, 19 exons) ont pu être rapidement identifiés grâce à leur homologie avec les gènes bactériens *MutS* et *MutL*, impliqués dans la réparation des mésappariements de l'ADN (*Leach et al., 1993*). Dans des familles atteintes du syndrome de Lynch, des mutations délétères constitutionnelles ont été également identifiées dans le gène *MSH6* (2p16, 10 exons), autre homologue de MutS (*Akiyama et al., 1997*).

#### ➤ Gène *MLH1*

Le gène *MLH1* (MIM\_120436), localisé sur le chromosome 3 en position 3p21.3, comprend 19 exons. Il code pour une protéine de 84 kDa constituée de 756 acides aminés. La protéine est constituée de domaines très conservés et indispensables dans la fonction de coordination du système MMR, dont un domaine ATPase, un domaine de liaison aux homologues MutS (*MSH2* et *MSH6*), ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine partenaire constituant le dimère MutL (*PMS2* ou *MLH3*).

#### ➤ Gène *MSH2*

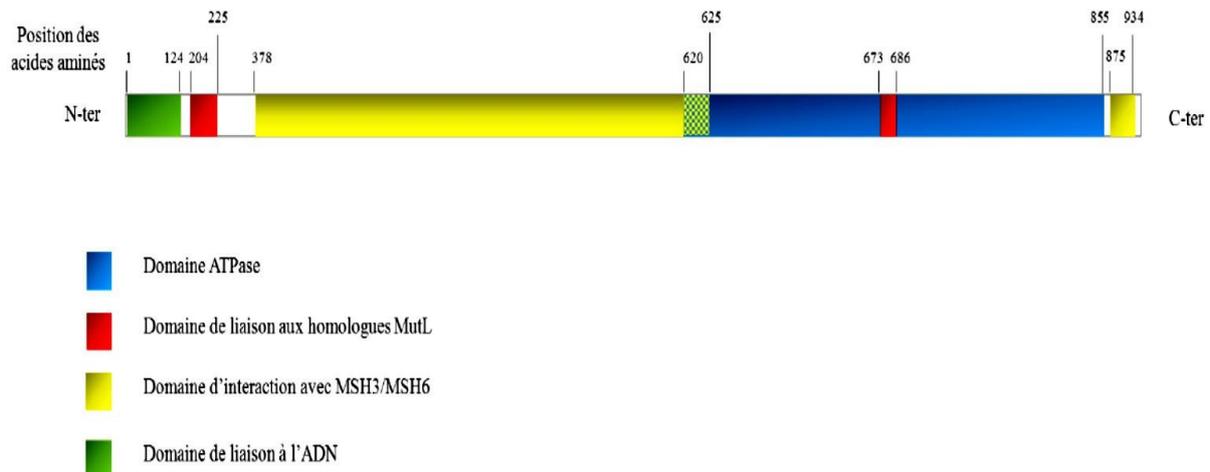
Le gène *MSH2* (MIM\_609309) est le premier gène *MMR* identifié en 1993 par analyse de liaison dans les familles où les tumeurs colorectales arboraient un profil MSI (*Peltomaki et al., 1993*). Il est situé sur le chromosome 2 en position p22-p21. Ce gène comprend 16 exons codant pour une protéine de 104 kDa constituée de 934 acides aminés (Figure 05).



**Figure 05 : Représentation schématique du gène *MSH2*.**

(<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

De manière analogue à la protéine MLH1, les domaines fonctionnels de la protéine MSH2 sont composés d'un domaine ATPase, un domaine de liaison aux homologues MutL (PMS2 et MLH1), ainsi qu'un domaine d'interaction avec la protéine partenaire constituant le dimère MutS (MSH3 ou MSH6). De plus, la protéine est composée d'un domaine d'interaction avec l'ADN, intervenant dans la reconnaissance du mésappariement (Figure 06).



**Figure 06 : Représentation schématique de la protéine MSH2** (Martín-López JV, Fishel, 2013).

## ➤ Gène *MSH6*

Le gène *MSH6* (MIM\_600678) est situé sur le chromosome 2 en position 2p16. Il comprend 10 exons, codant pour une protéine de 1360 acides aminés. Celle-ci est constituée d'un domaine ATPase, un domaine de liaison à la protéine PNCA, un domaine de liaison aux mésappariements et un domaine d'interaction avec la protéine MSH2.

## ➤ *PMS2*

Le gène *PMS2* (MIM\_600259), situé en position 7p22, comprend 15 exons codant pour une protéine de 862 acides aminés. Le gène *PMS2* comporte de nombreux pseudogènes (environ 15 sur le même chromosome), dont le pseudogène *PMS2CL* très proche du gène fonctionnel, qui

possède des exons quasi identiques aux exons 9 et 11 à 15 du gène *PMS2*, avec des conversions géniques fréquentes entre les deux (De Vos M et al., 2004) (Niessen RC et al., 2007).

EPCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule).

Le gène d'*EPCAM* comporte 9 exons codant pour une protéine de 314 acides aminés.

Des délétions du signal de transcription terminal d'*EPCAM* sont impliquées dans 1 à 2.8% des familles atteintes de SL (Sivagnanam et al., 2010) et surviennent par recombinaison médiée par des séquences répétées courtes de type SINE ou ALU (Kuiper et al 2011).

Ligtenberg et al. ont montré qu'une mutation de l'extrémité 3' du gène *EPCAM* (exons 8 et 9) pouvait être responsable d'un SL entraînant une extinction constitutionnelle de l'expression de *MSH2* par méthylation de son promoteur, situé en amont du gène (Figure 07).



**Figure 07 : Co localisation des gènes *EPCAM* et *MSH2***

Par ailleurs, l'expression d'*EPCAM* varie selon les tissus. De hauts niveaux sont retrouvés dans les cellules souches colorectales alors qu'ils sont faibles dans les leucocytes (Ligtenberg et al., 2009).

Le mécanisme d'inactivation du gène *MSH2* est lié à la délétion de la portion terminale du gène *EPCAM*, qui englobe le signal de terminaison de la transcription. Celle-ci se poursuit alors jusqu'au gène *MSH2*, situé en aval. Cette délétion provoque la formation d'un transcrite de fusion *EPCAM-MSH2* qui, par un mécanisme encore non élucidé, entraîne une méthylation du promoteur du gène *MSH2* et donc sa répression transcriptionnelle.

### 3-3-Mutations germinales dans le gène *MSH2*

Les mutations de gène *MSH2* représentent jusqu'à 45 % de l'ensemble des mutations des gènes MMR dans le SL. Les grands réarrangements, de type délétions, sont particulièrement représentés pour le gène *MSH2* (environ 20% de l'ensemble des mutations du gène *MSH2*), en raison de sa richesse particulière en séquences Alu, particulièrement sujettes aux recombinaisons intragéniques inégales favorisant les délétions (Di Fiore F et al., 2004) (Li L et al., 2006).

Des mutations fondatrices telles que la délétion des exons 1 à 6 du gène *MSH2* peuvent représenter jusqu'à 20 % des mutations dans certaines populations (Jacob S, Praz F 2002).

Les délétions des derniers exons du gène *EPCAM* (ou *TACSTD1*), gène situé 16 kb en amont du gène *MSH2*, ont été décrites comme responsables d'une hyperméthylation du promoteur du

gène *MSH2*. Elles représentent en moyenne entre 1 et 2,8 % des anomalies responsables de syndrome de Lynch et jusque 4 % dans certaines études (Ligtenberg *MJL et al.* ; 2009).

Ce mécanisme compte pour 10-40% des familles avec syndrome de Lynch dont les tumeurs affichent une perte d'expression de la protéine *MSH2* (Ligtenberg *MJL et al.*, 2009). Le risque de cancer de l'endomètre chez les personnes avec une délétion du gène *EPCAM* semble être étroitement lié à la taille de la délétion (Kempers *MJE et al.*, 2011).

Polymorphismes et variants des gènes MMR impliqués.

### 4-Polymorphismes et variants des gènes MMR impliqués

Les SNPs (Single Nucleotide Polymorphism) s'agissent de polymorphismes de substitution au niveau d'un nucléotide (variation de séquence ponctuelle). Les SNPs sont très nombreux (>107 par génome humain) et répartis dans tout le génome (environ 1 SNP tous les 300 pb) plus de 600 études de GWAS recherchant des associations entre des SNP et 150 pathologies différentes ont été publiées (Manolio, 2010).

Plusieurs variants des gènes du système MMR sont identifiés comme augmentant le risque de CCR sans pour autant être responsables d'un syndrome de Lynch (Allan *et al.*, 2008).

#### 4-1- Polymorphisme *MSH2*-118T>C

Le polymorphisme *MSH2*-118T>C est situé dans la région promotrice centrale 118 nucléotides de la transcription dans un site potentiel de la liaison au facteur de transcription (Shin, *K H. et al.*, 2002) ce polymorphisme possède un rôle potentiel d'affecter la transcription génétique du gène *MSH2* respective à un certain niveau et fait de bon candidat pour les allèles à faible pénétration qui contribuent au CCR.

*MSH2* est un gène MMR important et plusieurs études ont suggéré que les variations de *MSH2* sont associées à la sensibilité à la radiothérapie et à la progression de la maladie chez les patients atteints de cancer rectal (J *et al.*, 2018, 2019). Cependant, une certaine étude a révélé qu'il n'y avait pas d'association entre deux SNP dans ce gène (rs2303424 et rs2303425) et l'efficacité de la radiothérapie.

#### 4-2- Association polymorphisme rs2303425 et cancer CCR

Seule l'association du polymorphisme *MSH2* -118T>C avec les patients répondant aux critères d'Amsterdam I est restée statistiquement significative après correction de Bonferroni pour les comparaisons multiples (M. *Mrkonjic et al.*).

Une association similaire entre le variant *MSH2* -118T>C et les antécédents familiaux (selon les critères d'Amsterdam) n'a pas été observée parmi les cas de Terre-Neuve (M. *Mrkonjic et al.*).

La localisation de la tumeur, MSI de la tumeur, histologique et le stade de métastase des ganglions tumoraux des tumeurs n'étaient pas associés à l'allèle C de la variante 118T.C de *MSH2* parmi les patients de l'Ontario et de Terre-Neuve (M.Mrkonjic *et al.*).

### 4-3- Association polymorphisme rs2303425 et autres cancers.

**Tableau 03 : Les autres cancer Associés au cancer colorectale héréditaire**

Types de Cancer	Risque dans la population générale (à 70 ans)	Risque dans le syndrome de Lynch (à 70 ans)
Endomètre	1,5 %	30-40 %
Ovaire	1 %	9-12 %
Voies urinaires hautes	Moins de 1 %	4-10 %
Estomac	Moins de 1 %	13 % (plus élevé chez les asiatiques)
Intestin grêle	Moins de 1 %	1-3 %
Cerveau	Moins de 1 %	1-4 %
Voies biliaires	Moins de 1 %	1-5 %

## 5- Stratégies de diagnostic de Syndrome HNPCC

Le diagnostic de certitude du syndrome de Lynch repose sur l'identification de la mutation d'un gène MMR. Toutefois, le séquençage des gènes MMR est difficile, coûteux et de réalisation chronophage. D'où plusieurs approches incluant des critères cliniques, des modèles statistiques et des tests moléculaires tumoraux ont été établis afin de sélectionner les candidats potentiels aux tests génétiques.

Le phénotype tumoral est insuffisant pour établir le diagnostic du syndrome de Lynch. Ce dernier repose sur l'identification de la mutation constitutionnelle causale. Cependant, les techniques d'analyses étant lourdes et coûteuses, diverses stratégies intégrant les critères cliniques et le phénotype tumoral ont été développées et évaluées afin d'améliorer la probabilité d'identifier une mutation constitutionnelle. Un exemple de stratégie largement utilisée en France est résumé dans la (Figure 08).

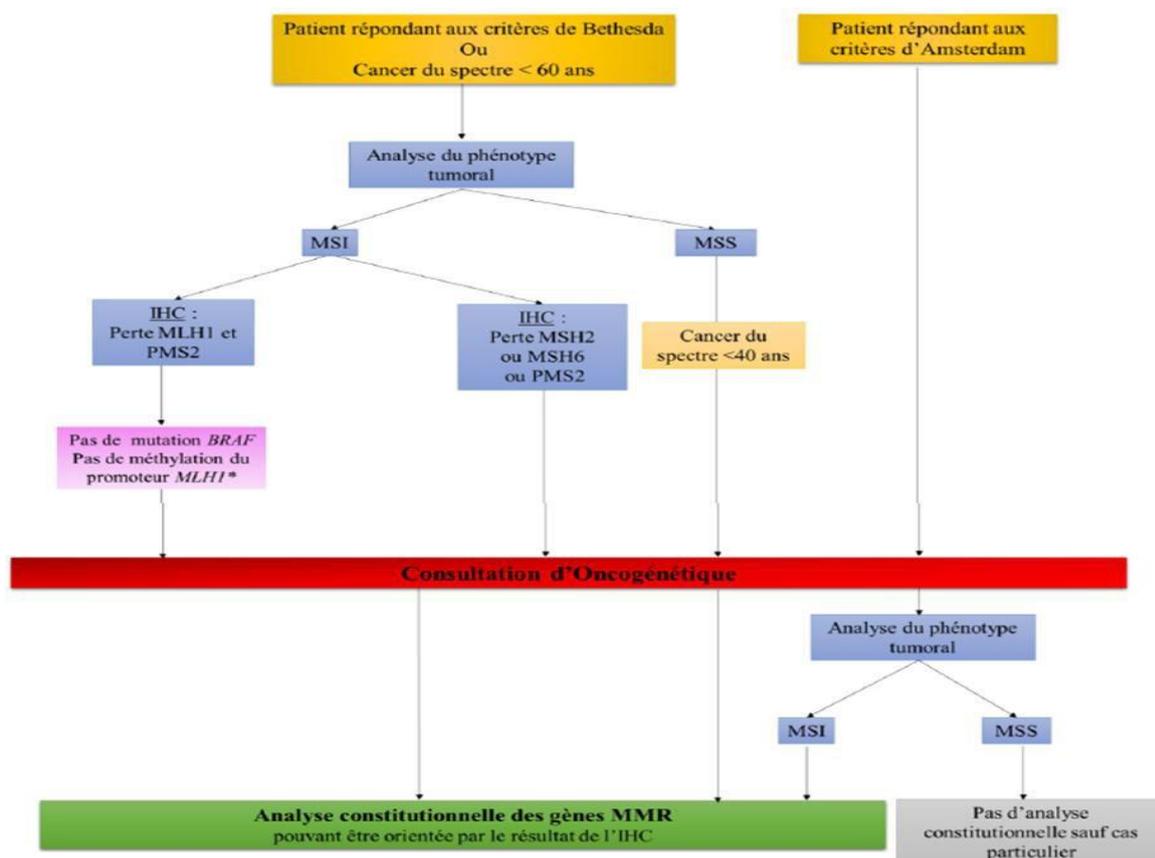


Figure 08 : Stratégie diagnostique du syndrome de Lynch (Olschwang S et al., avr 2004).

## 5-1-Diagnostic génétique

L'identification d'une mutation constitutionnelle délétère chez l'individu suspecté de syndrome de Lynch est indispensable afin de :

**-Poser le diagnostic formel de la maladie** : une surveillance adaptée sera alors recommandée (plan personnalisé de suivi selon les recommandations de l'INCa) .

**-Préciser le conseil génétique** : le syndrome de Lynch se transmettant selon un mode autosomique dominant, la descendance a un risque de 50% d'hériter de la mutation et d'un risque associé de cancer.

**-Proposer un test présymptomatique aux apparentés** : les personnes porteuses de la mutation familiale et donc à risque élevé de cancer seront invitées à adopter une surveillance spécifique, tandis que les non porteurs pourront en être exemptés. Pour ces derniers, le risque tumoral devient celui de la population générale.

Le diagnostic génétique consiste à identifier une mutation constitutionnelle sur un des quatre gènes MMR : *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*.

## Prise en charge de syndrome de lynch

Les sujets ayant un syndrome de Lynch nécessitent une surveillance planifiée afin de réduire

le risque néoplasique. Une surveillance régulière par des coloscopies permet de réduire l'incidence et la mortalité des CCR (*Byrne RM et al., 2018*).

Les recommandations ESMO incitent à pratiquer une colonoscopie tous les 1 à 2 ans à partir de l'âge de 20 – 25 ans. Pour le dépistage du cancer de l'endomètre, un examen avec échographie pelvienne, un dosage de CA-125 et des biopsies endométriales sont recommandés de façon annuelle à partir de l'âge de 30- 35 ans. ESMO recommande aussi, le dépistage et le traitement de l'infection à *Helicobacter Pylori* si présente ; sans recommandations de dépistage pour les autres tumeurs associées à ce syndrome (*Balmaña J et al., 2013*).

*Partie 2*  
*Etude*  
*expérimentale*

### Patients et Méthodes

#### 1- Patients

L'étude que nous avons menée est descriptive. Son objectif principal est de rechercher des mutations constitutionnelles dans le promoteur du gène de réparation de l'ADN (MMR) : *MSH2* le en se focalisant sur la détection du polymorphisme (-118 C>T) chez les cas index de 16 familles suspectées d'avoir un cancer colorectal de type Syndrome de Lynch.

##### 1-1- Recrutement des sujets

Le recrutement des cas intéressants pour cette étude a inclus 16 patients masculins et féminins. Les patients sont recrutés sur la base de preuves endoscopiques de cancer colorectal avec confirmation histologique. Ces patients sont admis au service d'oncologie (chimiothérapie et/ou radiothérapie) et au gastro-entérologie du CHU de Constantine.

Les patients retenus dans cette étude génétique étaient Amsterdam I (1991) (*Vasen et al., 1991*), II en (1999) (*Vasen et al., 1999*) et Bethesda (*Umar et al., 2004*) (Tableau B et C Annexe I). Ces critères recueillent des informations personnelles et généalogiques qui définissent cliniquement le syndrome HNPCC.

##### ➤ Critères d'inclusion des patients

Pour cette raison, les critères typiques du syndrome SL se produisent rarement dans la pratique clinique, de sorte que les sujets masculins et féminins ont été inclus et classés selon le groupe de patients.

- Répond à tous les critères Amsterdam I ou II (1999).
- Critères Bethesda avec histoire familiale (2004)
- Aucun antécédent familial de tumeur et répond aux critères de Bethesda (2004), mais le diagnostic a été posé avant l'âge de 45 ans.

##### 1-2- Questionnaire, enquête familiale et consentement

• La collecte des informations cliniques a été réalisée par des questionnaires remis directement aux patients atteints d'un cancer du côlon et/ou du rectum ou indirectement à partir de son dossier médical.

- Les examens familiaux ont été effectués en interrogeant le patient ou l'un de ses parents. Pour tous les patients, âge, sexe, cancer colorectal, autres cancers et relations entre apparentés.
- Développement de l'arbre généalogique le plus complet à partir des parents atteints de cancer familial et des antécédents familiaux de la maladie (Annexe II).
- Le consentement éclairé a été obtenu de tous les patients (Annexe II).

### 1-3- Prélèvement sanguin

#### ➤ Mode de prélèvement

Le prélèvement sanguin préconisé pour l'étude génétique dont l'extraction de l'ADN est recueilli stérilement dans un tube de type Vacutainer à EDTA (*anticoagulant et un inhibiteur des nucléases*) en quantité de 4 à 8 ml. Les prélèvements du sang ont été réalisés au niveau du pli du coude après la pose d'un garrot.

### 2-Méthodes

#### ➤ Résumé des différentes étapes méthodologiques de l'étude

La recherche d'altérations dans le gène *MSH2* a été réalisée par une PCR (*Polymerase Chain Reaction*) suivie d'un séquençage pour la détection de variations ponctuelles.

- Extraction de l'ADN à partir du sang total par la méthode au NaCl.
  - Conservation des ADN purifiés.
  - Amplification par PCR de promoteur de gène *MSH2*.
  - Contrôle des produits de PCR de ce promoteur par électrophorèse sur gel d'agarose (2%).
- Séquençage Direct.
  - Réalisation des produits de PCR.
  - Réalisation des réactions de séquences.
  - Purification des produits de séquences.
  - Réalisation de séquençage.
  - Alignement des séquences obtenues et comparaison par rapport aux séquences de référence pour identification des variations retrouvées.

#### 2-1-Extraction de l'ADN

L'ADN est extrait à partir des leucocytes sanguins. Ce que nous avons employé comme technique d'extraction dans notre étude est une méthode utilisant un solvant inorganique NaCl (*Miller et al., 1988*).

**Principe :** L'extraction de l'ADN consiste en :

- L'isolement de leucocytes du sang total par une lyse hypotonique des globules rouges .
  - Le traitement par un détergent (*SDS*) et une protéinase K dans le lysat ;
  - L'ADN nucléaire ainsi libéré est associé aux différentes protéines qui seront digérées et éliminées par précipitation au NaCl .
  - Le surnageant récupéré est traité par de l'éthanol pur dans lequel une pelote d'ADN se forme par précipitation .

- L'ADN est solubilisé en phase aqueuse (*Tris-EDTA 10 :1*) (*Annexe II Protocole*).

### ➤ **Evaluation de la pureté et quantification de la concentration d'ADN**

La pureté de l'ADN et sa concentration sont estimées par spectrophotométrie à UV.

**Principe :** La pureté de l'ADN est déterminée par le rapport de  $DO_{260nm} / DO_{280nm}$ . La densité optique ou DO à 260 nm des solutions diluées au 1/100 est utilisée également pour le dosage de l'ADN, ce qui permet de calculer sa concentration, sachant que 1 unité DO correspond à 50 mg/ml d'ADN (*Bienvenu et al., 1999*).

La pureté de l'ADN est essentielle. Dans le cas où l'ADN est contaminé (*par des protéines ou de l'ARN*), ce dernier ne laisserait pas aboutir à un bon résultat dans les étapes suivantes de son analyse par PCR. Il est donc indispensable de procéder à une réextraction de la pelote de l'ADN afin d'obtenir la pureté souhaitée.

Dans notre étude, nous avons procédé à un dosage de l'ADN et préparé une dilution de travail à 100µg/ml.

### ➤ **Evaluation de la qualité d'ADN extrait**

La qualité de l'ADN peut être confirmée en contrôlant la taille des molécules d'ADN par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % sur un courant de 100 volts pendant 2 heures. Cette analyse permet également d'observer la dégradation de l'ADN pouvant survenir lors de l'extraction (*Bienvenu et al., 1999*). Par conséquent, l'ADN génomique doit être manipulé pour éviter les effets mécaniques violents.

### ➤ **Conservation des ADNs purifiés**

Dans une boîte identifiée « ADN CCR » pour cancers colorectaux, les tubes d'ADN sont rangés et classés selon le numéro et la date du premier jusqu'au dernier échantillon. Ils sont conservés à +4°C jusqu'à utilisation (moins de 6 mois).

Les dilutions de travail (100µg/ml) à partir de nos ADN purifiés sont conservés à +4°C dans une boîte identifiée, « ADNs dilués ».

## **2-2-Amplification par PCR de promoteur de gène *MSH2***

**Principe :** La technique « Polymerase Chain Reaction » ou PCR (ou encore ACP pour amplification en Chaîne par Polymérase), est une technique de répllication ciblée *in vitro* (*K.Mullis en 1985, Prix Nobel 1993*).

L'amplification de séquences d'ADN à partir d'un échantillon complexe est réalisée par une succession de réactions de répllication d'une matrice double brin d'ADN.

➤ **Préparation des PCR :**

- **Amorces utilisées pour le gène *MSH2***

Les amorces utilisées dans notre étude pour l'amplification de gène *MSH2* sont commandées dessalées à la concentration de 100 µM (Invitrogen, et Biomatik). Elles sont conservées à -20°C.

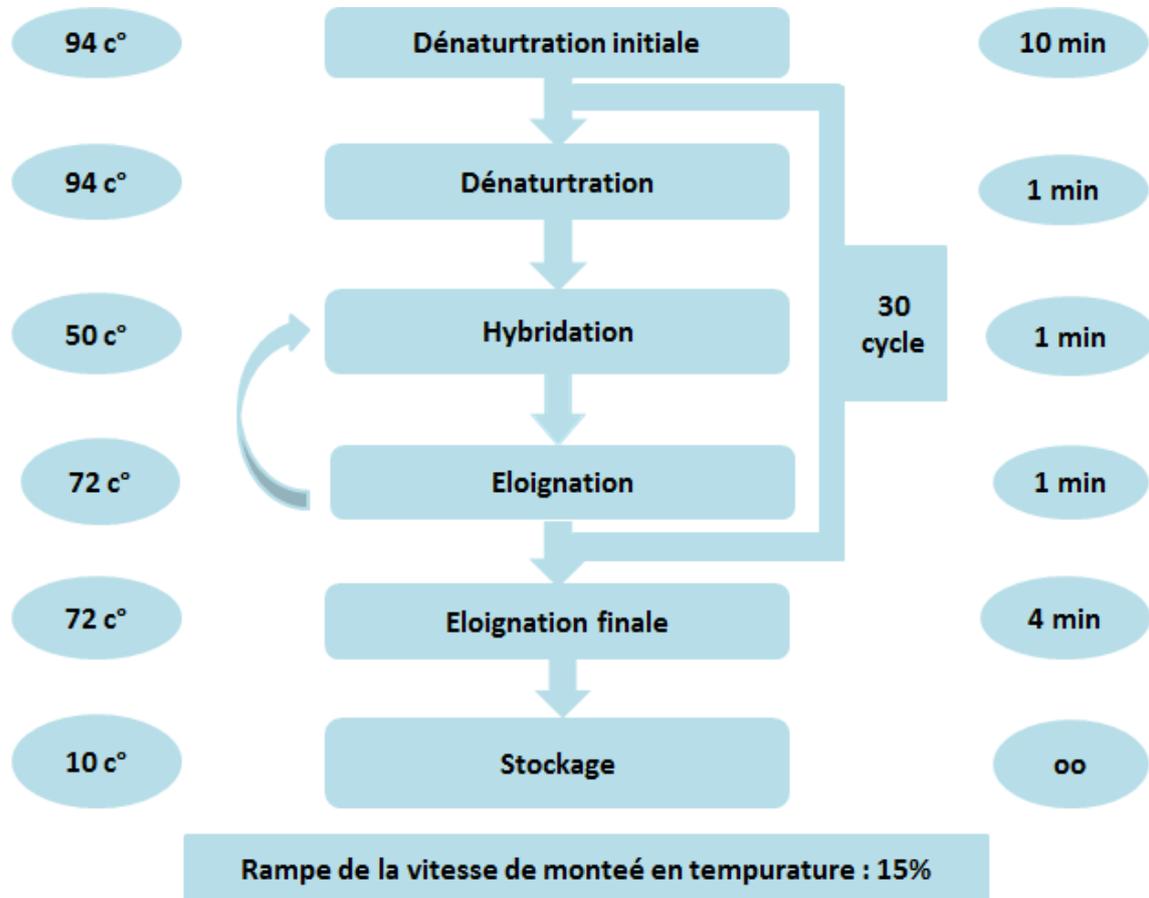
➤ **Réalisation pratique de PCR de gène *MSH2***

Le tableau 04 résume l'ensemble des compositions pour la préparation du milieu réactionnel des PCR.

**Tableau 04 : Composition du milieu réactionnel des PCR.**

<b>Produit</b>	<b>Conc. finale</b>	<b>µl par tube</b>
H <sub>2</sub> O ( <i>Eau ultrapure</i> )		10.4
Tampon II 10X ( <i>Applied Biosystems</i> )	1x	2.5
MgCl <sub>2</sub> 25mM ( <i>Applied Biosystems</i> )	1,5mM	1.5
DNTPs 10mM, 2.5 mM chaque ( <i>Applied Biosystems</i> )	200µM	2
<i>Taq</i> GOLD ( <i>Applied Biosystems</i> )	0,625U/µl	0.125
Am. F 5µM	0.6µM	3
Am. R 5µM	0.6µM	3
ADN 100µg/ml	250ng	2.5

Le programme sur thermocycleur (*Ref. Applied Biosystems Gene Amp PCR System9700*) donne la succession des étapes d'amplification (Figure 09).



**Figure 09 : Programme PCR de gène *MSH2***

➤ **Contrôle de la qualité et évaluation de la quantité de produits de PCR sur gel d'agarose**

Le contrôle de qualité de l'ADN à migration améliorée est effectué sur un gel d'agarose à 2 % (électrophorèse horizontale en cuve). La quantification de la taille est estimée à partir de la comparaison avec un marqueur de taille de type leader 100pb.

➤ **Préparation des gels d'agarose et migration**

Pour 100 ml de Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X + 2µl de Bromure d'Ethidium (BET) 10mg/ml 2g d'agarose (*EUROMEDEX type D5*) sont pesés.

3 µl de chaque amplicon sont déposés sur le gel d'agarose + 3µl de tampon de dépôt (*Bleu de bromophénol*) par puits et 5 µl de marqueur de poids moléculaire 100 pb (*Réf. EuromedexM-214*). L'électrophorèse est réalisée à 120 Volts pendant 45 minutes dans du tampon TBE 1X. L'ADN.

### 2-3- Réalisation du produit de PCR

Un coffret de différents kits est utilisé pour purifier le produit de PCR obtenu après amplification, des excès d'amocés et de nucléotides et des sels et d'autres impurités. Ce coffret contient des flacons de solutions (EB, PE, PB et des tubes avec colonnes) prêts à l'emploi après ajout de l'éthanol pour certains :

PE : 24 ml éthanol à ajouter

PB : 120 µl indicateur OH (rouge)

Dans le tube à colonne :

- Mettre 50 µl P de PCR centre de tube
- Ajouter 250 µl de PB
- Centrifugation 1 min à 1300 t/m
- Jeter le produit
- Ajouter 750 µl de PE
- Centrifugation à 1300 t/m 30 à 60 s (Centrifugation deux fois).
- Placer la colonne dans un tube eppendorf propre de 1.5 ml + 50 µl de EB et centrifugé à 1300

La solution éluée se conserve au congélateur jusqu'à utilisation.

### Séquençage

#### ➤ Principe de séquençage

Le séquençage des gènes consiste en la détermination de l'ordre dans lequel les nucléotides sont incorporés dans une séquence d'ADN. La méthode la plus fréquemment utilisée pour ce fait a été mise en évidence par Fred Sanger (1970). Les nucléotides sont liés les uns aux autres grâce à des liaisons phosphodiester qui se forment entre le groupement OH en position C3' du ribose du premier nucléotide et le groupement phosphate en position C5' du ribose du deuxième nucléotide. La méthode de séquençage de Sanger utilise des nucléotides didésoxyribonucléotides (*ddNTP*) qui ont un atome d'hydrogène à la place du groupement OH sur le carbone 3' du ribose. L'allongement du brin d'ADN s'arrête donc au niveau ddNTP incorporé, d'où terminaison de la synthèse de l'ADN (*Sedivcová et al., 2013*). Ces ddNTP sont marqués chacun par un fluorochrome spécifique. Quatre fluorochromes différents qui émettent après excitation par un faisceau laser des fluorescences de couleurs différentes. Chacune de ces couleurs physiques est convertie en une couleur informatique par un logiciel dédié au traitement de ces différentes fluorescences (*Brandis, 1999*).

Un kit BigDye terminator v3.1 cycle sequencing. (*Applied Biosystem Ref 4337457*) est utilisé dans cette réaction qui permet l'amplification de chacun des brins des exons étudiés séparément en utilisant pour chaque exon, une fois l'amorce F (*forward*) et une autre fois l'amorce R (*reverse*). Ces brins sont placés dans des puits différents de la plaque et sont mis dans le thermocycleur suivant le programme adapté à cette étape.

### 1-4- Réalisation des réactions de séquençage

Toute expérience de séquençage est soumise à des conditions de travail strict avec des précautions de manipulation à respecter. Dans la 1<sup>ère</sup> partie du travail, la préparation du Mix est réalisée dans une chambre « pré-PCR » dans des conditions de stérilité, selon le protocole suivant :

- 13,4µl d'eau.
- 2,6 µl Mix Bigdye.
- 16µl de mix dans chaque puits sont distribués + 2 µl d'amorce à 5µM.
- Par plaque : 2 puits sont laissés sans amorce pour l'orientation.

La 2<sup>ème</sup> partie du travail est effectuée dans une autre chambre « Pièce PCR ».

- La plaque recouverte d'un film autocollant est brièvement centrifugée.
- 2 µl de produit PCR purifié et dilué sont ajoutés dans chacun des puits de la plaque.

La plaque est mise au thermocycler.

### Programme thermocycler

- 96°C 30 sec
  - 96°C 20 sec
  - 50°C 5 sec
  - 60°C 4 min
- } 30cycles.
- 4° C infini

A la fin de ces étapes, les deux brins d'ADN amplifiés en présence des chromophores sont soumis à une 2<sup>ème</sup> étape de purification de séquence selon le principe ci-dessous.

### 1-5- Purification des produits de séquence

Cette procédure élimine les nucléotides en excès, les amorces et les sels qui n'ont pas été inclus dans la réaction. Cette étape est nécessaire pour préparer un échantillon pur pour une bonne séquence. La purification de la réaction de séquençage est réalisée à l'aide d'une colonne de gel d'exclusion de résine ultrafine.

La colonne de gel sephadex G50 est constituée de billes perforées dont les trous ont un diamètre déterminé (*de 20 à 50 µm*). Les petites particules de diamètre inférieur à ceux-ci entrent et sont piégées. A l'inverse, les grosses particules vont passer autour et être éluées très

rapidement.

➤ **Mode opératoire :**

**Préparer la plaque de purification :**

- Déposer la résine Sephadex G50 dans chaque puit ( $45\mu\text{l}$ ) du chargeur de colonne ;
- Retirer l'excès de résine avec la raclette ;
- Placer la plaque MultiScreen HV à l'envers sur le chargeur jusqu'au butoir et retourner l'ensemble ;
- Taper sur le chargeur pour évacuer la résine vers la plaque ;
- Placer la plaque MultiScreen HV sur une plaque de microtitration ;
- Ajouter  $290\ \mu\text{l}$  d'eau ultrapure dans chaque puit ;
- Remettre le couvercle et laisser gonfler 2 heures à température ambiante ;

A ce stade les plaques peuvent être conservées à  $4^{\circ}\text{C}$  2 jours.

**Procéder à la purification :**

- Centrifuger à 2450 tours/min pendant 5 min (à  $18^{\circ}\text{C}$ ) l'ensemble du montage pour éliminer l'eau et compacter les mini colonnes ;
- Vider la plaque de microtitration ;
- Transférer délicatement les produits PCR au centre des colonnes sans toucher le gel. (*Déposer goutte à goutte*).
- Centrifuger à 2450 tours/min pendant 5 min à  $18^{\circ}\text{C}$  ;
- Transférer le produit purifié sur une plaque adaptée à l'appareil du séquençage.

### 1-6- Électrophorèse capillaire

Les produits de séquence purifiés sont analysés sur le séquenceur ABI Prism 3130XL (AppliedBiosystem). L'électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes sépare les fragments d'ADN synthétisés en fonction de leur taille. L'enregistrement de fluorescence spécifique et l'analyse spectrale des ddNTP permettront d'attribuer les bases correspondantes et de déterminer la séquence nucléotidique du brin matrice (Annexe II, Figure A).

Analyses des séquences obtenues

Les données brutes sont stockées sur l'unité informatique associée au système séquenceur et analysées par un logiciel (Applied Biosystems). L'analyse et l'interprétation des résultats du séquençage passent par les étapes suivantes (Annexe II).

Validation de la qualité des séquences.

Alignement des séquences sur une référence et corrections.

Les graphes et les alignements sont placés dans le dossier-papier du patient.

Les variations identifiées issues de la comparaison aux séquences de référence utilisées sont

classées selon le type de chaque mutation entre polymorphismes, mutations pathogènes ou encore des variations de signification inconnue.

### **1-7- Bioinformatique**

Les numéros d'accès aux bases de données internationales pour les séquences de référence sont énumérés comme suit (*gène, transcrit, protéine*) :

*MSH2 (AC079775.6, NM\_000251.1, NP\_000242.1)*

### **1-8- Statistique**

Certains de nos résultats sont traités par des statistiques descriptives : calcul de la moyenne arithmétique, de l'écart type et les pourcentages.

### Résultats et discussion

Dans cette partie expérimentale, nous avons procédé en la répartition et au classement des cas index ayant un CCR de type syndrome de Lynch, en fonction du sexe et de l'âge au moment du diagnostic. Ensuite, ont été prises en considération certaines caractéristiques cliniques : site tumoral, stade de la tumeur, existence d'autres localisations tumorales et antécédentes personnels et familiaux de cancers. Puis nous nous sommes intéressés à décrire les critères généalogiques héréditaires et le l'aspect de transmission génétique de cette pathologie chez les familles incluses dans l'étude.

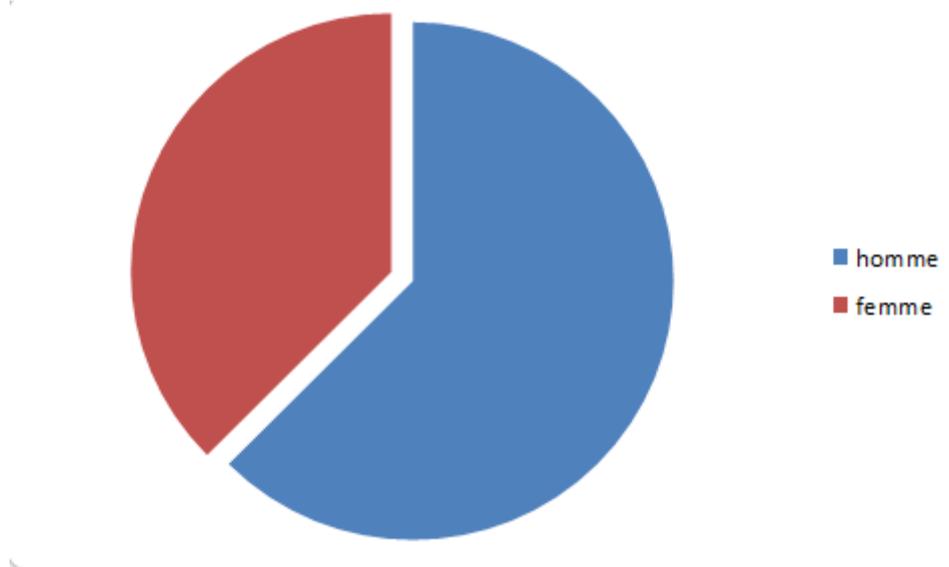
#### 1-Répartition des sujets selon l'âge et le sexe

##### ➤ Répartition selon le sexe

Les sujets présentant un Cancer colorectal sont au nombre de 16 répartis entre :

- ✓ 10 de sexe masculin soit 62,5%
- ✓ 06 de sexe féminin soit 37,5 %

Cette répartition est illustrée par la **figure 10**.

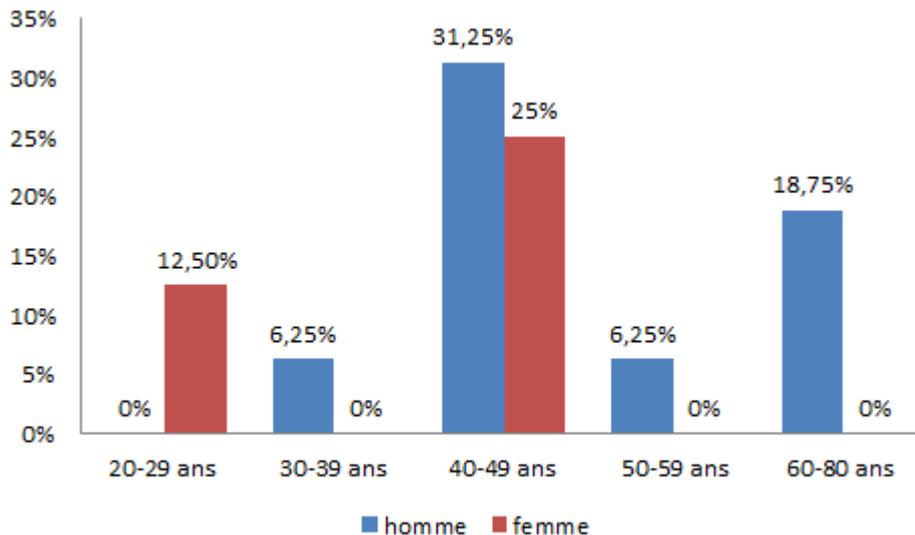


**Figure 10 : Répartition des patients selon le sexe**

Dans notre série, le nombre de cas de cancer colorectal des hommes dépasse le nombre de cas femmes. Le sex-ratio est de 1,35. Ce qui a été retrouvé dans l'étude épidémiologique réalisée à travers l'Ouest algérien dans une période allant de 2000 à 2006 où l'échantillonnage comporte 501 patients atteints de cancer du côlon (272 hommes, soit 54 % et 229 femmes, soit 46 %) avec une sex-ratio de 1,2 (*Meddah, D, 2009*) . Les résultats obtenus s'approchent de l'étude française de Rougier.P (2004) au sex-ratio de 1,5 démontrant cette légère prédominance masculine d'atteinte par le cancer du côlon. Cependant dans la littérature

occidentale, la prédominance masculine est plus marquée sex-ratio compris entre 1,5 et 2. Rougier, P. (2004).

➤ **Répartition selon le sexe et les tranches d'âge :**



**Figure 11 : Répartition des malades atteints d'un CCR selon l'âge et le sexe**

- **Sujet jeune moins de 40 ans**

Dans notre série, les patients âgés de moins de 40 ans représentent 18,75% de l'ensemble des patients atteints d'un cancer colorectal. Dans les pays occidentaux comme les Etats-Unis, la France et l'Ecosse, le cancer colorectal du sujet jeune représente **1%** à **4%** Alici et al (2003). Le CCR du sujet jeune serait beaucoup plus fréquent dans les pays du Moyen-Orient : **18%** en Turquie Rougier, P. (2003). **38%** en Egypte (Boutron et al., 2005), où on attribue principalement, cette fréquence particulièrement élevée du CCR chez le sujet jeune à la distribution naturelle de la pyramide des âges, avec seulement **5,7%** des patients de plus de 60 ans. Il est possible que cette explication soit valable dans notre étude, d'autant plus que Les patients âgés de plus de 60 ans représentent 18,75% dans notre série, alors que dans la littérature occidentale, ils représentent **40%** (FOURNET, J. Avril 2003) Car, la population algérienne est plus jeune que la population en occident. Dans notre cas, la population d'étude appartient à un groupe atteint par la forme héréditaire, le syndrome de Lynch. Le SL étant caractérisé par une atteinte précoce du cancer. Notre population d'études est jeune avec des personnes de moins de 40 ans représentant environ 2/10 des cas.

Nos résultats montrent que la tranche d'âge la plus représentative est celle de 40-49 ans avec 81,25%. Ceux-ci concordent avec de nombreuses études qui ont démontré que

l'apparition de CCR de type SL commence à un âge jeune et s'accroît à partir de 40 ans ne dépassant pas 50 ans (*lynch et al., 2008 ; moussa et al., 2011*).

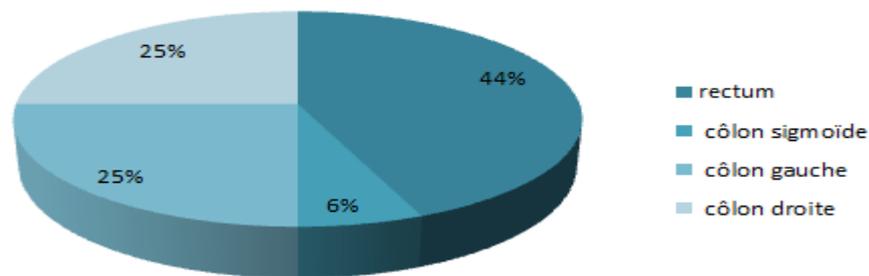
### - Sujets âgés entre 40 et 80 ans

Les données d'épidémiologie descriptive ont permis de définir d'une manière générale la population à risque ; ce sont des sujets de plus de 40 ans, à légère prédominance masculine ; cela peut être dû à l'accumulation croissante avec le temps de facteurs cancérogènes et la réduction avec l'âge, des défenses de l'organisme, en particulier des défenses immunitaires (*Arsene et al, 1995*), et la prédisposition génétique (*Hill, C. (1997)*). La survenue d'un cancer colorectal chez un sujet âgé était un facteur de mauvais pronostic selon les études faites (*Astorga, P et al., 2002*), O'Connell, JB et al (2003) qui peut être expliqué par sa découverte à un stade tardif

## 2- Répartition des probants SL selon les caractéristiques cliniques

### ➤ Selon la localisation de la tumeur

La figure 12 montre la distribution des individus cancéreux selon la localisation de la tumeur



**Figure 12 : Répartition des patients SL selon la localisation de tumeur**

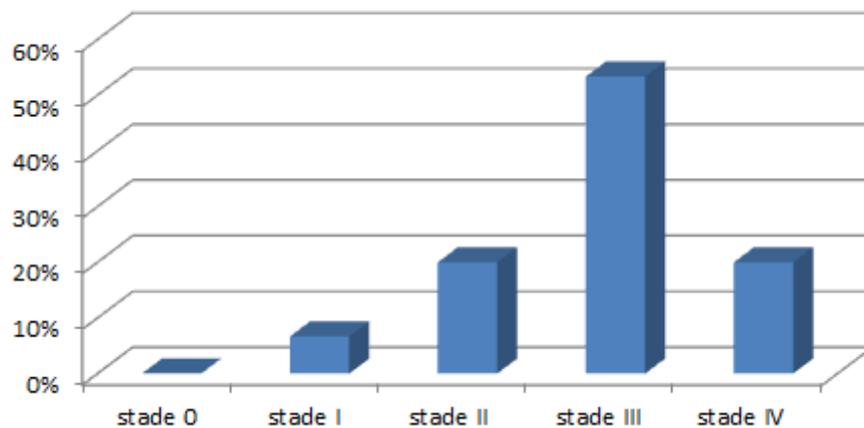
Concernant la localisation de ce type de cancer, nos résultats montrent que le rectum est le site tumoral le plus fréquent, il touche 44% des cas, suivi par le côlon droit et le côlon gauche avec 25 % des cas pour chacun, et 25% des cas pour le côlon droit, finalement 6% pour le côlon sigmoïde. Nous pouvons donc conclure que le rectum est le plus affecté par le CCR dans notre population d'étude chez les deux sexes en accord avec plusieurs études.

Nos résultats sont semblables avec les résultats du (*Meddah et al., 2009*) et les travaux de (*Fabre et al., 2000 ; Jandova et al., 2015*) qui ont montré que l'incidence du cancer du côlon distale descendant est supérieure à celle du cancer du côlon ascendant, inversement aux résultats du (*Davies et al., 2005 ; Arriba et al., 2016 ; Bouguenouch et al., 2016*) qui ont

montré que les CCR dans le SL ont tendance à avoir une localisation proximale avec une prédominance du colon droit.

### 3-Répartition des patients SL selon le stade d'évolution de la tumeur

La classification TNM a fait l'objet d'un consensus international, le stade doit donc être donné selon la classification pTNM, qui distingue quatre stades notés de I à IV (*Edge et Compton, 2010 ; Scoazec et Sabourin, 2010*). La distribution de nos patients selon ces stades est illustrée dans la figure 13.



**Figure 13 : Répartition des patients SL selon le stade de la tumeur**

D'après cette classification, la population étudiée présente une prédominance du stade III avec une fréquence de 56.33%, suivi du stade II à 20 %, la fréquence du stade IV est de 20 %, et le stade I fréquence de 6,66 % on note qu'aucun de nos patients étudiés n'appartient au stade 0. Cette distribution est proche de celle obtenue par une étude antérieure à l'Est algérien) *Ziada et al. (2016 Oukkal et Bouzid (2006)* dans le centre Alger et celle retrouvée par l'étude épidémiologique effectuée sur l'Ouest algérien *Meddah et al., (2009)*.

Cependant le statut clinique dans nos résultats ne concorde pas avec certaines études de la littérature qui montrent que la proportion des malades CCR présentant les stades III et IV est moins fréquente (44.6%) que celle des stades I et II (55.4%) (*Chan et al., 2010*).

Ces résultats s'expliquent par plusieurs causes :

Les patients arrivent aux centres cliniques à un stade tardif dû de l'absence de signes généraux de la maladie, par négligence, absence de douleur, manque de motivation, la peur du résultat, et une insuffisance d'informations.

Une survenue précoce du syndrome de Lynch dont le risque élevé de CCR n'est pas tant lié à l'initiation de la cancérogenèse qu'à une accélération de la séquence adénome-carcinome

(Lynch et Chapelle, 1999). Dans le syndrome de Lynch, un adénome peut se transformer en adénocarcinome en l'espace de 2 à 3 ans, contre 8 à 10 ans chez une personne dans la population générale (Grady et Carethers, 2008).

Les malades qui ne respectent pas une surveillance régulière, augmente pour eux le risque de récursive.

Il n'y a pas de compagnie médicale et sociale de dépistage et de prévention.

La survie des patients ayant un cancer colorectal dépend de différents facteurs pronostiques parmi lesquels, le stade du cancer, l'atteinte ganglionnaire et la présence de métastases (*la classification TNM*). Il est donc intéressant de connaître le stade d'évolution dans la mesure où le cancer colorectal est un cancer de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué à un stade précoce. Le taux de survie relative à 5 ans varie en fonction de la classification TNM : 94 % pour les cancers diagnostiqués au stade I ; 80 % au stade II ; 47 % au stade III et 5 % au stade IV (Grosclaude et al., 2013).

#### 4- Répartition des patients SL par rapport aux critères d'Amsterdam et de Bethesda

Notre travail de tri des patients a porté sur l'analyse fine des questionnaires et du diagnostic. A partir des différentes données de ces enquêtes, nous n'avons recruté dans notre étude que ceux, chez qui les critères d'Amsterdam I / II ou Bethesda sont réunis. Il faut noter que ces critères de reconnaissance du syndrome HNPCC ne sont pas pris en compte en pratique clinique du fait de leur rareté chez les patients atteints de CCR. Nous avons réparti nos patients selon ces critères en deux groupes :

- 1- Patients répondants aux critères complets d'Amsterdam I ou II (1999).
- 2- Patients répondants aux critères de Bethesda

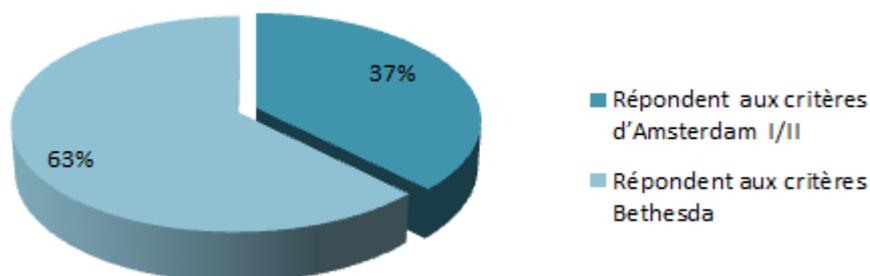


Figure 14 : Répartition des cas SL selon les critères d'Amsterdam I/II et de Bethesda avec ou sans antécédents familiaux

D'après nos résultats, les critères Bethesda sont présents pour la majeure partie de notre population d'étude avec une fréquence de 62.5 % (10 de 16) de nos familles ayant un SL et Les critères de d'Amsterdam I/II représentent 37.5 %.

Il apparait que les critères d'Amsterdam II sont très spécifiques du syndrome de Lynch mais sont peu sensibles : un grand nombre de porteurs de mutations sur les gènes MMR ne répond pas toujours à ces critères (*Olschwang et Eisinger, 2005*). Il ne faut donc pas se limiter à ces seuls critères pour l'accès à une consultation d'oncogénétique. Les critères de Bethesda établis en 1997 puis révisés en 2004 permettent d'identifier les familles à risque et de mutation du gène MMR (*Carneiro da Silva et al., 2015*). Ce qui pourra être recommandé dans le test d'instabilité de microsatellites sur les pièces de cancer colorectal. Bien que les critères de Bethesda sont plus sensibles que les critères d'Amsterdam pour identifier les familles à risques de SL, mais ils ne sont pas spécifiques parce que le statut MSI est présent sur 15 % des tumeurs sporadiques. Tout patient répondant aux critères d'Amsterdam ou Bethesda devrait avoir un test génétique pour confirmation (*INca 2011*).

### 5- Les Arbres généalogiques de quelque patient

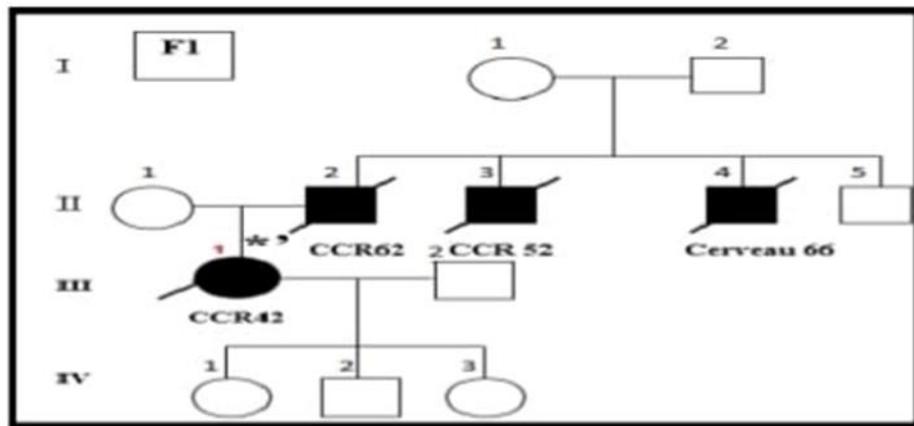


Figure 15 : Arbre généalogique de la famille F1

**F1** : - Cas index : III 1

- L'âge de diagnostic : 44 ans
- Nombre des sujets atteints dans la famille : 3
- Répondants aux critères d'Amsterdam II

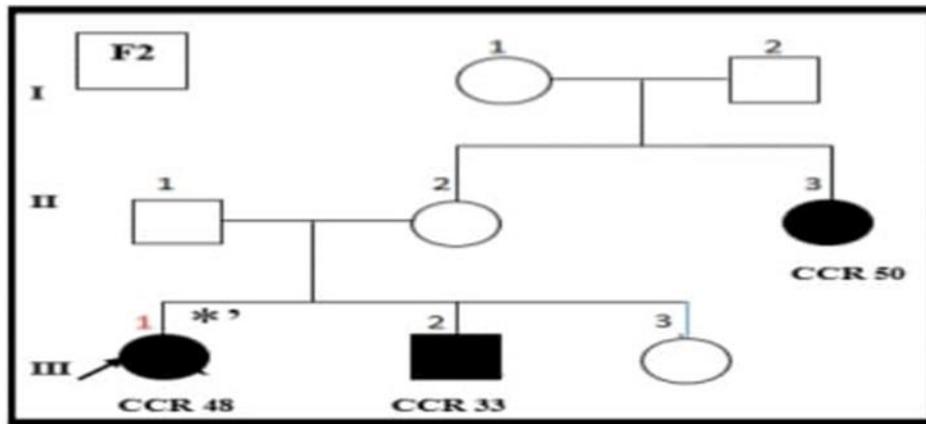


Figure 16 : Arbre généalogique de la famille F2

**F2** : - cas index : III 1

- L'âge de diagnostic : 48 ans
- Nombre des sujets atteints dans la famille : 2
- Répondants aux critères d'Amsterdam II

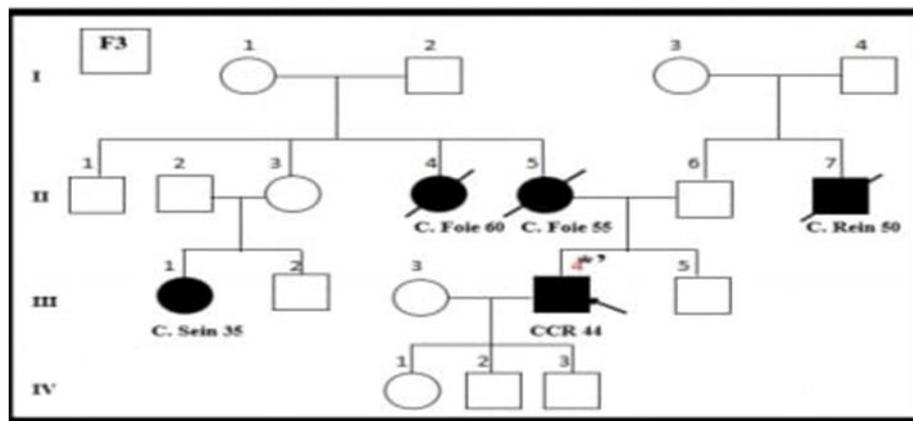


Figure 17 : Arbre généalogique de la famille F3

**F3** : - cas index : III 4

- L'âge de diagnostic : 44 ans
- Nombre des sujets atteints dans la famille : 4
- Répondants aux critères d'Amsterdam II

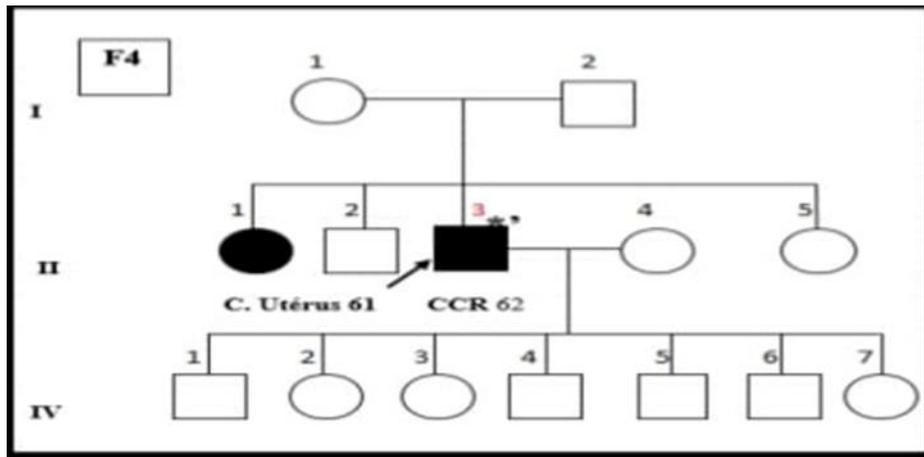


Figure 18 : Arbre généalogique de la famille F4

- F4** : - cas index : III 3
- L'âge de diagnostic : 61 ans
  - Nombre des sujets atteints dans la famille : 1
  - Répondants aux critères d'Amsterdam II

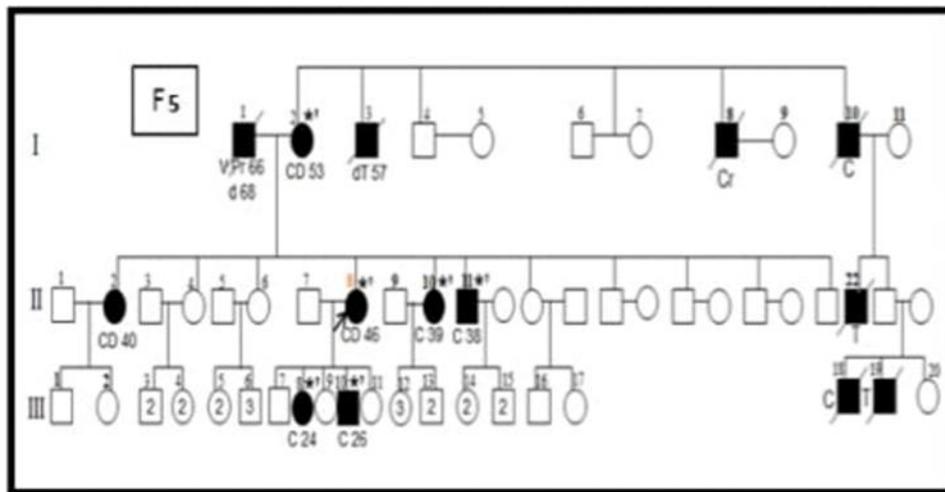


Figure 19 : Arbre généalogique de la famille F5

- F5** : - cas index : III 8
- L'âge de diagnostic : 46 ans
  - Nombre des sujets atteints dans la famille : 4
  - Répondants aux critères d'Amsterdam II

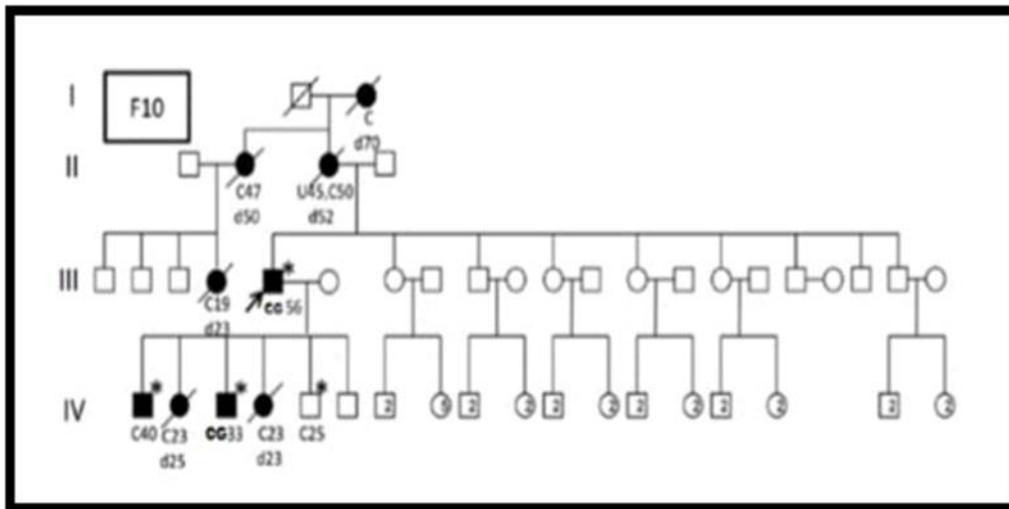


Figure 20 : Arbre généalogique de la famille F10 porteuse de la mutation

F2 : - cas index : III 5

- L'âge de diagnostic : 56 ans
- Nombre des sujets atteints dans la famille : 8
- Répondants aux critères d'Amsterdam I

De plus, j'ai également remarqué que dans la famille F10, les femmes (<25 ans) ont un âge plus précoce et plus grave d'apparition et de décès du cancer que les hommes (>30 ans). D'autre part, bien que certains patients aient des mutations familiales, ils ont la chance de ne pas développer de cancer comme les membres IV5.

D'un point de vue génétique, une explication cruciale est que malgré la présence de gènes MMR mutés, le taux de pénétrance n'est pas de 100 %, il y a donc une différence de pénétrance entre les porteurs. La cellule n'est pas atteinte. Cependant, ces recommandations doivent être étudiées en profondeur et confirmées par un grand nombre de cas de cancer colorectal. Cette observation peut avoir des implications importantes pour la prise en charge médicale et le suivi des patients et de leurs proches (Dowty *et al.*, 2013).

➤ **Polymorphismes sur les parties régulatrices**

- **Le SNP c. -118 T>C (rs2303425) du gène *MSH2***

Polymorphisme C. Le -118T>C sur le promoteur du gène *MSH2* (rs2303425) a été détecté chez 3 patients SL de notre population d'étude, le patient F1 âgé de 30 ans ayant un cancer du côlon gauche, la patiente F2 de 29 ans avec un cancer du côlon droit et la patiente F3-1 (46 ans), ayant un cancer du côlon droit, est le cas index de la famille répondant aux critères d'Amsterdam II.

Mrkonjic et al (2007) ont observé une forte association entre le polymorphisme rs2303425 du gène MSH2 et les antécédents familiaux de cancer colorectal, répondant aux critères d'Amsterdam I ( $p = 0,005$ ), aux critères d'Amsterdam I et II ( $P = 0,036$ ). Patients en Ontario. Cette association est plus particulièrement évidente chez les femmes atteintes d'un cancer colorectal en Ontario (*Mrkonjic et al., 2007*), et cette situation correspond à l'état de notre patiente F3-1.

Bien que les causes du cancer soient différentes, la plupart des études ont étudié la relation entre ce polymorphisme, rs2303425 sur le gène MSH2, et la susceptibilité à ces types de cancers : il a été découvert que ce SNP pouvait être lié à la susceptibilité au cancer. (*Mrkonjic et al., 2007*), le cancer de la vésicule biliaire (*Srivastava et al., 2010*), le cancer gastrique (*Xiao et al., 2012*) et le récent cancer du sein précoce (*Hsieh et al., 2016*). Cependant, il n'y a aucune preuve qu'il existe une association entre le polymorphisme rs2303425 et le risque de cancer du poumon (*Lo et al., 2011*).

L'explosion des travaux scientifiques dans le domaine de la génétique des cancers permet actuellement d'améliorer la connaissance des mécanismes. En effet, grâce à l'avènement des techniques de biologie moléculaire, la caractérisation des facteurs de susceptibilité génétique progresse significativement.

Compte tenu de l'importance du système de réparation de l'ADN dans les mécanismes de cancérogénèse, nombreuses sont les études épidémiogénétiques portant sur l'implication des polymorphismes des gènes de ce système dans la survenue de différents cancers qui ont été entreprises sur des populations d'origines ethniques différentes. Néanmoins, les résultats de ces études divergent très souvent.

Ce travail s'inscrit suite à une longue liste de travaux qui consiste à étudier les déterminants de la susceptibilité génétique dans la survenue du cancer colorectal. L'exploration, par séquençage, de SNP -118C<T sur le gène *MSH2* chez des familles algériennes ayant un Syndrome de Lynch est la première réalisée sur le CCR dans la population de l'Est algérien.

Nos résultats montrent que les critères d'Amsterdam I / II sont présents chez 37% de nos familles ayant un syndrome de lynch. Cependant ceux de Bethesda représentent la majeure partie de notre population d'étude avec une fréquence de 63%, réparti en 38% sans antécédents et 25% avec antécédents familiaux.

Concernant la localisation de la tumeur, une fréquence plus élevée au niveau du rectum par rapport aux autres parties du colon ; une prédominance de stade III par rapport aux autres stades ; ceci peut être expliqué par un diagnostic qui est souvent tardif.

On ne peut pas avoir une 'évaluation précise de la présence du risque de prédisposition génétique à ce type de cancer chez un patient atteint.

Dans l'avenir, il serait mieux d'élargir le nombre des patients dans une étude plus approfondie (cas-témoins) dans laquelle on fait l'identification de mutations dans les gènes MMR au moment du diagnostic chez les personnes touchées par ce syndrome afin qu'ils bénéficieront d'une surveillance et d'un suivi spécifique et régulier pour la gestion de la maladie. Ce type d'études moléculaire deviendrait impératif pour le suivi et la bonne prise en charge de ces patients et de leurs apparentés.

Finalement, cette étude nous a permis d'acquérir des compétences dans le domaine de l'épidémiologie génétique que nous pourrons mettre à profit dans l'étude de la prédisposition génétique de notre population à d'autres maladies

*Références  
bibliographiques*

- Abou-Zied**, A.Khafagy, W. Marzouk, et al , (2002). Colorectal cancer in Egypt. *Dis Colon Rectum* ; 45 (9) : 1255 – 60.
- Aexander**, J., Watanabe, T., Wu, TT et al., (2001). Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *The American journal of pathology*, 158(2), 527-535.
- Akiyama**, Y., Sato, H., Yamada, et al, (1997). Germ-Line Mutation of the hMSH6/GTBP Gene in an Atypical Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Kindred. *Cancer Res.* 57,3920–3923.
- Alici**, S. Aykan, Sakar, NF.Bulutlar, B.Kaytan, G.Topuz. E (2003). Colorectal cancer in young patients : characteristics and outcome. *Tohoku j Exp Med* ; 199 (2) : 85-93.
- Allan**<sup>1\*</sup>, Jennifer Shorto<sup>2</sup>, Julian Adlard<sup>3</sup>, et al, (2008) MLH1 293G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer ; on behalf of the UK NCRI Colorectal Clinical Studies Group and the Colorectal Cancer Study Group ; 123, 2456–2459.
- Al-Tassan**, N., Chmiel, N.H., Maynard, et al. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G :C-->T ; A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 30, 227–232.
- Ames BN**, (1989). Endogenous oxidative DNA damage, aging, and cancer. *Free Radic Res Commun* ; 7 :121-128.
- Aretz**, S., Stienen, D., Friedrichs, et al, (2007). Somatic APC mosaïsme : à frequent cause of familial adenomatous polyposis (FAP). *Human mutation*, 28(10), 985-992.
- Arne S**, Nicole M. et al (2002) *Anatomie Physiologie Biologie. Système digestif, nutrition et métabolisme* ; 2 ème Ed ; 322-361.
- Arriba**, M., Sánchez, R., Rueda, et al. (2016). Toward a Molecular Classification of Synchronous Colorectal Cancer : Clinical and Molecular Characterization. *Clin. Colorectal Cancer*.
- Arsene**, D. Chomontowski, J, Pottier, (1995). Épidémiologie et pronostic des carcinomes gastriques dans le département du Calvados : étude sur dix ans. *Gastroenterol Clin Biol* 19:797–803.
- Arvelo**, F., Sojo, F & Cotte, C.(2015).Biology of colorectal cancer.
- AYKAN** N.F. (2015). Red Meat and Colorectal Cancer. *Oncol Rev.* 28 ;9(1) :288.
- Balmana**, J., Balaguer, F., Cervantes, et al. (2013). Familial risk-colorectal cancer ESMO clinical practice guidelines. *Annals of oncology*, 24, 73-80.
- Beauchemin**, N. (2011). The colorectal tumor microenvironment the next decade. *Cancer Microenviron. Off. J. Int. Cancer Microenviron. Soc.* 4, 181–185.
- Boland CR**, Goel A, juin (2013). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* ;138(6) :2073-2087.

**Boland**, C.R. (2006). Decoding hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 354, 2815–2817.

**Bouguenouch**, L., Samri, I., Belhassan, et al. (2016). Syndrome de Lynch : à propos d'un cas

Boutron, R., Laurant, MC, Puig, P et al. (2005). Épidémiologie cancérogène, facteurs de risque, prévention et dépistage du cancer colorectal. *Traité de gastro-entérologie*. Deuxième édition Flammarion. : 538 – 550

**Bouvier**, A.-M., Manfredi, S et al, (2002). The natural history of colorectal cancer revisited. *Gastroentérologie Clin. Biol.* 26, B56-61.

**Boyle P**, Ferlay J, (2004). Cancer incidence and mortality in Europe ; 16, 481-8.755.

Byrne, R. M., & Tsikitis, et al (2018). Colorectal polyposis and inherited colorectal cancer syndromes. *Annals of gastroenterology*, 31(1), 24-34.

**Camilla Pilati** <sup>1</sup>, Pierre Laurent-Puig, (2020). Centre de recherche des Cordeliers inserm, Sorbonne Université, Université de Paris Personalized Medicine, Pharmacogenomics, Therapeutic OPTimization (MEPPOT) Team (25-8).

**Capocaccia**, R., Gatta, G., and Dal Maso, et al. (2015). Life expectancy of colon, breast, and testicular cancer patients : an analysis of US-SEER population-based data. *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 26, 1263–1268.

**Chan**, D.S.M., Lau, R., et al, (2011). Red and processed meat and colorectal cancer incidence

Cheng YW, Pincas H, Bacolod MD, et al (2008) CpG island methylator phenotype associates with low-degree chromosomal abnormalities in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 14 : 6005-6013.

**Compton CC**, Fielding LP, Burgart LJ, et al, Corresponding author: Balraj Mittal, PhD, Department of Genetics, SGPGIMS, Lucknow-226014 .

**Cp**, Penna, P., E, T., et al (1991). Value of screening of familial adenomatous polyposis for the prevention of colorectal cancer. *Gastroenterol. Clin. Biol.* 16, 210–214.

**Dat Chouhan**, J., Batra, S., Gupta, et al. (2016). Gastrointestinal follicular lymphoma: using primary site as a predictor of survival. *Cancer Med.* 5, 2669–2677.

**Davies**, R.J., Miller, R., and Coleman, et al (2005). Colorectal cancer screening : prospects for molecular stool analysis. *Nat. Rev. Cancer* 5, 199–209.

**De Vos M**, Hayward BE, Picton S, et al (2004) . Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet.* mai

Di Fiore F, Charbonnier F, Martin C, et al, janv (2004) . Screening for genomic rearrangements of the MMR genes must be included in the routine diagnosis of HNPCC. *J Med Genet.* 41(1):18-20.

**DOI:** 10.1002/cncr.25063, Received: June 15, 2009; Revised: September 9, 2009; Accepted:

Dowty, J.G., Win, A.K., Buchanan, et al. (2013). Cancer Risks for MLH1 and MSH2 Mutation Carriers. *Hum. Mutat cer J. Clin*, 2006 ; 56,106–130

**Drummond**, J. T., J. Genschel, et al , (1997) . DHFR/MSH3 Amplification in Methotrexate-Resistant Cells Alters the HMutSalpha/HMutSbeta Ratio and Reduces the Efficiency of Base-Base Mismatch Repair. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* ; 94(19): 10144–10149.

**Edge**, S.B., and Compton, et al , (2010). The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1471–1474.

**Engel**, C., Loeffler, M., Steinke, et al , (2012). Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30,4409–4415.

**Fabre**, E., Spano, J.P., et al , (2000). Le cancer du côlon : mise en point. *Bull. Cancer (Paris)* 87, 5–20.

**Ferlay**, J. Bray, F. Pisani Parkin, et al , (2002). Cancer incidence, mortality and prevalence worldwide. Paris: GLOBOCAN. 240 pages

**Flejou**, J.-F. (2008). Lésions précancéreuses et MICI Aspects anatomopathologiques.

Floyd RA ( 1990 ). Role of oxygen free radicals in carcinogenesis and brain ischemia.;4:2587-2597.

**Fortune**, J. M., Y. I. Pavlov, et al. (2005) *Saccharomyces Cerevisiae* DNA Polymerase Delta : High Fidelity for Base Substitutions but Lower Fidelity for Single- and Multi-Base Deletions. *The Journal of Biological Chemistry* 280(33): 29980–29987.

**Ganai**, R. A., and E. Johansson , (2016) DNA Replication-A Matter of Fidelity. *Molecular Cell* 62(5) : 745–

*Gastroenterology*;133 : 48-56.

**Gatalica**, Z., and Torlakovic, E. (2008). Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam. Cancer* 7, 15–26.

*genetics*, 76(1), 1-18.

**Grady WM** (2004) Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Rev* 23: 11-27.

Grady, W.M., and Carethers, J.M. (2008). Genomic and epigenetic instability in color

Grosclaude, P., Remontet, L., Belot, A., Danzon, A., Rasamimanana Cerf, N., and Bossard, N. (2013).

Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Colon Rectum* 34, *European Journal of Cancer*. Volume 3, Octobre 2005. P 291.

**Gryfe, R., Kim, H., Hsieh, et al**, (2000). Tumor Microsatellite Instability and Clinical Outcome in Young Patients with Colorectal Cancer. *N. Engl. J. Med.* 342, 69–77.

**Guinney J, Dienstmann R, Wang X, et al**, ( 2015 ). The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *PLoS Nat Med* ; 21:1350-6.

**Henson DE, Hutter RV, Nagle RB, et al**, ( 2003 ). Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the Heresbach, D. and Heresbach Le Berre, N. Les foyers de cryptes aberrantes (FCA) coliques : une lésion précancéreuse à dépister ? *Lett.*

**Hewish, M., Lord, C. J., et al** (2010). Mismatch repair deficient colorectal cancer in the era of personalized treatment. *Nature reviews Clinical oncology*, 7(4), 197-208.

**Hill, C.** (1997). *Épidémiologie des cancers*. Flammarion, Paris

Hirayama T. ( 1981) A large - scale cohort study on the relationship between diet and selected cancer of the digestive organs en : *gastrointestinal cancer, endogenous factors*, New York, banbury report 7 cold spring harbor laboratory ; 409-429.

**Howe, G. R., Aronson, et al**, (1997). The relationship between dietary fat intake and risk of colorectal cancer : evidence from the combined analysis of 13 case-control studies. *Cancer Causes & Control*, 8(2), 215-228.

**Hsieh, P., & Yamane, K.** (2008). DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of ageing and development*, 129(7-8), 391-407.

**Irigaray P, Newby J.A, Clapp R, et al**, ( 2007 ). D. Lifestyle- related factors and environmental agents causing cancer : An overview *Biomedicine & Pharmacotherapy* ; 6,640-658

**Issa JP** (2004) CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer* 4 : 988-993

Itzkowitz, S.H., and Yio, X. (2004). Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 287, G7-17.

**J. Yang, X. Wang, SM Zou et al.**, (2018) "Les variations génétiques des gènes MLH3 et MSH2 sont associées à la sensibilité et au pronostic chez les patients atteints de cancer rectal localement avancé recevant une chimioradiothérapie préopératoire", *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi [Journal chinois d'oncologie]*, vol. 40, non. 6, p. 433-440.

**J. Yang, Y. Huang, Y. Feng et al.**, (2019) « Associations des variations génétiques des gènes de réparation des mésappariements MSH3 et PMS1 avec des événements indésirables aigus et la survie chez les patients atteints d'un cancer du rectum recevant une chimioradiothérapie postopératoire », *Recherche et traitement sur le cancer*, vol. 51, non. 3, p. 1198-1206.

**Jacob S, Praz F**, janv ( 2002 ). DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie.* ;84(1):27-47.

**Jandova, J., Ohlson, E., Torres .** (2015). Racial disparities and socioeconomic status in the incidence of colorectal cancer in Arizona. *Am. J. Surg.*

**Jemal A, Siegel R, Ward E , et al** ( 2006 ) . Cancer statistics. *CA Cancer J. Clin.* ; 56,106–130.

**Jemal A, Siegel R, Ward E, et al.** (2007). MSH2 118T>C and MSH6 159C>T promoter polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Carcinogenesis* 28, 2575–2580.

**Jenkins MA, Hayashi S, O’Shea AM et al** ( 2007 ) . Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study.

**Jiricny, J.** (2006) The Multifaceted Mismatch-Repair System. *Nature Reviews. MolecularCell Biology* 7(5): 335–346.

**Jones S., Emmerson P., Best JM , et al.,** ( 2002 ) . Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G :C > T : A mutations. *Hume Mol Genet* 11(23) : 2961-7.

**Jones, S., Emmerson, P., Maynard, J., et al ,** (2002). Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* 11, 2961–2967.

**Julie C, Tresallet C, Brouquet A, et al ,**( 2008 ) . Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) : Revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol* ;103 :2825-35.

**Kempers MJE, Kuiper RP, Ockeloen CW, et al ,** janv ( 2011 ) . Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol* ;12(1):49-55.

**Kern SE, Fearon ER, Tersmette ,** (1989) Clinical and pathological associations with allelic loss in colorectal carcinoma [corrected]. *JAMA : the journal of the American Medical Association* 261 : 3099-3103.

**Kinzler KW, Vogelstein B** (1996) Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87 : 159-170.

**Kirkegaard, H., Johnsen, N.F , et al** (2010). Association of adherence to lifestyle recommendations and risk of colorectal cancer : a prospective Danish cohort study. *BMJ* 341, c5504.

**Kroutil, L. C., K. Register, et all .** (1996) . Exonucleolytic Proofreading during Replication of Repetitive DNA. *Biochemistry* 35(3) : 1046–1053

**Kunzmann A.T, Coleman H.G, Huang W.Y.,** (2016). Fruit and vegetable intakes and risk of colorectal cancer and incident , recurrent adenomas in the PLCOcancer screening trial. *Int J Cancer.* 138(8) :1851-61.

L'hépatogastro-entérologue VI, 23–30.

Lamoril J, Deybach JC, Bouzégarene P, (2006) . L'instabilité des microsatellites dans les cancers du côlon. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 21 : 211-222.

**Laurent-Puig**, P., Agostini, J., et al ., (2010). [Colorectal oncogenesis]. *Bull. Cancer (Paris)*

LE MARCHAND L., HANKIN JH & WILKENS LR. (2001). Combined effects of welldone red meat, smoking, and rapid N-acetyltransferase 2 and CYP1A2 phenotypes in increasing colorectal cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 10 :1259-1266.

**Leach**, F.S., Nicolaides, N.C., Papadopoulos, et al ,(1993). Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75, 1215–1225.

**Legoux**, JL (2001). États précancéreux gastriques. *Acta Endoscopica* 31 :583–8.

**Lengauer C**, Kinzler KW, Vogelstein B , (1998) . Genetic instabilities in human cancers.

**Li**, G.-M. (2008) Mechanisms and Functions of DNA Mismatch Repair. *Cell Research* 18(1) : 85–98.

**Li**, L., McVety, S., Younan, R., et al , (2006). Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2 : the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). *Human mutation*, 27(4), 388-388.

**Ligtenberg**, M. J., Kuiper, R. P., Chan, et al , (2009). Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nature genetics*, 41(1), 112-117.

**Lindor NM** , (2009) . Familial colorectal cancer type X : the other half of hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome. *Surg Oncol Clin N Am*; 18 : 637-645.

**Lindor NM**, Rabe K, Petersen GM, et al , ( 2005 ). Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency : familial colorectal cancer type X. *JAMA*

**Lo**, Y.-L., Hsiao, C.-F., Jou, et al. (2011). Polymorphisms of MLH1 and MSH2 genes and the risk of lung cancer among never smokers. *Lung Cancer* 72, 280–286.

**Lynch HT**, de la Chapelle A, ( 1999 ) . Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*; 36: 801-18.

**Lynch**, H. T., Lynch, P. M., et al , (2009). Review of the Lynch syndrome : history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical*

**Lynch**, H.T., Shaw, M.W, et al , (1966). Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch. Intern. Med.* 117, 206–212.

**Manceau**, G., Karoui, M., Charachon, A , et al, (2011). HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer) or Lynch syndrome: a syndrome related to a failure of DNA repair system. *Bulletin du cancer*, 98(3), 323-336.

**Manceau, G., Wagner, M., Doat, S , et al ,(2014).** Cancer du côlon : épidémiologie, diagnostic, bilan d'extension, traitement chirurgical et suivi. *Encyclop Méd Chir Gastro-Entérologie*, 9 (3).

**Manolio, T.A. (2010).** Genomewide association studies and assessment of the risk of disease. *N. Engl. J. Med.* 363, 166–176.

**Mármol, I., Sánchez-de-Diego, C., Pradilla Dieste, et al . (2017).** Colorectal carcinome : à general overview and future perspectives in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, 18 (1), 197.

**Martín-López JV, Fishel R , juin ( 2013 ) .** The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Fam Cancer*.

**Meddah, D. Meddah, B. Touil, A., et al . (2009).** Étude épidémiologique du cancer du côlon

**Miralem ,Mrkonjic , Stavroula Raptis , et al . (2006)** Mechanisms in Eukaryotic Mismatch Repair. *The Journal of Biological Chemistry*

**Mrkonjic, M., Raptis, S., Green, R.C. et al ( 2014 ) . . 34, 490–497.**  
*Nature* 396 : 643-649.métabolisme 2002 ; 2 ème Ed ; 322-361.

**Negrichi, S., & Taleb, S. (2020).** Hereditary, environmental, and dietary risk factors of colorectal cancer : a case-control study in the Algerian East. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-10.

**Niessen RC, Kleibeuker JH, Jager POJ, et al , avr ( 2007 ) .** Getting rid of the PMS2 pseudogenes: mission impossible? *Hum Mutat.* ;28(4):414; author reply 415.

**Niskakoski, A., Kaur, S., Renkonen-Sinisalo, et al. (2013).** Distinct molecular profiles in Lynch syndrome-associated and sporadic ovarian carcinomas. *Int. J. Cancer* 133, 2596–2608.

**NORAT T & RIBOLI E. (2001).** Meat consumption and colorectal cancer : à review of epidemiologic evidence. *Nutr Review.* 59 :37-47.

**Obmolova, G., Ban, C., Hsieh, P. Et al. (2000).** Crystal structures of mismatch repair protein MutS and its complex with a substrate DNA. *Nature*, 407(6805), 703-710.

**Olschwang S, Bonaïti C, Feingold J, et al. Avr (2004)** [Identification and management of HNPCC syndrome (hereditary non polyposis colon cancer), hereditary predisposition to colorectal and endometrial adenocarcinomas]. *Bull Cancer (Paris)* ;91(4):303 315.

**Olschwang, S., and Eisinger, F. (2005).** Prédisposition héréditaire au cancer colorectal et inactivation de la fonction de réparation des mésappariements de l'ADN. *EMC - Hépatogastroenterol.* 2, 214–222.

**Oukkal, M., Bouzid, K. (2006).** Études épidémiologiques des cancers colorectaux au service P, Ferlay J, ( 2004 ) *Cancer incidence and mortality in Europe , Ann Oncol*, 2005; 16, 481-8.

**Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF,et al. (1994)** Mutation of a mutL homolog in

hereditary colon cancer. *Science* 263: 1625-1629.

**Peltomäki P**, Aaltonen LA, Sistonen P, et al. (1993). Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* ;260(5109):810-812.

**Peltomäki, P.** (2016). Update-t-on Lynch syndrome genomics. *Fam. Cancer* 15, 385–393.

Petersen GM, Slack J et Nakamura , jun (1991) . Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* ;100(6):1658–64.

**Petersen, G. M., Slack, et al .** (1991). Screening guidelines and premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology*, 100(6), 1658-1664.

**Raevaara TE**, Korhonen MK, Lohi H, et al. août (2005) . Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of MLH1. *Gastroenterology*. ; 129(2):537-549

**Reha-Krantz, L. J.** (2010) DNA Polymerase Proof Reading : Multiple Roles Maintain Genome Stability. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804(5) : 1049–1063.

**Reyes, G. X., T. T. Schmidt, et al .** (2015) New Insights into the Mechanism of DNA Mismatch Repair. *Chromosoma* 124(4) : 443–462.

**RIBOLI E& NORAT T.** (2003). Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. *Am J Clin Nutr* 78 : 559S-69.

**Rossi M, Jahanzaib M, Usman A, et al .** (2018). Colorectal Cancer and Alcohol Consumption- Populations to Molecules. *Cancer*. 10(2) :2.

**Rougier, P.** (2004). « Cancers du côlon et du rectum : mieux les dépister et mieux les traiter » *La Revue du praticien*. 54 : 133 – 142.

**Rustgi, A.K.** (2007). The genetics of hereditary colon cancer. *Genes Dev.* 21, 2525–2538.

**Samadder, N.J., Smith, K.R., Hanson, H , et al.** (2016). Familial Risk in Patients With Carcinoma of Unknown Primary. *JAMA Oncol.* 2, 340–346.

**Schouten, J.P., McElgunn, C.J., et al .** (2002). Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Res* 30, e57.

**Scoazec, J.-Y., and Sabourin, J.-C.** (2010). [2010 : The seventh edition of the TNM classification]. *Ann. Pathol.* 30, 2–6.

**Seer, Stat Database.** (2010) : Incidence, 1969-2007 Counties : Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) Program ([www.seer.cancer.gov](http://www.seer.cancer.gov)), National Cancer Institute, DCCPS, Surveillance Research Program, Cancer Statistics Branch September 25, 2009, Published online April 9, 2010 in Wiley InterScience([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)).

**Shacter, E., and Weitzman, S.A.** (2002). Chronic inflammation and cancer. *Oncol. Williston Park N* 16, 217–226, 229-232.

- Sharma, R.** (2020). An examination of colorectal cancer burden by socioeconomic status : evidence from GLOBOCAN 2018. *EPMA Journal*, 11(1), 95-117.
- Shcherbakova, P. V., Y. I. Pavlov, et al.** (2003) . Unique Error Signature of the Four-Subunit Yeast DNA Polymerase Epsilon. *The Journal of Biological Chemistry* 278(44) : 43770–43780
- Shin, K.H.** et al. (2002) . Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the hMSH2 gene. *Cancer Res.*, 62, 38–42.
- Silva, F.C.C. da, Valentin, M.D., et al.** (2009). Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *São Paulo Med. J. Rev. Paul. Med.* 127, 46–51.
- Sinha, R., CHOW WH, KULLDORF M.** (1999) Well-done, grilled red meat increases the risk of colorectal adenomas. *Cancer Res.* 59 :4320-4324.
- Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124: 979-994.
- Stevens, R.G., Swede, H., Heinen, et al.** (2007). Aberrant crypt foci in patients with a positive family history of sporadic colorectal cancer. *Cancer Lett.* 248, 262–268.
- Survie des personnes atteintes de cancer en France 1989-2007. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. *Gastroenterology* 135, 1079–1099.
- Syngal S, Fox EA, Eng C, et al.** (2000) . Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. *J Med Genet* ;37(9) :641-5.
- Tariq, K., and Ghias, K.** (2016). Colorectal cancer carcinogenesis: a review of mechanisms. *Cancer Biol. Med.* 13, 120–135.
- Teixeira M, Braghiroli M, Sabbaga, et al.** (2014). Primary prevention of colorectal cancer : Myth or reality. *World J Gastroenterol.* 20(41) :2.
- Terzić, J., Grivennikov, S., Karin, et al** (2010). Inflammation and colon cancer. *Gastroenterology* 138, 2101–2114. e5arevues0399832000285-Sup140.
- Trabert, B., Eldridge, R.C., Pfeiffer, et al.** (2016). Pre-diagnostic circulating inflammation markers and endometrial cancer risk in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian Cancer (PLCO) Screening Trial. *Int. J. Cancer.*
- Validire, P.** (2011). Anatomie pathologiques des lésions colo-rectales précancéreuses et cancéreuses débutantes. *Le courrier de colo-proctologie.* 3. 81P .
- Vasen, H.F.** (2000). Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 18, 81S–92S.
- Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.P., et al.** (1999). New clinical criteria for hereditary

nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116, 1453–1456.

**Vekic, B.,** Dragojevic-Simic, V., Jakovljevic, et al .(2020). A Correlation Study of the Colorectal Cancer Statistics and Economic Indicators in Selected Balkan Countries. *Frontiers in public health*, 8, 29.

**Viguier J,** Bourlier P, Karsenti D, et al . (2003). « Cancer du côlon ».

Warthin AS. (1913). Hereditary with reference to carcinoma. *Arch Intern Med* 12, 546–555.

Watson, P., Vasen, H.F.A., Mecklin, et al .(2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *Int. J. Cancer* 123, 444–449.

**Win, A.K.,** Young, J.P., Lindor, et al. (2012). Colorectal and other cancer risks for carriers and noncarriers from families with a DNA mismatch repair gene mutation : a prospective cohort study. *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.* 30, 958–964.

**Winawer, S.,** M. Classen, S. Winawer, et al (2007). Recommandations pratiques: Dépistage du cancer colorectal. *World Gastroenterol. Organ. Dig. Cancer Alliance*

**Xiao, X.-Q.,** Gong, W.-D., Wang, S.-Z., et al .(2012). Polymorphisms of mismatch repair gene hMLH1 and hMSH2 and risk of gastric cancer in a Chinese population. *Oncol Lett* 3,591–598.

## **Webographie**

W 1 : le figaro santé <https://sante.lefigaro.fr/>

W 2 : Seven mice. Anatomie du système digestif [En ligne].

Site consulté le 20 /07/2021.[http://www.medecine-et\\_sante.com/anatomie/anatosysdigest.html](http://www.medecine-et_sante.com/anatomie/anatosysdigest.html)

W 3 : American Cancer Society. (2009). Colorectal Cancer [En ligne]. Site consulté le 20/07/2021.<https://cancer.ca>

<http://www.cancer.org/research/cancerfactsstatistics/colorectal-cancer-facts-and->

W 4 : <http://www.colorectal-cancer.ca/fr> (Association canadienne du cancer colorectal).  
([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com))

W 5 : (<http://www.med.mun.ca/MMRvariants/thegenes.aspx>)

( Société canadienne de cancer <https://www.cancer.ca/fr-ca/?region=on> )

# *Annexes*

## Annexe I

**Tableau A : classification TNM des CCR**

Stade	Signification
<i>Tumeur primitive (T)</i>	
<b>Tis</b>	Carcinome <i>in situ</i>
<b>T1</b>	La tumeur envahit la sous muqueuse
<b>T2</b>	La tumeur envahit la musculéuse
<b>T3</b>	La tumeur envahit la sous séreuse
<b>T4</b>	La tumeur perce le péritoine viscéral et/ou envahit les organes voisins
<b>Tx</b>	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
<i>Ganglions régionaux (N)</i>	
<b>N0</b>	Pas de métastase ganglionnaire
<b>N1</b>	Atteinte de 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
<b>N2</b>	Atteinte de 4 ou plus ganglions lymphatiques régionaux
<b>Nx</b>	Ganglions non évalués
<i>Métastases (M)</i>	
<b>M0</b>	Absence de métastase
<b>M1</b>	Métastases à distance
<b>Mx</b>	Statut métastatique inconnu

La lettre **T** symbolise la tumeur initiale, et la profondeur des tissus envahis. Elle est affectée d'un coefficient : de T0 (quand la lésion primitive n'est pas retrouvée) à T4 pour les tumeurs les plus étendues. Cette cotation dépend du volume tumoral, représenté par le diamètre maximum de la lésion, et de l'extension aux organes voisins (peau, vaisseaux, nerfs, os, etc.). La lettre **N**, de N0 à N3, dépend du territoire ganglionnaire, plus ou moins proche de la tumeur, de l'importance des adénopathies, du nombre de ganglions envahis. La lettre **M** est cotée M0 en l'absence de métastases connues ou M1 en leur présence, quel que soit leur siège, unique ou multiple. Ces différentes informations permettent de classer les cancers du côlon en cinq stades (Compton et al, 2000)

**Stade 0** – Tis, N0, M0 : le cancer est localisé dans la paroi interne du côlon ou du rectum.

- **Stade I** – T1, T2, N0, M0 : le cancer s'est propagé de la paroi interne aux couches intermédiaires de la membrane du côlon ou du rectum.

- **Stade II** – T3, T4, N0, M0 : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum jusqu'aux tissus environnants.

- **Stade III** – Tous les stades T, N1, N2, M0 : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum jusqu'aux ganglions lymphatiques environnants.

- **Stade IV** - Tous les stades T et N, M1 : le cancer s'est propagé au-delà du côlon ou du rectum dans une autre partie du corps.

**Tableau B : Critères d'Amsterdam établis par l'International Collaborative Group(IGG-SL)**

Critères d'Amsterdam II	Critères de Bethesda
<p>Au moins 3 malades apparentés avec CCR ou autre Tm-HNPCC</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• un malade apparenté au premier degré avec les 2 autres</li> <li>• Au moins 2 générations successives atteintes</li> <li>• Au moins un cas diagnostiqué avant 50 ans</li> <li>• La PAF doit être exclue</li> <li>• Les tumeurs doivent être prouvées histologiquement</li> </ul>	<p>Les Tumeurs devraient être testées pour MSI dans les situations suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• CCR diagnostiqué avant l'âge de 50 ans</li> <li>• Présence de CCR synchrone, métachrone ou autre Tm-HNPCC quelque soit l'âge</li> <li>• CCR MSI H + histologie diagnostiqué avant 60ans</li> <li>• Cas CCR + <math>\geq 1</math> apparenté au 1er degré avec Tm-HNPCC, un des cancers diagnostiqué avant 50 ans</li> <li>• Cas CCR + <math>\geq 2</math> apparentés au 1er ou 2ème degré avec Tm-HNPCC, quelque soit l'âge</li> </ul>

CCR : cancer colorectal ; Tm-HNPCC: tumeurs associées au syndrome de Lynch; PAF : polypose adénomateuse familiale

CCR : cancer colorectal ; Tm-HNPCC : tumeurs associées au syndrome de Lynch ; MSI H instabilité microsatellitaire élevée.

**Tableau C : Les critères de Bethesda impliquant dans le syndrome de Lynch.**

<b>Critères originaux de Bethesda</b> <i>(Rodriguez-Bigas et al., 1997)</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Individus avec des cancers dans leur famille qui répondent aux critères d'Amsterdam.</li> <li>2. Individus avec deux tumeurs en relation avec le SL, incluant les CCR synchrones, métachrones ou les cancers extra-coliques associés (ovaire, endomètre, gastrique, intestin grêle, rein, uretère..)</li> <li>3. Individus avec un CCR et un parent au 1er degré avec un CCR et/ou un Cancer extra-colique associés au SL et/ou un adénome colorectal ; un des cancers diagnostiqué avant 50 ans et les adénomes avant 40 ans.</li> <li>4. Individus avec un CCR ou de l'endomètre diagnostiqué avant 50 ans</li> <li>5. Individus avec un CCR du côté droit avec une structure histopathologique indifférenciée diagnostiqué avant 50 ans</li> <li>6. Individus avec un CCR avec un type cellulaire en bague à chaton diagnostiqué avant 50 ans</li> <li>7. Individus avec un adénome diagnostiqué avant 40 ans.</li> </ol>
<b>Critères révisés de Bethesda</b> <i>(Umar et al., 2004)</i>
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cancer colorectal diagnostiqué avant l'âge de 50 ans.</li> <li>2. Présence des tumeurs colorectales synchrones, métachrones ou d'autres tumeurs associées au SL (<i>ovaire, endomètre, gastrique, intestin grêle, rein, uretère, cerveau, pancréas...</i>)</li> <li>3. CCR avec une histologie MSI-H (<i>présence de lymphocytes infiltrant la tumeur, réaction immunitaire identique à la maladie du Crohn, croissance médullaire</i>) diagnostiqué chez les patients de moins de 60 ans.</li> <li>4. CCR diagnostiqué chez un ou plusieurs parents au 1er degré avec des tumeurs en relation avec le SL, avec un des cancers diagnostiqué avant 50 ans.</li> <li>5. CCR diagnostiqué chez deux parents, ou plus, du 1er ou 2nd degré avec des tumeurs en relation avec un SL indifféremment de l'âge.</li> </ol>

## Annexe II

### Fiche de renseignements du patient

Année ..... N°de Dossier.....  
Nom ..... Prénom:.....  
Date et lieu de naissance ..... Age :.....  
Etat civil..... Nbre d'Enfants:.....  
Adresse :..... Tel.....  
Origine ethnique:..... Fonction :.....

### Caractéristiques cliniques au diagnostic:

Diagnostic de la maladie :.....  
Age au moment du diagnostic: ..... Année de diagnostic.....  
Diabète : oui non Dyslipidémies : oui non  
Maladies cardiovasculaires : oui non Type de maladie.....  
Autres ATCD personnels.....

### Analyses biologiques

CA19:9.....ACE..... Autres .....

Examens cliniques:

Endoscopie: .....

Echo/ Scanner :.....

### Thérapie et traitements:

Chirurgie seule .....

Chirurgie + CT ..... CT seule :.....

Chirurgie +CT+ RT:..... RT seule : .....

Durée du traitement.....

Nbre de cures:.....

### Caractéristiques tumorales

#### A- Données macroscopique :

- **Localisation tumorale** : rectum  colon sigmoïde  colon gauche

Colon transverse  colon droit

- **Aspect** : bourgeonnant  infiltrant  plan

- **Polypes synchrones** : Absents  présents

- **Métastases synchrones** : Absentes  présentes

**Localisations** :.....

#### B- Données histologiques :

- **Type d'adénocarcinomes** : bien  moyennement  peu différencié

- **Envahissement en profondeur** : Intramuqueux (Tis)

Limité à la sous muqueuse (T1)  Limité à la musculuse (T2)

Envahissement à la sous séreuse (T3)

Envahissement de séreuse ou à des organes de voisinage( T4)

- **Stades pTNM** : .....

**Antécédents tumoraux personnels:**

- ..... -  
- ..... -

**Antécédents familiaux :**

Type de cancer du Père : .....  
Age de diagnostic.....

Type de C de la mère : .....  
Age de diagnostic.....

Type de C du frère : .....  
Age de diagnostic.....

Type de C de la sœur : .....  
Age de diagnostic.....

**Collatéraux:**

**Parent 1:**.....  
Lien de parenté:.....  
Age de diagnostic.....  
Type de cancer .....

**Parent 2 :**.....  
Lien de parenté:.....  
Age de diagnostic.....  
Type de cancer.....

## **Fiche de consentement du patient**

Centre hospitalier Universitaire de Constantine  
Gastroentérologie /Centre Anti cancéreux  
Laboratoire de Biologie et génétique moléculaire  
Etude génétique du Cancer colorectal

Dans le cadre de :

Etude de prédisposition génétique aux cancers colorectaux

Je soussigné(e) :

Nom :

Prénom :

Date de naissance :

-Déclare avoir pris connaissance des informations explicatives concernant cette étude.

- J'accepte le prélèvement sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la loi algérienne

- J'accepte ce type de recherche :

- Je m'oppose à ce type de recherche :

-En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

**OUI**

**NON**

Signature du patient(e) :

Signature de Doctorant (investigateur)

En lieu et date :

Signature du Médecin

**Fiche de consentement du patient**

**Enfant mineur**

Centre hospitalier Universitaire de Constantine

Gastroentérologie /Centre Anti Cancéreux

Laboratoire de Biologie génétique moléculaire

Etude génétique du Cancer colorectal

Dans le cadre de :

Etude de prédisposition génétique aux cancers colorectaux

Nous soussignés : Nom : prénom :

Nom : prénom :

Agissant en qualité de parents de l'enfant mineur

Nom : Prénom :

Date de naissance

-Déclare avoir pris connaissance des informations explicatives concernant cette étude.

J'accepte le prélèvement concernant mon enfant mineur sous les conditions décrites en gardant tous mes droits stipulés par la loi

-J'accepte ce type de recherche :.....

- Je m'oppose à ce type de recherche :.....

-En cas de réponse affirmative, je souhaite que les résultats puissent m'être communiqués

**OUI**

**NON**

Signature du patient(e) :

Signature de Doctorant (investigatrice)

En lieu et date :

Signature du Médecin

- **Les étapes de l'extraction de l'ADN**

- **1- Préparation des leucocytes**

- Dans un tube Falcon de 50 ml ; mettre le sang total (7-10 ml) et compléter à 45 ml avec du TE 20 :5. Laisser 10 min dans la glace.

- Centrifuger 15 min à 3900 g (3900 rpm).

- Déverser le surnageant prudemment afin de garder le culot leucocytaire précipité au fond de tube.

- Rajouter le TE 20:5 au culot jusqu'à 25-30 ml, agiter pour le remettre en suspension et laisser 10 min dans la glace.

- Centrifuger dans les mêmes conditions précédentes.

- Déverser le surnageant : obtention d'un culot de leucocytes. (Si on s'arrête à ce niveau, les mettre dans un tube nunc de 1.5 ml avec du TE 10 :1 et les conserver à -20°C dans un congélateur).

- **2- Extraction de l'ADN**

- Décongeler les leucocytes.

- Centrifuger pendant 15 min à 3900 rpm.

- Dilacérer le culot de leucocytes soigneusement afin de les prendre complètement et les mettre dans un tube Falcon conique de 15 ml.

- Ajouter 3 ml de tampon de lyse (NaCl 400 mM, EDTA 2mM, Tris 10mM, PH 8.2)

- Ajouter 200 µL de SDS à 10% (100 g SDS + 1000 ml H<sub>2</sub>O).

- Ajouter 100 µL de protéinase K à 10 mg / ml. Dans l'étuve, Agiter le tube sur une roue rotative à 37°C pendant une nuit. Le lendemain ; refroidir dans la glace.

- Ajouter 1 ml de NaCl 4 M et agiter rigoureusement à la main.

- Remettre 5 min dans la glace (précipitation des protéines).

- Centrifuger 15 min à 2500 rpm.

- Transvaser le surnageant dans un tube Falcon de 50 ml , ajouter 2 fois son volume d'éthanol absolu (100%) préalablement refroidi et agiter en tournant le tube plusieurs fois : **la formation de la méduse** visible à l'œil nu . (laisser éventuellement 30 min à  $-20^{\circ}\text{C}$  si la pelote d'ADN ne se forme pas).
- Récupérer la pelote d'ADN par une pipette pasteur et la rincer 2 fois dans l'éthanol à 70% dans un tube nunc (ependorf) stérile.
- **3-Solubilisation de l'ADN**
- L'ADN est réhydraté en ajoutant entre 300 et 1000  $\mu\text{L}$  de TE 10 :1 selon la grosseur de la pelote et la concentration souhaitée.
- Laisser une nuit sur agitateur rotateur à  $37^{\circ}\text{C}$ , puis à température ambiante jusqu'à dissolution complète ( de 1 jusqu'à 3 jour ) .

#### **Détermination de la pureté et la concentration de l'ADN :**

##### **Détermination de la pureté :**

##### **Principe :**

- L'ADN absorbe à 260 nm alors que les protéines (témoins de contamination) absorbent à 280 nm.
- L'échantillon est dilué au 1/100 dans l'eau distillée (10  $\mu\text{L}$  de l'ADN solubilisé dans 990  $\mu\text{L}$  de l'eau stérile).
- Les DO sont lues à 260 et 280 nm ( longueurs d'onde d'absorption des acides nucléiques et des protéines) dans le même type de cuve que celle ayant servi à faire le zéro (eau stérile ).
- Par le moyen du rapport de DO 260 nm / DO 280nm, la pureté de l'ADN est
- déterminée en indiquant la contamination de l'ADN par les protéines ou par les ARN.
- L'ADN est suffisamment pur lorsque le rapport  $R = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$  est compris entre 1.6 et 2 ( $1.6 < R \leq 2$  ).
- L'ADN est contaminé par les protéines si :  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} < 1.6$ .
- L'ADN est contaminé par les ARN si :  $\text{DO}_{260} / \text{DO}_{280} > 2$ .

## -Détermination de la concentration de l'ADN :

### -Principe

La densité optique à 260 nm permet de calculer la concentration de l'ADN sachant que :

- 1 unité de DO<sub>260 nm</sub> = 50 µg/ ml d'ADN double brin.

### Exemple :

- Pour un ADN solubilisé dans 1000 µl de TE 10 :1 ayant une DO<sub>260 nm</sub> = 0.139
- 1 unité de DO<sub>260 nm</sub>  $\longrightarrow$  50 µg/ ml d'ADN
- 0.139 DO 260 nm  $\longrightarrow$  X
- $X = 0.139 \times 50 = 6.95 \text{ µg/ ml}$
- Considérant que l'ADN est dilué à 1/100 , donc  $6.95 \times 100 = 695 \text{ µg/ ml}$ .

La concentration de l'ADN en µg /ml = facteur de dilution x DO 260 x 50 µg / ml.

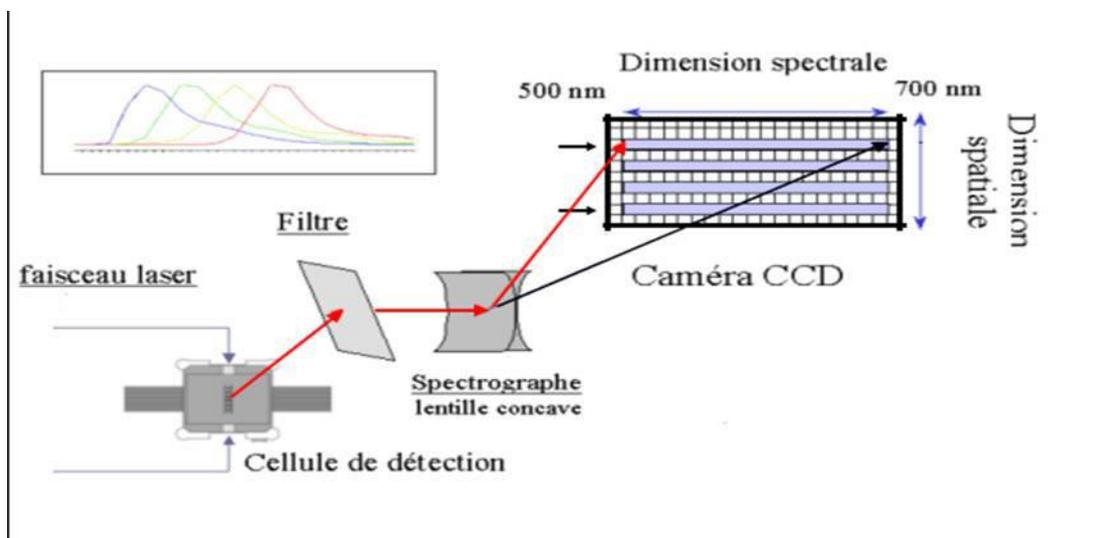


Figure A : Principe de l'électrophorèse capillaire

Il se repose sur une différence de potentiel (ddp), des polyanions d'ADN simple brin vont migrer du pôle négatif (cathode) vers le pôle positif (anode) du circuit électrique. Les données de fluorescences sont récupérées au niveau d'une cellule de détection et transmises vers la caméra CCD pour être analysées. Les fluorochromes excités vont ré-

émettre une fluorescence spécifique perpendiculairement. Elle passe à travers un filtre qui va sélectionner uniquement la fluorescence provenant des capillaires. Une lentille concave appelée spectrographe va décomposer pour chacun des capillaires la fluorescence entre 500 et 700 nm et diriger chaque faisceau en direction de la caméra CCD.

# Abstract

Colon cancer is a major health problem in Algeria, including Lynch SL syndrome, also known as hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), which leads to an increased risk of colon cancer. People with SL tend to develop colon cancer before the age of 50.

SL is caused by a genetic change in genes responsible for repairing MMR DNA mismatches.

Our main objective is to search for constitutional mutations in the promoter of the DNA repair gene (MMR): MSH2 and the detection of the polymorphism (-118 C> T) in index cases from 16 families suspected of having SL.

We performed a direct sequencing of the MSH2 promoter and a statistical study including clinical, genealogical and molecular characteristics in 16 Algerian families with SL.

Following the results of our study we found that the average age of the attack does not exceed 40 years with predominance of men as well as a high frequency of rectal cancer compared to other parts of the colon diagnosed with stage III of the tumor. The Amsterdam I / II criteria are present in 37% of our families with SL.

The c.-118C> T SNP was detected in three patients in our study series at an early age in association with the causal mutation of SL.

In the future, it would be better to expand the number of patients in a more in-depth study to identify new genetic markers of this pathology.

Keywords: Algerian families - HNPCC - Lynch syndrome - MSH2 - MMR genes.

## الملخص

يُعد سرطان القولون مشكلة صحية كبيرة في الجزائر، بما في ذلك متلازمة لينش إس إل، المعروفة أيضاً باسم سرطان القولون والمستقيم الوراثي غير السلانلي HNPCC مما يؤدي إلى زيادة خطر الإصابة بسرطان القولون. يميل الأشخاص المصابون بالتهاب المفاصل الروماتويدي إلى الإصابة بسرطان القولون قبل سن الخمسين يحدث SL بسبب تغير جيني في الجينات المسؤولة عن إصلاح عدم تطابق MMR DNA . هدفنا الرئيسي هو البحث عن الطفرات الدستورية في محفز جين إصلاح الحمض النووي MSH 2: MMR واكتشاف تعدد الأشكال T <118C- في حالات المؤشر من 11 عائلة يشتبه في وجود SL. أجرينا تسلسلاً مباشراً لمحفز MSH 2 ودراسة إحصائية تتضمن الخصائص السريرية والأنساب والجزئية في 11 عائلة جزائرية مصابة ب SL. بعد نتائج دراستنا وجدنا أن متوسط عمر النوبة لا يتجاوز 04 عامًا مع غلبة الرجال وكذلك ارتفاع معدل الإصابة بسرطان المستقيم مقارنة بأجزاء أخرى من القولون تم تشخيصها بالمرحلة الثالثة من الورم. معايير أمستردام I / II موجودة في من عائلتنا مع 37% SL. تم اكتشاف T SNP >c.-118C في ثلاثة مرضى في سلسلة دراستنا في سن مبكرة بالاقتران مع الطفرة السببية ل SL في المستقبل، سيكون من الأفضل زيادة عدد المرضى في دراسة أكثر تعمقاً من أجل تحديد العلامات الجينية الجديدة لهذا المرض العائلات الجزائرية: الكلمات المفتاحية - HNPCC - لينش متلازمة -MSH2 - جينات MMR.

---

Détection par séquençage de SNP -118C<T sur le gène *MSH2* chez des familles algériennes ayant un  
Syndrome de Lynch

---

Mémoire présentée en vue de l'obtention du diplôme de Master en Science

---

Le cancer du côlon est un problème de santé majeur en Algérie le syndrome de Lynch SL, également connu sous le nom de cancer colorectal héréditaire sans polypose (HNPCC), qui entraîne un risque accru de cancer du côlon. Les personnes atteintes du SL ont tendance à développer un cancer du côlon avant l'âge de 50.

Le SL est causé par un changement génétique dans les gènes responsables de la réparation des mésappariements MMR de l'ADN.

Notre objectif principal est de rechercher des mutations constitutionnelles dans le promoteur du gène de réparation de l'ADN (MMR) : *MSH2* et la détection du polymorphisme (-118 C>T) chez les cas index de 16 familles suspectées avoir SL.

Nous avons réalisé un séquençage direct du promoteur de *MSH2* et une étude statistique comportant les caractéristiques cliniques, généalogiques et moléculaire dans 16 familles algériennes atteintes du SL

Suite aux résultats de notre étude nous avons trouvé que l'âge moyen de l'atteinte ne dépasse pas 40ans avec prédominance masculine ainsi qu'une fréquence élevée de cancer de rectum par rapport aux autres parties du colon diagnostiqués au stade III de la tumeur. Les critères d'Amsterdam I / II sont présents chez 37% de nos famille ayant un SL.

Le SNP c.-118C> T a été détecté chez trois patients dans notre série d'étude à un âge précoce en association avec la mutation causale de SL

Dans l'avenir, il serait mieux d'élargir le nombre des patients dans une étude plus approfondie afin d'identifier de nouveaux marqueurs génétiques de cette pathologie.

---

**Mots-clés** : Familles algériennes- HNPCC - Syndrome de Lynch- - *MSH2*- gènes MMR.

---

**Laboratoire de recherche** : Biologie et génétique moléculaire.

---

**Date de soutenance**  
**23/09/2021**