

Année 2022

N° : MM462022

Mémoire de Master

Master de « BIOTECHNOLOGIE MEDICALE »

OPTION : Biomédicale

Intitulé

Diagnostic moléculaire des Polyposes adénomateuses
liées au gène *MUTYH*

Soutenu par :

Chaymae OIJANE

25 Juillet 2022

Devant le jury composé de :

Pr. AANNIZ Tarik	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat	Président
Pr. LOUATI Sara	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat	Encadrante
Dr. MOUFID Fatima-Zahra	CHU Hassan II Fès	Co-encadrante
Pr. KANDOUSI Ilham	Faculté de Médecine et de Pharmacie, Rabat	Examinatrice



Avant-propos

Ce travail a été réalisé dans le cadre du projet de fin d'études pour l'obtention du diplôme de Master en Biotechnologie médicale sous la direction de Mme LOUATI Sara Professeur à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de RABAT et Membre du Laboratoire de Biotechnologie Médicale à la FMPR et Mme MOUFID Fatima-Zahra, Docteur à l'unité de génétique médicale et oncogénétique CHU Hassan II Fès.

Dédicace

Par respect, je dédie ce travail :

A ma mère pour son amour plafonné, et qui m'a escorté durant ma vie scolaire, que dieu la protège de tout mal.

Et que ce rapport soit le meilleur cadeau que je puisse t'offrir chère maman.

A mon cher père, qui trouve dans ce modeste travail le fruit de ses efforts et ses sacrifices matériels et morales, que dieu te bénisse.

A toi mon frère que dieu avec toi partout.

A mes tantes et oncles qui m'avez toujours soutenu et encouragé.

A toute ma famille, mes amis et à tous ceux qui ont contribué de près et de loin à la réalisation de ce travail

Remerciement

Tout d'abord, je remercie le Dieu tout-puissant de m'avoir donné la force de survivre, ainsi que le courage de surmonter toutes les difficultés. Au nom du dieu le clément et le miséricordieux louange à ALLAH le tout puissant.

J'exprime ma profonde gratitude à Mr le doyen de la faculté de Médecine et de Pharmacie Rabat, et tout le corps professorale du laboratoire Medbiotech.

Au terme de ce mémoire, je tiens à exprimer mon respect et remerciement à Mme le professeur LOUATI Sara à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat qui m'a encadré tout au long de ce travail, pour ses conseils précieux et ses judicieuses directives. Ce travail est le fruit de sa rigueur et ses orientations, je ne peux certainement pas exprimer ma gratitude car votre gentillesse est indescriptible.

Je remercie Professeur BOUGUENOUGH Laila chef de service de génétique de CHU Hassan II Fès, pour m'avoir accueillir au sein de son laboratoire.

Je remercie également Docteur MOUFID Fatima-Zahra au CHU Hassan II Fès, pour sa patience à me guider dans mes travaux au sein du laboratoire de génétique Médicale, pour son grand savoir qui m'avez donné sans ennui.

J'adresse mes remerciements les plus vifs à Mme le professeur BENTAYEBI Kaoutar, Mme le professeur KANDOUSSE Ilham, d'avoir accepté d'être parmi les membres de jury et d'examiner ce travail, et de votre disponibilité.

Veillez trouver, dans ce travail, mon grand respect et mes éloges.

Résumé

Titre : Polyposes adénomateuses liées au gène *MUTYH*

Auteur : OUJANE Chaymae

Les mots clés : Cancer colorectal, Polypose adénomateuse, Gène *MUTYH*, PCR, Séquençage d'ADN.

La polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* est une maladie héréditaire récessive liée au cancer colorectal, le gène *MUTYH* est le gène responsable, situé sur le chromosome 1 spécifiquement [1p34.3-p32-1].

Le but de notre travail est d'établir un diagnostic moléculaire du gène *MUTYH*, et estimer la prévalence de la polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* (MAP) liée aux deux mutations récurrentes Y165C et G382D chez la population étudiée au sein du laboratoire génétique du CHU Hassan II de Fès. Ainsi installer le diagnostic moléculaire de cette pathologie afin de différencier entre d'autre pathologie liée au CCR qui ont été avant diagnostiquer dans le même bain sans prendre en considération le statut moléculaire, aussi que la prise en charge des patients atteints de la polypose et réalisation d'une étude presymptomatique des membres de la famille des cas porteurs de mutations.

Nous avons étudié 101 patients atteints du cancer colorectal, qui sont pris en charge au niveau des services d'Hépto-Gastroentérologie et le service de chirurgie viscérale du CHU Hassan II de Fès. Afin d'établir la prévalence de mutations liées à la protéine du gène *MUTYH*, nous avons amplifié par PCR les deux exons 7 et 13, nous avons par la suite recherché les mutations récurrentes par la méthode de Sanger.

D'après la caractérisation moléculaire du gène *MUTYH*, nous avons mis en évidence 3 mutations chez patients parmi 101, deux variants à l'état homozygote (Y165C ou G382D) et l'autre à l'état hétérozygote composite (Y165C et G382D).

Abstract

Title: Adenomatous polyposis linked to the MUTYH gene

Author: OUJANE Chaymae

Key words: Colorectal cancer, Adenomatous polyposis, MUTYH gene, PCR, DNA sequencing.

Adenomatous polyposis linked to the MUTYH gene is a recessive hereditary disease linked to colorectal cancer, the MUTYH gene is the causative gene, located on chromosome 1 specifically [1p34.3-p32-1].

The aim of our work is to establish a molecular diagnosis of the MUTYH gene, and to estimate the prevalence of adenomatous polyposis linked to the MUTYH gene (MAP) linked to the two recurrent mutations Y165C and G382D in the population studied in the genetic laboratory of the CHU. Hassan II of Fez, thus installing the molecular diagnosis of this pathology in order to differentiate between other pathology linked to CRC which were previously diagnosed in the same bath without taking into consideration the molecular status, as well as the care of patients affected of polyposis and carrying out a presymptomatic study of family members of cases carrying mutations.

We studied 101 patients with colorectal cancer, who are cared for in the Hepato-Gastroenterology departments and the visceral surgery department of the CHU Hassan II in Fez. In order to establish the prevalence of mutations linked to the protein of the MUTYH gene, we amplified by PCR the two exons 7 and 13, we then searched for recurrent mutations by the Sanger method.

According to the molecular characterization of the MUTYH gene, we highlighted 3 mutations in patients among 101, two variants in the homozygous state (Y165C or G382D) and the other in the composite heterozygous state (Y165C and G382D).

ملخص

العنوان : داء البوليبات الغدي المرتبط بجين *MUTYH*

المؤلف: شيماء أوجان

الكلمات المفتاحية: سرطان القولون المستقيم، داء السلائل الغدي، جين *MUTYH*، تفاعل البلمرة المتسلسل، تسلسل الحمض النووي.

داء البوليبات الغدي المرتبط بجين *MUTYH* هو مرض وراثي متحدي مرتبط بسرطان القولون المستقيم، جين *MUTYH* هو الجين المسبب، الموجود في الكروموسوم 1 على وجه التحديد [p34.3-p32-11].

الهدف من عملنا هو إنشاء تشخيص جزيئي لجين *MUTYH*، وتقدير انتشار داء البوليبات الغدي المرتبط بجين *MUTYH* (MAP) المرتبط بالطفرتين المتكررتين Y165C و D382G في السكان الذين تمت دراستهم في المختبر الجيني لـ CHU الحسن الثاني لفاس، وبالتالي تثبيت التشخيص الجزيئي لهذه الحالة المرضية من أجل التفريق بين الأمراض الأخرى المرتبطة بـ CRC والتي تم تشخيصها سابقاً بنفس الطريقة دون مراعاة الحالة الجزيئية، وكذلك رعاية المرضى المصابين من داء البوليبات وإجراء دراسة مسبقة لأفراد الأسرة من الحالات التي تحمل طفرات.

لقد درسنا 101 مريضاً مصاباً بسرطان القولون المستقيم، والذين تتم رعايتهم في أقسام أمراض الكبد والجهاز الهضمي وقسم جراحة الأحشاء في مستشفى CHU الحسن الثاني في فاس. من أجل إثبات انتشار الطفرات المرتبطة ببروتين جين *MUTYH*، قمنا بتضخيم الإكسونين 7 و 13 بواسطة PCR، ثم بحثنا عن الطفرات المتكررة بواسطة طريقة Sanger.

وفقاً للتوصيف الجزيئي لجين *MUTYH*، قمنا بتسليط الضوء على 3 طفرات في المرضى من بين 101، متغيرين في الحالة المتماثلة للواقع (Y165C أو G382D) والآخر في الحالة غير المتجانسة المركبة (D382G و Y165C).

Liste des abréviations

8oxoG : 7,8-dihydro-8-oxoguanine

ADN : Acide désoxyribonucléique

BER : Base excision repair

BET : Bromure d'éthidium

CCInt : Couche circulaire interne

CCR : Cancer colorectal

CIN : Instabilité chromosomique

CLExt : Couche longitudinale externe

dNTP : Désoxyribonucléotide tri-phosphate

EDTA : Acide éthylène diamine tétra-acétique

HNPCC : Hereditary non polyposis colorectal cancer

KRAS : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAP : MUTYH Associated Polyposis

MLH : Mut L homolog human

MM : Muqueuse musculaire

MMR : Mismatch Repair

MSI : Micro-Satellite Instability (MIN)

MUTYH gene : *MYH* gene : MutY Human Homolog gene

PAF : Polypose adénomateuse familiale

PCR : Polymerase chain reaction

PSS : Sessile secreted polyps

S.Muq : Sous muqueuse

SDS : Solution Dodécyl Sulfate

Liste des figures

Figure 1:Schéma générale de la structure du gros intestin.....	4
Figure 2: Schéma d'une coupe transversal des différentes couches de la paroi colique	5
Figure 3: Schéma de structure histologique de la muqueuse colique	6
Figure 4: Schéma des deux couches de la musculuse	7
Figure 5: Classement du cancer Colorectal- le nombre estimé des nouveaux cas en 2020 selon Globocan	8
Figure 6: Les changements histologiques au cours du développement du CRC	12
Figure 7: Modèle de tumorigénese Colorectal de Fearon et Vogelstein	16
Figure 8 : Enzymes participants à la prévention et à la réparation des dommages à l'ADN associés au 8-oxoG-MutY, MutT et MutM.....	20
Figure 9: Chromosome 1-Gene MYH (1p34.1)	21
Figure 10:Mutations pathogènes probables affectant MUTYH	22
Figure 11: Protocole simplifié d'extraction d'ADN	27
Figure 12:Captures d'écran du spectrophotomètre NanoVue™	28
Figure 13:Principe de la méthode réaction de polymérisation en chaîne PCR	29
Figure 14: Le programme des cycles des réactions de PCR.	30
Figure 15: Principes du séquençage selon la méthode de Sanger	31
Figure 16: Programme des cycles de la purification par ExoSap	32
Figure 17: Pourcentage de différentes tranches d'âge des patients atteints du CCR.....	36
Figure 18: Répartition selon le Sexe	37
Figure 19: Répartition des cas selon la présence de polypes.	37
Figure 20: Répartition des cas selon la localisation tumorale.....	38
Figure 21: Répartition des cas selon le degré de différenciation des tumeurs.	38
Figure 22: Localisation des variants identifiés sur la protéine MUTYH	39
Figure 23: Arbre généalogique du patient P50.....	40
Figure 24: Profil électrophoregrammes montrant la mutation Y165C et l'état sauvage	41
Figure 25: Profil électrophoregrammes montrant la mutation G382D et l'état sauvage	41
Figure 26 : Arbre généalogique du patient P51.....	42
Figure 27: Arbre généalogique de la patiente P52	42

Liste des Tableaux

Tableau I : Composition du milieu réactionnel de Mix PCR.....	29
Tableau II: Mélange réactionnel utilisé pour la purification du produit PCR.....	32
Tableau III: Mélange réactionnel de la réaction de séquence	33
Tableau IV: Programme de la réaction de séquence	33
Tableau V: Mélange réactionnel de la purification du produit de réaction de séquence	34
Tableau VI: Les données cliniques des patients porteurs de mutations germinales	39

Table des matières

Avant-propos.....	
Dédicace.....	
Remerciement.....	
Résumé.....	
Abstract.....	
Liste des abréviations.....	
Liste des figures.....	
Liste des Tableaux.....	
Table des matières.....	
Introduction.....	1
I. Colon : anatomie, histologie.....	3
1. Anatomie.....	4
2. Histologie.....	5
a Colon.....	5
b Rectum.....	7
II. Cancer colorectal.....	8
1. Épidémiologie.....	8
2. Développement du cancer colorectal.....	9
3. Facteurs de risque.....	9
III. Physiopathologie et anatomopathologie cancéreuse du colon.....	10
1. Lésions tissulaires précancéreuses.....	10
1.1 Adénomes.....	10
1.2 Autres types de polypes.....	11
2. Progression tumorale : de l'adénome vers le carcinome.....	12
2.1 Changements histologiques et morphologiques.....	12
2.2 Modification génétiques.....	13
3. Formes héréditaires du cancer colorectal.....	14
3.1 Polyposes adénomateuses familiales.....	14
3.2 Syndrome de lynch.....	14
4. Cancer colorectal à l'échelle moléculaire.....	15
4.1 Mutations clés de la tumorigénèse colique.....	15
a Séquence adénome-carcinome : le modèle de Fearon et Volgestein.....	15
b Mécanisme moléculaire de carcinome génétique du CCR.....	17
i-Instabilité chromosomique CIN.....	17

ii-Instabilité génétique	17
IV. Diagnostic moléculaire des polyposes adénomateuses liées au gène <i>MUTYH</i>	18
1 Historique	18
2 Syndrome de MAP	20
3 Gène <i>MUTYH</i> et protéine	20
a Réparation d'ADN par système BER :	21
b Analyse fonctionnelle de mutations de <i>MUTYH</i>	22
c <i>MUTYH</i> et MMR.....	22
4 Fonction de protéine <i>MUTYH</i>	23
V. Matériel et méthodes	25
1 Objectif	25
2 Patients	25
3 Caractérisation moléculaire du gène <i>MUTYH</i>	26
3.1- Extraction d'ADN	26
a Protocole	26
b Dosage et conservation	27
3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	28
a Protocole	29
b Electrophorèse :	30
3.3 Séquençage de Sanger	30
Protocole	31
VI. Résultats	36
1 Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques de la population étudiée	36
1.1 Répartition des patients selon l'âge	36
1.2 Répartition des patients selon le sexe	36
1.3 Répartition des patients selon la présence des polypes	37
1.4 Répartition des cas selon la localisation et le degré de la différenciation de la tumeur... ..	38
2 Caractérisation moléculaire du gène <i>MUTYH</i>	39
VII. Discussion	44
VIII. Conclusion et perspectives	48
IX. Références bibliographiques	50
X. Annexe	60
Résumé	62

Introduction

La polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* (MAP) est une forme héréditaire récente du cancer colorectal découverte en 2002 par Al Tassan et al (Al-Tassan et al., 2002)

Elle se caractérise par une forme de polypose atténuée que celle de la polypose adénomateuse familiale PAF liée au gène *APC* et par une transmission autosomique récessive.

Les patients ayant la MAP sont porteurs des mutations bialléliques du gène *MUTYH* qui rentre dans la réparation d'ADN par le système BER, comme ils portent des polyposes au niveau du colon entre 15 à 100 polypes, ce qui peut développer un risque relatif de cancer colorectal CCR (Nielsen et al., 2011).

Les mutations les plus fréquentes et majoritaire du gène *MUTYH* sont : Y165C et G382D, la fréquence de ces mutations bialléliques est évaluée de 22,6%.

Le diagnostic de la MAP consiste essentiellement une endoscopie pour la détection des polypes, soit dans le colon ou le rectum, aussi que les tests moléculaires PCR et séquençage pour rechercher les mutations ciblés.(Casper et al. 2009)

L'intérêt de ce travail est d'établir la prévalence des mutations Y165C et G382D, chez une population atteintes du CCR, ainsi installer le diagnostic moléculaire de cette pathologie afin de différencier entre d'autre pathologie liée au CCR qui ont été avant diagnostiquer dans le même bain sans prendre en considération le statut moléculaire, aussi que la prise en charge des patients atteints de la polypose et réalisation d'une étude presymptomatique des membres de la famille des cas porteurs de mutations.

Etude bibliographique

I. Colon : anatomie, histologie

Au cours de la 5^{ème} semaine de gestation humaine, l'intestin moyen commence à s'allonger rapidement et s'extrude dans le cordon ombilical. L'élargissement et le retour ultérieurs de l'anse de l'intestin moyen vers l'abdomen, ainsi que la rotation de l'intestin au cours de ce processus, déterminent la configuration adulte du colon (Bustos-Fernandez, 2013).

La rotation et le placement final de l'intestin moyen se déroulent en trois étapes. La première étape marque l'extrusion de l'intestin moyen dans le cordon ombilical, où il reste entre la 5^{ème} et la 10^{ème} semaine. Ce processus produit une rotation de 90 degrés dans le sens antihoraire de la boucle de l'intestin moyen, lorsque l'embryon est vu du côté ventral (Eastwood (auth.) & M.D. (eds.), 1983).

La deuxième étape coïncide avec le retour de l'intestin moyen à l'abdomen. L'intestin grêle entre en premier, à droite de l'artère mésentérique supérieure, mais au fur et à mesure que l'intestin revient, les premiers plis sont poussés derrière l'artère dans l'abdomen gauche. Ces boucles de l'intestin grêle, à leur tour, déplacent le mésentère dorsal de l'intestin postérieur vers la gauche de sorte que le colon descendant occupe le flanc gauche. Le caecum et le colon ascendant sont les derniers à être réduits dans l'abdomen et se situent d'abord dans le quadrant supérieur droit devant l'intestin grêle. Le colon s'allonge ensuite, poussant le caecum vers le bas à la 11^e semaine et complétant une rotation de 270 degrés de la boucle de l'intestin moyen (Bustos-Fernandez, 2013).

Au cours de la troisième étape, qui se poursuit jusqu'à peu de temps avant la naissance, le caecum descend plus loin dans la fosse iliaque. Les mésentères du caecum, du côlon ascendant, de l'angle hépatique, de l'angle splénique et du colon descendant fusionnent avec la paroi abdominale postérieure, ne laissant que le côlon transverse et le côlon sigmoïde sur les mésentères libres. Le placement final du colon dans l'abdomen est ainsi réalisé. Dans l'ensemble, Le colon est un viscoélastique, organe tubulaire, commençant proximale à la jonction iléocaecale et se terminant distalement à la jonction recto sigmoïdienne (Bustos-Fernandez, 2013)

Le colon humain mesure environ 130 cm de long à l'âge adulte, avec un diamètre luminal de 60 à 80 mm dans le caecum, se rétrécissant progressivement à 25 mm dans le côlon sigmoïde.

Il a été suggéré qu'un colon allongé ou redondant a un rôle causal dans la pathogenèse de la constipation (Heitmann et al., 2021)

C'est un organe indispensable dans la réception de l'innervation neurale intrinsèque du système nerveux entérique, l'innervation sympathique extrinsèque des nerfs lombaires et l'innervation parasympathique extrinsèque du nerf vague (colon proximal) et des nerfs splanchniques pelviens, qui régissent collectivement la fonction sensorimotrice du colon (Beaugerie & Sokol, 2014; Coffin et al., 1994).

1. Anatomie

Le gros intestin (figure1) s'allonge de la jonction iléo-colique à l'anus. Il mesure environ 150 cm (5 pieds) chez les adultes, avec bien sûr des variations qui se produisent, au but d'un colon sigmoïde allongé et redondant.

L'appendice vermiforme s'attache avec le caecum, qui se trouve dans le bas-ventre droit. Il crée une poche aveugle en dessous de l'endroit où l'ileon terminal s'intègre au milieu du colon (Bustos-Fernandez, 2013)

Le colon ascendant se continue jusqu'à l'abdomen supérieur droit, où il tourne au niveau de l'angle hépatique pour devenir le colon transverse, qui s'étend à son tour vers l'avant jusqu'à l'angle splénique de l'abdomen supérieur gauche, auquel le colon descendant se commence. Au niveau du bas ventre gauche, le colon descendant se connecte au colon sigmoïde pour arriver au rectum, suite à une série d'une à plusieurs boucles en forme de S dans le bassin, et le rectum atteint jusqu'à 15 cm de longueur, et se termine ainsi à l'anus (Karunaharamoorthy & Dimitrios, s. d.).

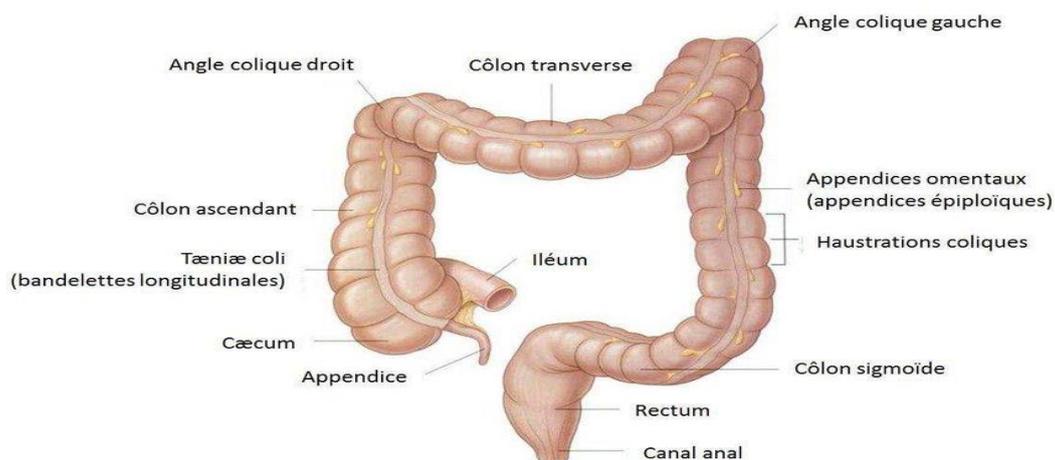


Figure 1: Schéma générale de la structure du gros intestin (Drake et al., 2006)

Bien que l'enveloppe musculaire du colon soit composée de différentes couches longitudinales circulaire, internes et externes, comme on en trouve ailleurs dans l'intestin, et précisément dans le colon, des fibres musculaires longitudinales qui sont concentrées en trois longues bandes

plates appelées tœnia coli. Ces derniers sont propagés au long du colon ainsi qu'elles sont également déroulés autour de la circonférence. Le tœnia postérieur contribue à allonger la frontière, qui s'attache au mésentère, le tœnia antérieur est situé à un tiers de la circonférence autour de la face antérieure du colon, et le tœnia latéral s'étend le long du côté media du colon ascendant et descendant aussi que sur la face inferieur du colon transverse. Les tœnias sont les plus courtes que les autres couches du colon, c'est pour ça la contraction de la paroi se provoque, aussi que la formation des sacculations qui sont appelées HAUSTRAE (Drake et al., 2006).

On trouve aussi le canal anal et le rectum inferieur qui présente un intérêt particulier. Alors, au niveau du canal anal supérieur, il existe un certain nombre de plis longitudinaux qui sont produit par un repliement de la muqueuse et de la couche musculaire, qui portent le nom de colonnes rectales de MORGAGNI. Ils sont séparés les uns des autres par des sinus rectaux qui se terminent distalement par de petits plis valvulaires appelés valves anales. Au-dessus, dans le rectum à plusieurs niveaux, se trouvent trois à quatre plis semi-lunaires transversaux appelés valves de HOUSTON. Ainsi, La tunique musculaire qui entoure le canal anal a une fonction sphinctérienne spécialisée. Et Le muscle lisse circulaire interne s'épaissit pour former le sphincter anal interne. Autour de cela se trouve un anneau circulaire de muscle strié appelé le sphincter externe (Heitmann et al., 2021)

2. Histologie

a Colon

Grace à une coupe transversale en microscope optique, on distingue que la paroi colique (figure 2) présente cinq couches par laquelle le tube digestif est caractérisé, qui sont : muqueuse, musculaire muqueuse, sous muqueuse, musculuse, et séreuse (Mahadevan, 2017)

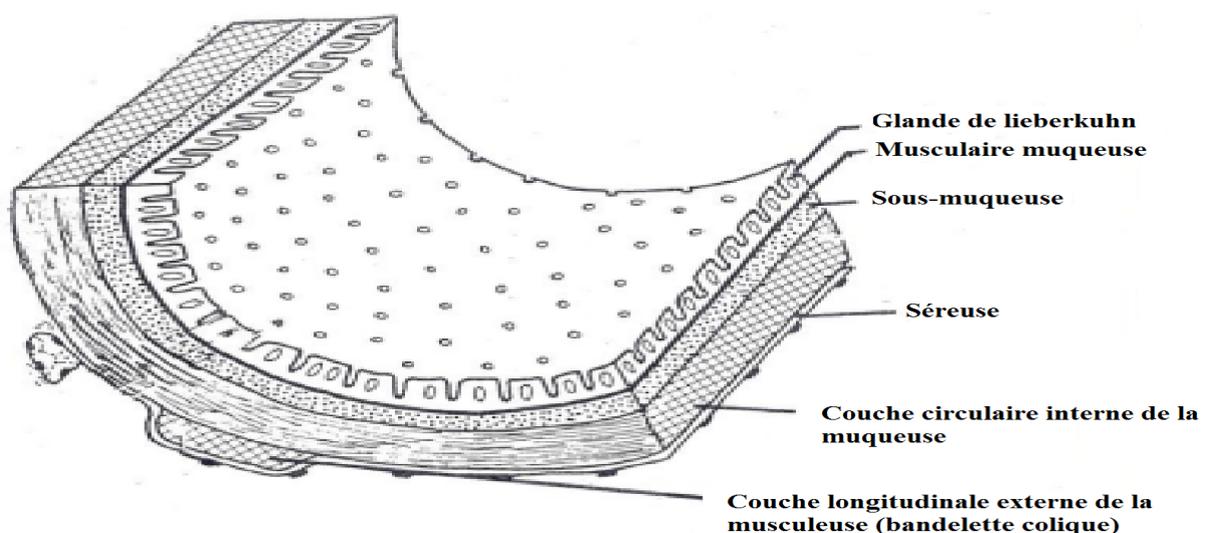


Figure 2: Schéma d'une coupe transversal des différentes couches de la paroi colique (Histologie de tube digestive 2013)

Les caractéristiques histologiques spécifiques au colon s'observent au niveau de la muqueuse et la musculuse, il se différencie de l'intestin grêle par :

- Absence de valvules conniventes
- Absence de villosités : la muqueuse est lisse, elle se limite à la couche des glandes de Lieberkuhn

La muqueuse colique : La muqueuse est tapissée d'un épithélium de revêtement dite cylindrique simple, qui s'invagine en cryptes donnant les glandes de Lieberkühn, avec de longues microvillosités (figure3). Il est recouvert d'une couche de mucus qui facilite le transport des matières fécales.

La muqueuse ne contient pas de villosités mais de nombreuses cryptes de Lieberkühn dans lesquelles se trouvent de nombreuses cellules caliciformes 70% environ dont le nombre augmente progressivement que l'on se rapproche du rectum et des cellules entéroendocrines.

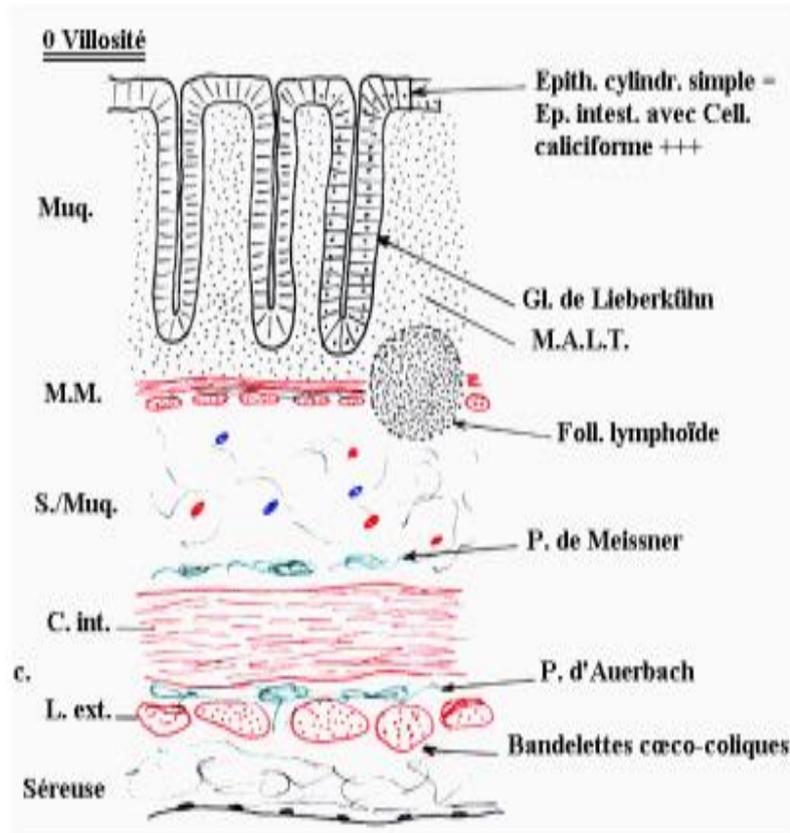


Figure 3:schéma de structure histologique de la muqueuse colique(SHamida, 2020)

La musculaire-muqueuse (M.M) : présente les plexus de Meissner et de nombreux plexus veineux, et elle se constitue de deux couches : Circulaire interne et longitudinale externe.

La sous-muqueuse (S.Muq) : c'est une couche classique, de tissu conjonctif lâche, sans particularité, et qui est riche en nodules lymphoïdes.

La musculuse : porte deux couches différentes : circulaire interne et longitudinale externe

- **une couche circulaire interne (CCint)** épaisse se caractérise par des nombreux renforcements circulaires qui ont un aspect particulier de la surface sous forme de sorte de bosselures appelés les haustrations.
 - **Une couche longitudinale externe (CLE)** réduite, se distingue de la couche circulaire interne par trois renforcements : les bandelettes coeco-coliques, formant le Tænia coli
- Entre ces deux couches, on retrouve les éléments nerveux du plexus d'Auerbach.(SHamida, 2020)

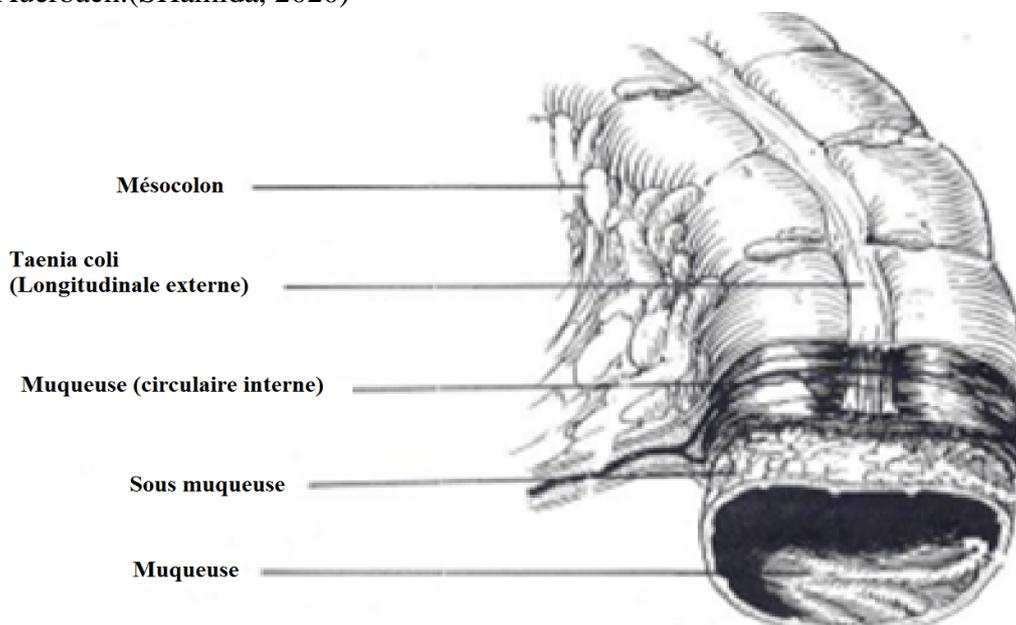


Figure 4: Schéma des deux couches de la musculuse (SHamida, 2020)

La séreuse : c'est la couche externe du côlon sans particularités, qui correspond par un tissu adipeux abondant et vascularisé bordé de la séreuse (péritoine) en périphérie et quelques formations adipeuses.(SHamida, 2020)

b Rectum

Le rectum et le colon ont des structures histologiques presque similaires, la seule différence se trouve au niveau de la muqueuse, dans laquelle le nombre des cellules caliciformes est plus élevé.

Au niveau de la musculuse, la couche longitudinale est continue et n'est pas réduite à trois bandelettes.(SHamida, 2020).

II. Cancer colorectal

1. Épidémiologie

Le Cancer colorectal (CCR) est le cancer le plus fréquent dans le monde, il est classé le 3ème après le cancer de sein et de prostate, et c'est le 2^{ème} cancer digestif au Maroc après le cancer d'estomac, chaque année il touche plus de 1271 de cas et 1185 comme nombre de décès d'après les estimations de l'OMS (Belhamidi et al., 2018).

C'est un cancer qui se déclare après l'âge de 60 ans, qui est donc rare avant 45 ans, son incidence est similaire pour les 2 sexes jusqu'à 60 ans, et après la prédominance devienne chez les hommes. Au Maroc, l'âge moyen de déclaration du CCR d'après l'institut national d'oncologie(INO) est 51,5% ans avec 26,5 ans des patients âgés de moins de 40 ans pour le cancer de rectum (Belhamidi et al., 2018).

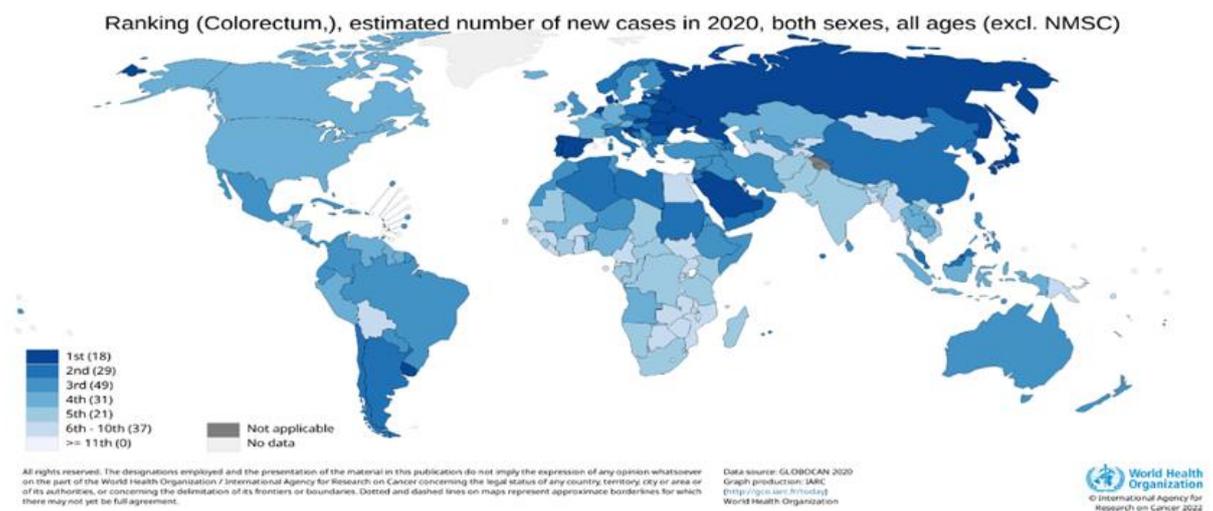


Figure 5: Classement du cancer Colorectal- le nombre estimé des nouveaux cas en 2020 selon Globocan

Il est donc fondamental de déterminer les facteurs de risques accessibles à une prévention primaire ou secondaire, l'alimentation est le facteur exogène de loin dans l'étiologie du CCR.

La majorité des CCR se développent à travers la séquence adénome-carcinome, qui permet la prévention du cancer tout en éliminant les lésions précurseurs, l'identification aux premiers stades, et presque 70% des CCR sporadiques se manifestent à partir des polypes adénomateuses (Shaukat et al., 2021).

En 1975, le CCR a connu une propagation élevée au niveau mondiale, avec un taux variant selon les pays, et en 1980, il a commencé de décliner, grâce à des changements de facteurs de risques, la détection précoce et l'élimination des polypes précancéreuses par la coloscopie (Shaukat et al., 2021)

Il est déclaré que près de 5% des CCR ont des liaisons à des anomalies génétiques constitutionnelles par mutation du gène *APC* ou de gène *MUTYH* dans la polypose adénomateuse familiale (Menahem et al., 2020)

2. Développement du cancer colorectal

Le CCR se développe lentement, pas de symptômes jusqu'il atteint une taille de quelque centimètres, qui donne lieu aux matières fécales de se bloquer et entrainer par la suite des crampes, des douleurs et des saignements, et parfois l'existence des selles sombres ou bien goudronneuse à cause de la présence su sang. Souvent les tumeurs qui se produisent au niveau du colon, se développent via un processus en plusieurs étapes suivant une série de changement histologiques, morphologiques, et génétiques qui s'accumulent par le temps (Balchen & Simon, 2016)

3. Facteurs de risque

Il est généralement difficile de savoir pourquoi une personne a développé un cancer colorectal. Surtout qu'il appartient parmi les des maladies multifactorielles et l'ensemble des facteurs pouvant conduire à son apparition n'est pas connus. Toutefois, l'étude des mécanismes biologiques qui sont à l'origine du cancer a permis d'identifier un certain nombre de facteurs qui augmentent le risque de cancer(Balchen & Simon, 2016).

On dissocie généralement les facteurs de risque en deux groupes :

- Facteurs de risque Modifiables : l'alimentation, l'obésité, le manque d'activité physique, le tabagisme et la consommation modérée à forte d'alcool.
- Facteurs non Modifiables : Les Antécédents Familiaux ou Personnels de polypes colorectaux ou CCR, les conditions héréditaires tel que le syndrome de lynch, des antécédents raciaux, et bien sur la présence d'un diabète de type 2(Balchen & Simon, 2016)

La majorité des Cancers surviennent chez les personnes qui présentent un risque moyen, on parle ici d'âge, qui est le facteur le plus important dans ce cas (Recio-Boiles & Cagir, 2022).

III. Physiopathologie et anatomopathologie cancéreuse du colon

1 Lésions tissulaires précancéreuses

Le CCR se développe à partir des changements au niveau des polypes bénins et précancéreux. Ces polypes sont des excroissances localisées ou bien des agrégations de cellules anormales dans la muqueuse intestinale qui se montre dans la lumière intestinale.

Les cellules qui se divisent dans ces polypes s'accumulent suite à des modifications génétiques par lesquelles elles acquièrent la capacité d'envahir la paroi intestinale.

Il existe deux principaux types de polypes à potentiel malin, les adénomes et les polypes dentelés sessiles (PSS-Sessile Secreted Polypes) chacun est relié à des risques différents pour se développer à un CCR (Balchen & Simon, 2016).

1.1 Adénomes

La plupart des cancers proviennent de lésions tumorales précancéreuses, adénomes, qui sont des tumeurs épithéliales glandulaires bénignes.

Une séquence de transformation qui existe dans le développement du cancer : muqueuse normale après un adénome suite d'un adénocarcinome par accumulation de modifications génétiques impliquant des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeurs (Kuipers et al., 2015).

La transformation d'un adénome en adénocarcinome se fait dans un délai estimé de 10 à 20 ans.

Macroscopiquement, l'adénome parfois correspond à un polype sessile ou pédiculé. Il peut être aussi un adénome plan défini par une lésion adénomateuse inférieure à deux fois la hauteur de la muqueuse normale (Sawicki et al., 2021).

En globale, les adénomes ont une histologie tubulaire avec des petites glandes arrondies et atypiques, mais souvent qu'ils développent des zones d'architecture filamenteuse longue selon bien sur leur croissance, comme ils sont connues par le nom villosité ou tubulovillosité dans les rapports de pathologie. Donc, les adénomes sont caractérisés par un faible degré d'atypie cellulaire et structurelle dite dysplasie (Balchen & Simon, 2016).

Les adénomes sont classés en fonction de leur :

- aspect endoscopique (sessile, pédiculé, plan) ;
- architecture microscopique (tubuleux : plus de 80 % de tubes ; tubulo-villeux, vilieux : plus de 80 % de villosités) ;
 - ⇒ Adénomes Tubulo-villeux et vilieux sont des adénomes contiennent 25% du contenu vilieux, et ils se caractérisent par une grande taille et un grand potentiel d'hébergement de cellule cancéreuse.
- degré de dysplasie (bas grade, haut grade).

D'un autre côté, on trouve les SSP qui ont une forme plate, ressemblent à des tapis, avec des glandes dentelées, ils comprennent 3 types de sous adénomes : les adénomes dentelés sessiles, les adénomes dentelés traditionnels et les polypes mixtes (SHamida, 2020).

1.2 Autres types de polypes

Souvent le cancer colorectal se manifeste à cause de certaines polypes qui se développent ;

Alors, il existe deux types de polypes : les adénomateux comme on a déjà mentionné « L'Adénome », et aussi il y a les non adénomateux, leur dénomination est fonction de leur composition tissulaire.

Parmi les principaux types de polypes colorectaux non adénomateux, on trouve :

- Les polypes hyperplasiques qui se particularisent par l'absence de risque de dégénérescence, et ils atteignent plus de 1 cm, parceque généralement, ils ne sont pas, juste, des polypes hyperplasiques classiques mais aussi d'adénomes à morphologies particulière appelées sessiles festonnées.
- Les polypes hamartomateux : c'est tout à fait, l'inverse des polypes hyperplasiques, car elles se caractérisent par un taux élevé de risque de dégénérescence, mais heureusement qu'elles sont rares, par exemples il y a les polypes juveniles, polypes de types Peutz-jeghers, et en dehors de leurs aspect hamartomateux, elles peuvent se voir de manière sporadique.
- Les Pseudo-polypes au cours des colites : sont des polypes constitués d'une zone de muqueuse en régénération, qui se trouve entre deux zones ulcérées, afin de réaliser une saillie dans la lumière colique (*Tumeurs du côlon et du rectum*, s. d.).

2 Progression tumoral : de l'adénome vers le carcinome

2.1 Changements histologiques et morphologiques

Bien que les cellules à l'intérieur du polype prolifèrent, la taille du polype augmente et les mutations génétiques et les changements épigénétiques peuvent commencer à s'accumuler ; cela se traduit par une dysplasie cytologique et histologique. À mesure que les dommages à l'ADN cellulaire augmentent avec le temps, les caractéristiques de la dysplasie de haut grade peuvent se développer (figure 6A), ce qui implique un très haut degré de risque de progression vers un carcinome invasif. S'ils ne sont pas retirés, ces polypes peuvent développer la capacité d'envahir les tissus voisins et de se développer dans et au-delà de la paroi du côlon et du rectum. Cette croissance maligne localisée peut devenir néovascularisée, offrant ainsi un accès facile aux systèmes lymphatique et circulatoire et favorisant ainsi la propagation des cellules cancéreuses vers des organes distants. La détection et la résection précoces des polypes précancéreux sont essentielles pour interrompre la séquence de l'adénome carcinome et prévenir le développement et la propagation du CCR (Balchen & Simon, 2016).

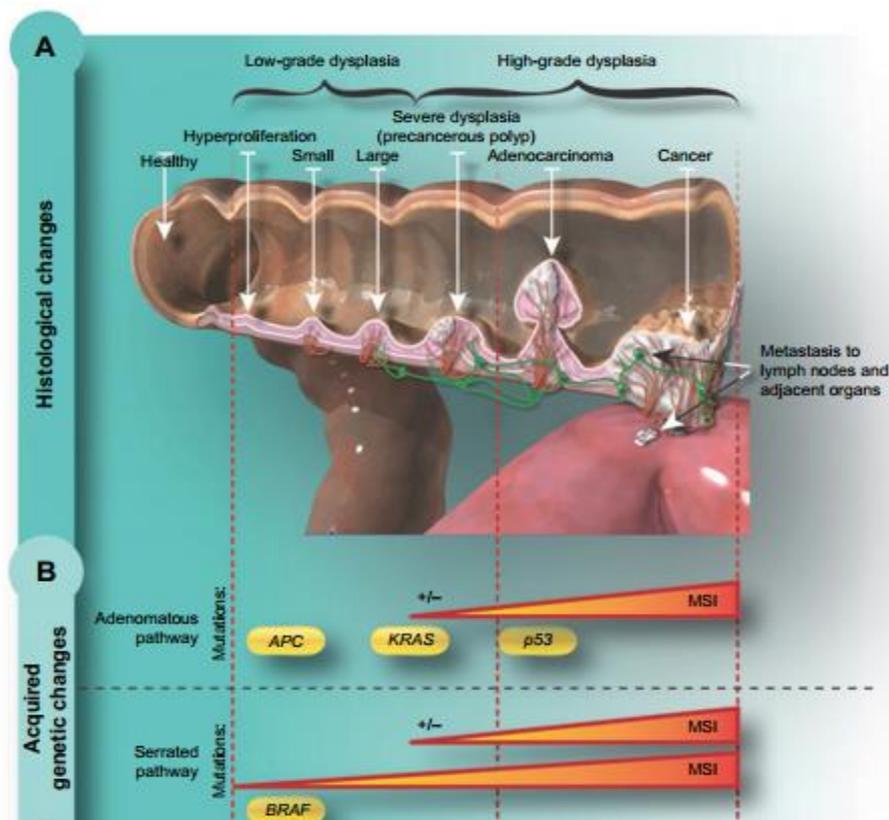


Figure 6: Les changements histologiques au cours du développement du CRC (Balchen & Simon, 2016). A : Changements histologique ; B : Changement génétiques

2.2 Modification génétiques

La progression histologique du polype au cancer est le résultat d'une série et/ou d'une accumulation de changements génétiques et épigénétiques. Les mutations de l'ADN peuvent être acquises ou héritées. Véritables mutations héréditaires associées au CCR, telles que la *MLH1*, *MSH2*, *PMS2*, et la mutation génétique de l'*APC*, sont rares et représentent environ 5 % des CCR. Cependant, l'étude de ces mutations héréditaires, en plus de se produire sporadiquement, *APC* et les mutations de réparation des mésappariements de l'ADN, ont fourni des informations clés sur la progression génétique par étapes des polypes précancéreux au cancer (Balchen & Simon, 2016).

Il existe deux principales voies génétiques qui conduisent au développement du CCR, la voie adénomateuse et la voie dentelée (figure 6B).

Ceux-ci correspondent généralement aux deux types de polypes à partir desquels le CCR se développe : les adénomes et les SSP. La voie de l'instabilité chromosomique, généralement associée aux adénomes traditionnels, est observée dans 65 à 70 % de tous les cancers sporadiques et se caractérise par une cascade de mutations qui s'accumulent. Typiquement, les premières mutations qui se développent se situent dans le gène *APC*, qui affecte la ségrégation des chromosomes lors de la division cellulaire. (Menahem et al., 2020)

Des mutations ultérieures se développent alors dans le *KRAS* oncogène, qui a des effets en aval sur la croissance, la différenciation, la motilité et la survie des cellules. Au fil du temps, ces mutations peuvent entraîner une perte de fonction du gène *p53*, qui est un maître régulateur de la transcription et de l'apoptose, impactant ainsi un large éventail de fonctions cellulaires qui aboutit finalement à la cancérogenèse. En revanche, le développement des SSP a tendance à commencer par des mutations dans le gène *BRAF*, ce qui entraîne une altération de la signalisation de croissance et une perte d'apoptose. Les mutations de *KRAS* peuvent également se produire dans les SSP, mais elles sont beaucoup moins fréquemment associées aux SSP que les polypes adénomateux. Une autre altération épigénétique courante observée dans le CCR à base de lésions en dents de scie est l'hyperméthylation aberrante de la région du promoteur du gène. La méthylation de la région promotrice inhibe la transcription des gènes, désactivant fonctionnellement les gènes affectés. Cette désactivation de gène affecte de nombreux gènes, y compris ceux qui régulent d'autres gènes favorisant la croissance. Les gènes méthylés de manière aberrante associés au phénotype de méthylation des îlots CpG comprennent, entre autres, la protéine morphogénique osseuse 3 (*BMP3*) et le gène N-Myc régulé en aval 4 (*NDRG4*) (Balchen & Simon, 2016).

Un autre mécanisme qui conduit à la diversité génétique dans le CCR est l'instabilité des microsatellites (MSI), qui est causée par la perturbation des gènes de réparation de l'ADN. La MSI peut entraîner une réplication inégale de séquences d'ADN répétitives dans de courtes régions non codantes (microsatellites) et une sensibilité accrue à des mutations génétiques supplémentaires. La MSI peut survenir à la fois dans les polypes adénomateux et dentelés et est associée à des mutations germinales des gènes de réparation des mésappariements de l'ADN (dans le cancer colorectal héréditaire sans polypose) ainsi qu'à des mutations sporadiques dues à une méthylation aberrante des régions promotrices MLH1 (associées au phénotype méthylateur des îlots CpG) (Boland & Goel, 2010; Collura et al., 2019).

3 Forme héréditaires du cancer colorectal

3.1 Polyposes adénomateuses familiales

La polypose adénomateuse familiale est une maladie héréditaire qui se transmet de génération en génération. Elle commence dès la puberté et se manifeste par l'apparition de centaines ou de milliers de petites excroissances, les polypes, dans le côlon et le rectum (Carr & Kasi, 2022).

Sans traitement, ces polypes adénomateux, dégénèrent en cancer avant l'âge de 40 ans. Ce qui explique qu'un traitement doit être fait, en commençant par des tests génétiques chaque fois que possible. Cela permet d'identifier la personne avant que la maladie se développe. Ce test génétique est réalisé sur toutes les personnes à risque vers l'âge de 12 ans (c'est-à-dire les parents au premier degré de ceux qui ont déjà été diagnostiqués : parents, frères et sœurs, enfants) (Anne-Christel Rolling & Olivier Cauquil, 2011).

3.2 Syndrome de lynch

Le syndrome de Lynch, parfois appelé syndrome HNPPC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer ou Cancer colorectal héréditaire sans polypose), a été décrit pour la première fois en 1895 suite à une étude au niveau d'une famille présentant de nombreux cas de cancers des spectres digestif et gynécologique sans identification du syndrome sous-jacent. Le syndrome de Lynch a pu être plus clairement défini et identifié dans les années 1960 (Idos & Valle, 1993).

C'est une affection génétique caractérisée par une anomalie constitutionnelle touchant les gènes de réparation de l'ADN du système MMR (Mismatch Repair), ainsi que c'est une prédisposition génétique au cancer, de transmission autosomique dominante à pénétrance incomplète. L'étude

approfondie des familles de malades a permis l'identification de mutations des gènes *MSH2* puis *MLH1*(Bouguenouch et al., 2016).

Le syndrome de Lynch représente environ 3 % des cancers colorectaux et 2 % des cancers extracoliques les plus fréquents dont le cancer de l'endomètre. Le phénotype du syndrome de Lynch comprend une propension aux cancers du côlon proximal, une faible différenciation tumorale avec des caractéristiques histologiques de cellules mucineuses, ou une abondance de lymphocytes infiltrant la tumeur et des cancers colorectaux synchrones et métachrones (Goodenberger & Lindor, 2011; Idos & Valle, 1993).

4 Cancer colorectal à l'échelle moléculaire

En 1975, Le premier proto-oncogène ; un gène ayant la capacité après son altération d'induire un cancer à partir de cellules normales ; est découvert, et à ce niveau l'analyse moléculaire est entrée dans l'étude des cancers, ce qui explique que l'oncologie moléculaire est une discipline plus récente. Précédemment, les cancers ont été reconnus comme des maladies dues aux accumulations progressives des altérations génétiques ou épigénétiques, précisément dans des oncogènes et dans des gènes suppresseurs de tumeurs. Les oncogènes jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération et de la survie cellulaire, et à cause de leur activation la transformation tumorale s'induit. Et à l'inverse, et aux conditions normales, les gènes suppresseurs de tumeurs inhibe la croissance et la prolifération, et malheureusement, leur inactivation bloque l'inhibition qui favorise le développement tumoral(Bullinger & Schliemann, 2013).

En 1990, Fearon and Vogelstein, ont découvert la première séquence de transformation d'un épithélium colique sain en adénocarcinome invasif du cancer colorectal, et grâce à cette découverte de ce modèle, plusieurs mutations et différentes formes d'instabilité ont été découvertes et décrites dans le CCR (Fearon & Vogelstein, 1990).

4.1 Mutations clés de la tumorigénèse colique

a Séquence adénome-carcinome : le modèle de Fearon et Vogelstein

En 1990 Fearon et Vogelstein ont présenté les gènes et les altérations à chaque phase de la tumorigénèse, de l'épithélium normal au carcinome(figure7), en passant par les différentes étapes de la progression des adénomes .Le gène suppresseur de tumeur APC a été identifié

comme étant impliqué dans l'initiation des cancers colorectaux (Adenomatous Polyposis Coli). Lorsque APC est épuisé, la voie de signalisation Wnt/-caténine est activée de manière constitutionnelle, ce qui entraîne une prolifération anarchique continue des cellules coliques (Fearon & Vogelstein, 1990).

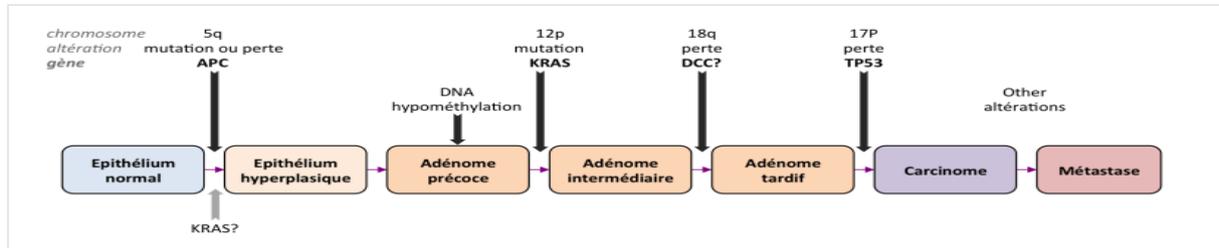


Figure 7: Modèle de tumorigénèse Colorectale de (Fearon & Vogelstein, 1990)

Le complexe protéique-caténine que forme le type sauvage d'APC s'y lie, l'empêchant de se déplacer vers le noyau pour activer ses cibles, qui comprennent des gènes spécifiques de la prolifération cellulaire. Les pertes de méthylation de l'ADN, qui sont fréquemment observées dès les premières formes d'adénome, font partie des mutations ou épimutations que le polype qui résulte de cette mutation est plus susceptible d'acquérir. En raison de cette hypométhylation, le polype peut devenir plus enclin à d'autres mutations qui lui permettent d'évoluer vers une forme néoplasique, ce qui peut être à l'origine d'une instabilité du génome qui se traduit par des pertes et des gains de chromosomes. Deuxièmement, la transformation du polype hyperplasique en polype dysplasique est causée par une mutation activatrice du gène *KRAS*, qui entraîne une prolifération cellulaire accrue. Le facteur de croissance épidermique (EGF), entre autres facteurs de croissance, active l'enzyme *KRAS* par des voies de signalisation. Il est intéressant de noter que le présent article de Fearon et Vogelstein, souligne que *KRAS* est un oncogène capable de conférer des caractéristiques néoplasiques et qu'il pourrait être l'événement déclencheur dans un sous-ensemble de tumeurs, bien qu'il joue un rôle plus tardif dans l'oncogénèse de la plupart des tumeurs. (Fearon & Vogelstein, 1990)

Des changements ultérieurs interviennent. Les gènes suppresseurs de tumeurs situés sur le bras q du chromosome 18, comme *DCC* (deleted in colorectal cancer) et *SMAD4/SMAD2*, qui sont impliqués dans la voie de signalisation du TGF-, permettent le passage à des formes très avancées d'adénomes lorsque ce chromosome est perdu. L'adénocarcinome se développe à la suite de la perte fréquente du gène suppresseur de tumeur *TP53*, situé sur le chromosome 17. En plus de ces diverses mutations, les cellules cancéreuses présentent également un haut degré d'instabilité qui se caractérise par des gains et des pertes de fragments chromosomiques. Cette instabilité permet aux cellules cancéreuses d'envahir les tissus voisins. L'étude menée par

Fearon et Vogelstein montre que, malgré la présentation séquentielle de l'acquisition des mutations - qui semble être la voie privilégiée - c'est plus l'accumulation que l'ordre qui semble être important, car les altérations observées dans certaines tumeurs peuvent survenir à divers stades de la progression tumorale. Cette hypothèse a ensuite été étayée par de nombreuses études, qui ont révélé que seulement 10 % des CCR présentaient des co-mutations dans les trois gènes *APC*, *KRAS* et *TP53*. Cela suggère que d'autres voies seraient impliquées dans la carcinogenèse colique et que ce modèle est trop simplifié et ne représente fidèlement que la biologie de certains CCR (Jass J R, 2007).

b Mécanisme moléculaire de carcinome génétique du CCR

i- Instabilité chromosomique CIN

Dans la plupart des polyadénomes "PAF" familiaux et dans 80 % des cancers sporadiques une aneuploïdie cellulaire est observée à cause de l'inactivation complète des gènes suppresseurs de tumeur indiquant par la suite une instabilité chromosomique, qui entraîne ainsi la perte ou le gain de chromosomes entiers ou de segments chromosomiques (perte allélique).

Les régions qui sont souvent connues par cette perte dans les tumeurs colorectales primaires sont localisées sur les bras courts des chromosomes 17, 8 et sur le bras long des chromosomes 18, 5 et 22 (Karoui et al., 2007).

Une instabilité chromosomique peut être observée dès les premiers stades de la carcinogenèse colorectale, et une perte chromosomique peut être observée dans la grande majorité des adénomes (Rajagopalan et al., 2003).

Les mécanismes à l'origine de l'instabilité chromosomique n'est pas bien comprise, mais il a été démontré que des mutations du gène *APC* conduisant à la formation de codons stop peuvent favoriser la CIN. c'est à dire que la protéine APC perd sa liaison à la protéine Bub1, la chose qui empêche la fixation des microtubules au kinétochore, entraînant par la suite une ségrégation chromosomique défectueuse (Grady, 2004; Ried et al., 1996).

ii- Instabilité génétique

Dans un petit sous-ensemble de tumeurs (hereditary non polyposis colorectal cancer - HNPCC - et 15 % des cancers sporadiques), l'instabilité chromosomique était absente dans la plupart des cas et une instabilité a été observée au niveau du locus microsatellite. Les

microsatellites sont des répétitions mononucléotidiques à tétranucléotidiques qui sont largement distribuées dans le génome et sont particulièrement sujettes à des mésappariements lors de la réplication. Ces erreurs physiologiques sont généralement réparées à l'aide de systèmes de réparation des mésappariements d'ADN (MMR). L'instabilité des microsatellites (MSI ou MIN, pour « instabilité microsatellite ») résulte de l'inactivation d'un des gènes impliqués dans le système de réparation des mésappariements (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6*) (Laurent-Puig et al., 2010; Peltomäki, 2003).

L'inactivation de système MMR peut s'entraîner au cours de mutations germinales qui s'associe aux mutations somatiques ou ainsi par méthylation du promoteur *hMLH1* de forme sporadique qui est responsable sur l'inactivation de sa transcription (Boland & Goel, 2010).

En testant des séquences microsatellites d'une longueur connue en utilisant la PCR et en suite, faire comparer la taille des produits d'amplification entre les tissus sains et tumoraux, les phénotypes MSI seront identifiés. L'inactivation du système MMR entraîne l'accumulation de mutations secondaires, qui inactivent de nombreux gènes, conduisant à la transformation de la cellule (Duval & Hamelin, 2002)

IV. Diagnostic moléculaire des polyposes adénomateuses liées au gène *MUTYH*

1 Historique

En 2002, N. Al-Tassan et son équipe ont rapporté le cas d'une famille britannique dans laquelle 3 enfants sur 7 avaient des polypes massifs et un cancer colorectal, tous détectés avant l'âge de 50 ans. Les parents n'avaient aucun antécédent de cancer. Le séquençage de l'ensemble du gène *APC* n'a révélé aucune mutation congénitale, mais il y avait 18 mutations acquises, dont 15 (83 %) étaient des transversions (remplacement des doublets G:C par des doublets T:A). Dans ces tumeurs, des mutations bialléliques se sont avérées inactiver la protéine APC. Cette découverte a conduit l'équipe à étudier trois gènes du système BER impliqués dans la réparation des dommages induits par la 7,8-dihydro-8-oxoguanine (8-oxoG) et conduisant aux transversions G:C→T:A. Ce type de mutation ne correspond qu'à 10% de celles identifiées somatiquement dans le gène *APC*, et les mutations miss-frame et la perte d'hétérozygotie provoquent le plus souvent une inactivation somatique de l'*APC* dans les tumeurs colorectales¹². La comparaison de ce qui a été trouvé dans cette famille britannique, avec une base de données de plus de 800 mutations somatiques dans l'*APC* chez les patients

atteints de CCR sporadique ou associé à la FAP, a confirmé l'augmentation très significative des transversions G:C → T:A dans cette famille (Al-Tassan et al., 2002).

Les composés de l'oxygène réactif avec un potentiel nocif jouent un rôle important dans les processus, comme le cancer et les maladies neurodégénératives. Chez l'homme, on estime que la fréquence des dommages oxydatifs à l'ADN est de 10 000 lésions par cellule et par jour. La 8-oxo-7,8-dihydro-2'-désoxyguanosine (8-oxodG) est l'un des produits nocifs les plus stables des dommages oxydatifs de l'ADN et sa concentration est élevée dans les cancers du sein, du poumon et du rein. Ce composé s'apparie mal avec les résidus d'adénine et provoque des mutations G → T et C → A sur le brin naissant dans la réplication de l'ADN. L'incorporation de 8-oxodG dans l'ADN se fait par oxydation directe des résidus guanine dans la chaîne matrice ou grâce à l'incorporation de 8-oxodG à partir du pool de nucléotides libres.

Les mutations apparaissent après la réplication de l'ADN car les polymérase incorporent des adénosines par rapport au 8-oxodG à un taux beaucoup plus élevé qu'elles incorporent des cytosines (Curia et al., 2020).

Au niveau d'*Escherichia coli*, il existe 3 enzymes qui aident à protéger la cellule contre les effets mutagènes de l'oxydation de la guanine. L'ADN glycosylase MutM élimine la base oxydée des paires de bases 8-oxod G:C dans l'ADN double brin, l'ADN glycosylase MutY clive les adénines incorporées par erreur associées à la 8-oxodG pendant la réplication, et la 8-oxodGTPase MutT empêche l'incorporation de 8-oxodGTP dans le naissant Brin d'ADN lors de la réplication. Les gènes homologues de mutM, mutY chez l'homme ont été identifiés et sont appelés *OGG1*, *MUTYH* et *MTH1*, respectivement. Déterminer si un défaut héréditaire de la voie de réparation 8-oxodG était la cause du schéma de mutations G:C somatique → T:A dans la famille étudiée, Al-Tassan et al ont séquencé les gènes *OGG1*, *MUTYH* et *MTH1* dans l'ADN extrait du sang d'une des personnes atteintes (Sampson & Jones, 2009).

De cette manière, 2 mutations ont été identifiées qui modifient de manière non conservatrice 2 acides aminés du gène *MUTYH* (Y165C et G382D), tandis que les autres frères et sœurs affectés étaient également des hétérozygotes composés pour ces 2 mutations. Le reste des parents non affectés étaient hétérozygotes pour l'un d'entre eux ou non porteurs, indiquant une transmission de la maladie dans cette famille avec un mode de transmission autosomique récessif (Sampson et al., 2005).

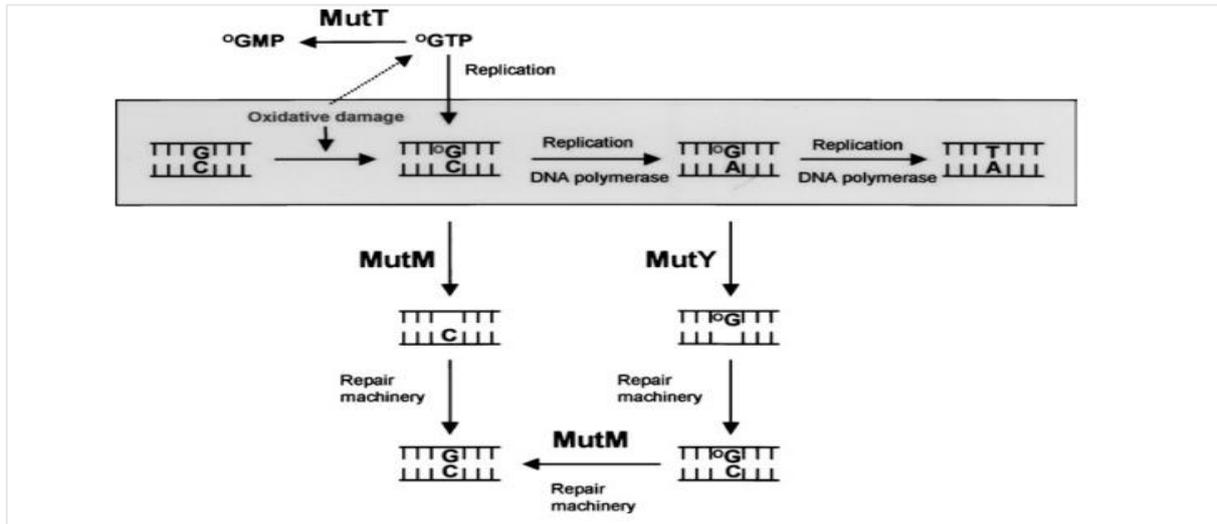


Figure 8 : Enzymes participants à la prévention et à la réparation des dommages à l'ADN associés au 8-oxoG-MutY, MutT et MutM(Sampson et al., 2005)

2 Syndrome de MAP

MAP est une maladie autosomique récessive caractérisée par de multiples adénomes colorectaux, causée par des mutations dans les deux copies des gènes *MUTYH* d'un individu (bialléliques). Il peut n'affecter qu'un seul individu dans la famille ou ne toucher que les individus d'une fratrie par exemple les frères et sœurs d'un individu atteint de MAP ont 25 % de chances d'avoir également la MAP c.à.d hérité des deux mutations et 50 % de chances d'être porteurs, hérité d'une seule mutation). En population générale, 2 % des personnes seraient porteuses d'une mutation monoallélique du gène *MUTYH* et entre une et deux personnes sur 10 000, d'une mutation bi-allélique. la prévalence de cette mutation bi-allélique varie en fonction de la sévérité de la polypose adénomateuse (Buecher, 2011).

3 Gène *MUTYH* et protéine

Le gène *MUTYH* est situé dans le chromosome [1P34.3P32.1] et s'étend à 11,2 Ko. Il contient 16 exons qui couvrent environ 1,6 kb de séquence codante, Dans les cellules humaines, trois transcrits primaires (α , β , γ) ont été identifiés expérimentalement, au moins treize isoformes d'ARNm et neuf protéines isoformes avec différentes séquences d'ARNm 5'-terminal et le N-terminales des protéines, se produisent par la transcription et épissage du pré-ARNm de *MUTYH* (Buecher, 2011).

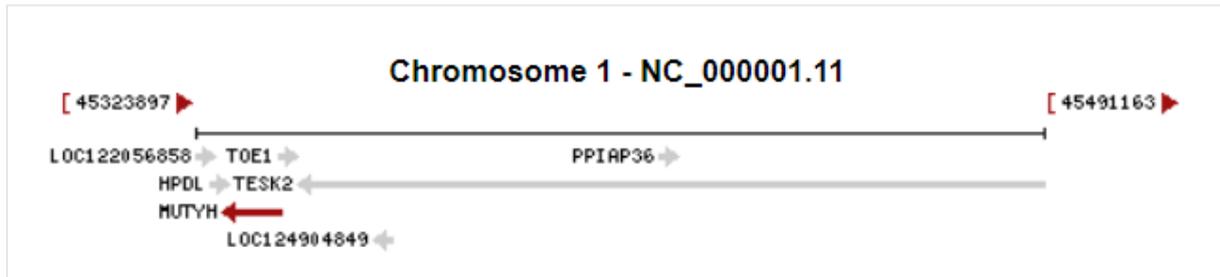


Figure 9: Chromosome 1-Gene MYH (1p34.1)(PubChem, s. d.)

La région N-terminale compose d'un signal de ciblage vers les mitochondries (MTS, mitochondrial target signal/MLS, mitochondrial localisation signal) qui est occupée par l'isoforme MUTYH 1 (p57) qui est le produit du transcrit α . L'exon 3 est exposé à un épissage alternatif à son extrémité 5', avec une inclusion possible de 1, 11 ou 14 codons supplémentaires dans l'ARN messager mature. Un autre variant d'épissage a perdu les 64 premiers nucléotides, consiste à attendre la synthèse d'un isoforme nucléaire commençant dans l'exon 4. Un autre isoforme de produit (535 acides aminés, 57-59 kDa, issue du transcrit α 3), qui est la forme la plus abondamment exprimée, contient le site MLS (acides aminés 1- 14) et est localisée dans les mitochondries. L'isoforme MUTYH 2 (p60) (521 acides aminés, 52-53 kDa, issue des transcrits β 3, β 5 et γ 3) correspond à l'isoforme nucléaire majeur dépourvu du site MLS et localisé dans le noyau. De plus, il existe un gène qui se chevauche, Target Early Growth Response 1 (*EGR1*) membre 1 (*TOE1*)- empêche le taux de croissance cellulaire et le cycle cellulaire-à l'extrémité 5' de *MUTYH*, et la transcription de ces deux gènes se déroule dans des directions opposées (Curia et al., 2020).

a Réparation d'ADN par système BER :

Réparation par excision de la base (BER), également connue sous le nom de mécanisme de correction court. Le système de réparation est capable de réparer, par exemple, la désamination spontanée, la dépurination ou l'apyrimidine. Cette réparation entraîne la réparation du site AP (en cas de désamination spontanée, le site AP sera créé en premier). Ce mécanisme fait intervenir les ADN glycosylases (cette protéine existe sous plusieurs types). Cette ADN-glycosylase reconnaîtra et excisera spécifiquement les bases modifiées en clivant la liaison N-glycosidique (entre la base et le désoxyribose).(Lee & Kang, 2019)

Le site AP doit alors être réparé. Cette réparation s'effectue avec deux autres enzymes. La première est l'AP-endonucléase, qui a pour effet de cliver le squelette désoxyribose phosphate contenant le site AP et ainsi d'éliminer le sucre. Par conséquent, la liaison phosphodiester est rompue et le site AP est supprimé. Le trou dans le brin d'ADN est alors complété par l'ADN

polymérase qui se positionne en 3'OH pour ajouter des nucléotides complémentaires par polymérisation. La dernière liaison phosphodiester est formée par l'ADN ligase.(Olsen et al., 2001)

b Analyse fonctionnelle de mutations de *MUTYH*

Il existe quelques mutations de *MUTYH* qui ont jusqu'ici fait l'objet d'une analyse fonctionnelle, et ils ont étudié les mutants Y165C et G382D et ont montré qu'ils avaient une capacité réduite à compléter le déficit en MutY dans *E.coli*. Ils ont également évalué l'affinité du substrat à l'aide de l'analogue de substrat FA (2'-fluoro-2'désoxyadénosine). Les deux mutations ont sévèrement diminué la capacité à reconnaître l'AF et à faire la distinction entre la guanine et le 8-oxoG. L'activité glycosylase des protéines mutantes et de type sauvage a également été notée comme étant moins efficace dans le contexte de séquence qui avait précédemment été noté comme étant préférentiellement muté dans le gène *APC* dans les tumeurs MAP. Deux autres mutations faux-sens, R227W et V232F, qui se trouvent à proximité ou à l'intérieur du domaine putatif de liaison à *MSH6* de *MUTYH* ont également été étudiées. Aucune mutation n'a affecté la liaison de *MSH6*, mais les deux protéines mutantes ont été compromises dans la liaison 8-oxoG:A, dans leurs activités glycosylase et dans la complémentation du déficit en MutY chez *E.coli* (Sampson et al., 2005).

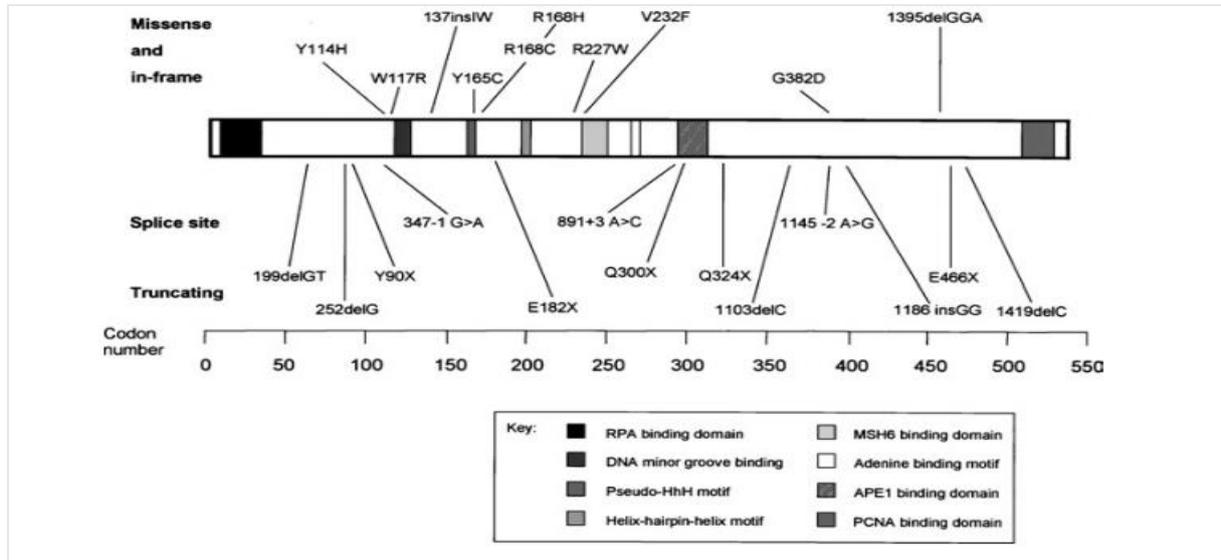


Figure 10: Mutations pathogènes probables affectant *MUTYH* (Sampson et al., 2005)

c *MUTYH* et MMR

Le système DNA MMR sert à augmenter la fidélité de la réplication de l'ADN et de la recombinaison génétique et les protéines impliqués ont également des rôles dans la réparation couplée à la transcription, la méiose, l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose. Trois des

homologues humains de MutS de E.coli, appelés MSH2, MSH3 et MSH6, forment les hétérodimères hMutS α (MSH2–MSH6) et hMutS β (MSH2–MSH3). Ceux-ci reconnaissent les incompatibilités base-base et les courtes boucles d'insertion-suppression (hMutS α) et longues boucles d'insertion-suppression (hMutS β). Il a été démontré que *MUTYH* interagit directement avec hMutS α en se liant à la sousunité MSH6, ce qui stimule la liaison à l'ADN et l'activité glycosylase de MutYH avec les mésappariements 8 oxoG:A. Ainsi, le BER médié par *MUTYH* peut coopérer avec le MMR pour empêcher la mutagenèse médiée par le 8-oxoG (Win et al., 2015).

4 Fonction de protéine MUTYH

MUTYH est une adénine ADN glycosylase bifonctionnelle spécifique à A-G, et est parmi les cinq enzymes initiatrices de BER dans les cellules de humaines, qui joue un rôle indispensable dans la réparation des lésions oxydatives de l'ADN comme il corriger les erreurs liées au métabolisme aérobie des cellules lors de la réplication (Base Excision Repair) (Curia et al., 2020).

Sa fonction glycosylase consiste à éliminer les adénines ou les 2-hydroxy-adénines (2-OH-A) appariées par rapport au 8-oxoG. Le 8-oxoG est donc une forme oxydée de la base guanine dérivée des ROS, produit stable sur l'ADN et a un potentiel d'oxydation inférieur à celui de la guanine (J H Lefèvre, 2013).

C'est l'une des principales lésions mutagènes de l'ADN avec une signification évolutive et adaptative. En effet, le 8-oxoG parvient à se coupler à la fois avec l'adénine et la cytosine lors de la réplication de l'ADN ; Ainsi, cela peut entraîner un taux de transversion élevé de G:C à T:A et A:T à G:C. Cependant, des protéines homologues de *MUTYH* (les procaryotes et les eucaryotes) ont une importance dans la fonction de mécanisme de protection contre les dommages oxydatifs à l'ADN. Chez les mammifères, la connexion entre les domaines *MUTYH* C et N-terminaux, appelée le connecteur interdomaine (IDC), est significativement plus longue que celui de son homologue bactérien (Curia et al., 2020).

Matériel et méthodes

V. Matériel et méthodes

1 Objectif

MUTYH est une enzyme principale parmi les cinq enzymes initiatrices de BER dans les cellules humaines qui rentre à la réparation des lésions oxydatives de l'ADN, aussi qu'elle corrige les erreurs au métabolisme aérobie des cellules lors de la réparation (Buecher, 2011).

Les anomalies déclarées au niveau de cette protéine, contribuent à l'émergence des polypes qui manifestent l'apparition du Cancer Colorectal.

Les mutations du gène *MUTYH* entraînent jusqu'à 5% des cas du CCR héréditaire liés au gène *MUTYH*.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés par l'étude caractères moléculaires des facteurs génétiques du CCR liés au gène *MUTYH*, afin d'améliorer le diagnostic des familles étudiées.

Les objectifs principaux de ce projet sont principalement :

- Etablir la prévalence de deux mutations récurrentes Y165C et G382D du gène *MUTYH* chez une population atteinte de cancer colorectal.
- Installer le diagnostic moléculaire de la polypose liée au gène *MUTYH* comme test de routine dans l'unité de génétique du CHU Hassan II de Fès.
- Prise en charge les patients atteints de la polypose
- Réaliser une étude presymptomatique des membres de la famille des cas porteurs de mutations

2 Patients

L'étude a inclut 101 patients atteints de CANCER COLORECTAL recrutés au niveau du service d'Hépatogastroentérologie et du service de chirurgie viscérale du CHU Hassan II de Fès.

Le principal critère d'inclusion dans l'étude était la présence de CCR quel que soit l'âge, avec ou sans histoire familiale, avec ou sans polypose.

Les informations personnelles telles que le sexe, l'âge, l'âge au moment de diagnostic, et l'histoire familiale des patients ont été saisies lors de l'acceptation à la chirurgie.

Le comité d'éthique de la Faculté de Médecine et de Pharmacie et du CHU Hassan II de Fès a approuvé l'étude sous la référence (08/14).

Pour chaque patient, un prélèvement sanguin de 5ml est effectué et est conservé dans un tube EDTA (Ethylène Diamine Tétra-acétique Acide). Une DNAtèque est constituée à partir des échantillons collectés et stockée à 20°C.

3 Caractérisation moléculaire du gène *MUTYH*

Afin de rechercher les mutations au niveau du gène *MUTYH*, nous avons utilisé des techniques de biologie moléculaire.

Tout d'abord, une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) a été réalisée, pour que les régions codantes des exons ayant les mutations (7/13) du gène *MUTYH* soient amplifiées, puis nous avons effectué un séquençage d'ADN par la méthode de Sanger et déterminer la mutation recherchée.

3.1- Extraction d'ADN

a Protocole

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée selon le protocole du kit Invitrogen™. Dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, nous avons ajouté 200 µl de sang de patient, 20 µl de protéinase K et 20 µl de RNase, puis vortexé le tube (15 sec) et incubé pendant 2 min à température ambiante. Nous avons ensuite ajouté 200 µl de PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer au mélange et les tubes ont été vortexés (15 secondes) et incubés dans un bain-marie à 55°C pendant 10 minutes. Ensuite, 200 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés et le tube a été vortexé pendant 5 secondes. Nous avons ensuite placé le mélange dans une colonne PureLink™ et centrifugé la colonne à 8000 rpm pendant 1 minute.

Après centrifugation, nous avons transféré la colonne dans un tube de collecte de 2 ml, jeté le tube contenant le filtrat, ajouté 400 µl de tampon de lavage 1 et centrifugé à nouveau la colonne à 8 000 tr/min pendant 1 min. Nous avons ensuite transféré la colonne dans un autre tube de collecte de 2 ml et jeté le tube contenant le filtrat, puis nous avons ajouté 400 µl de tampon de lavage 2 et centrifugé la colonne pendant 3 min à 14000 tr/min. Après cela, nous avons mis la colonne dans un tube Eppendorf de 1,5 ml, ajouté 70 µl de tampon d'élution génomique PureLink™ et incubé le tube pendant 1 à 5 minutes à température ambiante. Après incubation, on centrifuge à 8000 rpm pendant 1 min. Enfin, on stocke l'ADN à +4°C (extraction immédiate)

ou -20°C (extraction ultérieure).

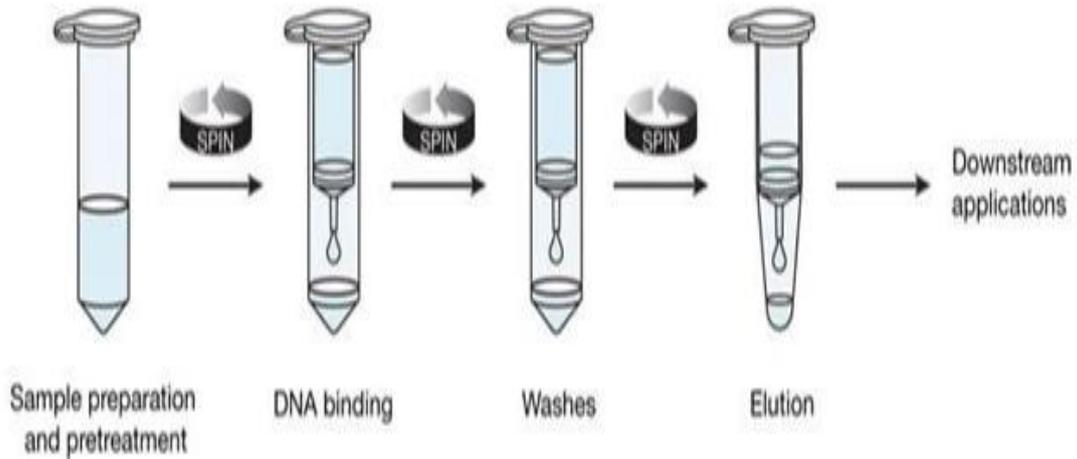


Figure 11: Protocole simplifié d'extraction d'ADN

b Dosage et conservation

Avant de stocker les échantillons d'ADN extraits à -20°C, nous avons effectué un dosage de leurs concentrations par le Nano-Drop « Nano vue plusTM, Thermo Scientific ».

Nano vue plusTM, Thermo Scientific, grâce à des méthodes UV, il permet de quantifier avec précision et fiabilité, la concentration et la pureté des Acides Nucléiques, dans une variété d'unité ($\mu\text{g}/\text{ml}$, $\text{ng}/\mu\text{l}$, $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, $\text{pmol}/\mu\text{l}$ et pmol), il faut noter que la densité optique de l'ADN se mesure à une longueur d'onde (NanoVue, s. d.).

Le rapport d'absorbance 260/280 affiché à l'écran de l'appareil de dosage donne des informations, sur la présence de traces de protéines qui peuvent affecter la qualité d'ADN et gêner les réactions ultérieures, Un affichage graphique du résultat sous forme d'une courbe est également disponible pour s'assurer de la qualité de l'absorbance d'ADN (figure12).

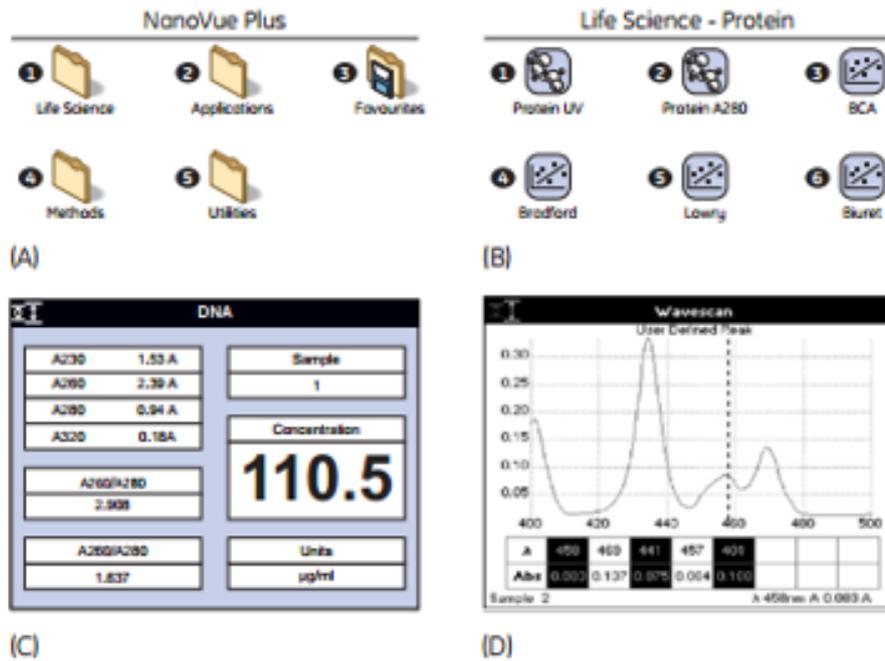


Figure 12: Captures d'écran du spectrophotomètre NanoVue™ ; (A) Interface simple pour une sélection facile des applications ; (B) Interface des méthodes protéiques ; (C) les résultats de quantification de l'ADN et (D) un exemple d'un balayage de longueur d'onde. (NanoVue, s. d.)

3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Rappelons que le gène MYH est situé au niveau du chromosome 1 qui se constitue de 16 exons.

Et afin d'explorer ce gène, il est nécessaire d'amplifier les régions codantes. C'est pour cela, la technique de polymérisation en chaîne (PCR) est réalisée, c'est une technique qui permet, via un programme de cycles dénaturation, hybridation et élongation, d'amplifier in vitro une séquence spécifique d'un ADN donné grâce à une ADN polymérase thermorésistante (Taq polymérase) dans le but d'avoir une quantité suffisante pour pouvoir l'étudier ultérieurement.

Afin d'amplifier les exons 7 et 13, régions codantes ayant les mutations dans le gène *MUTYH*, nous avons utilisé deux couples d'amorces.

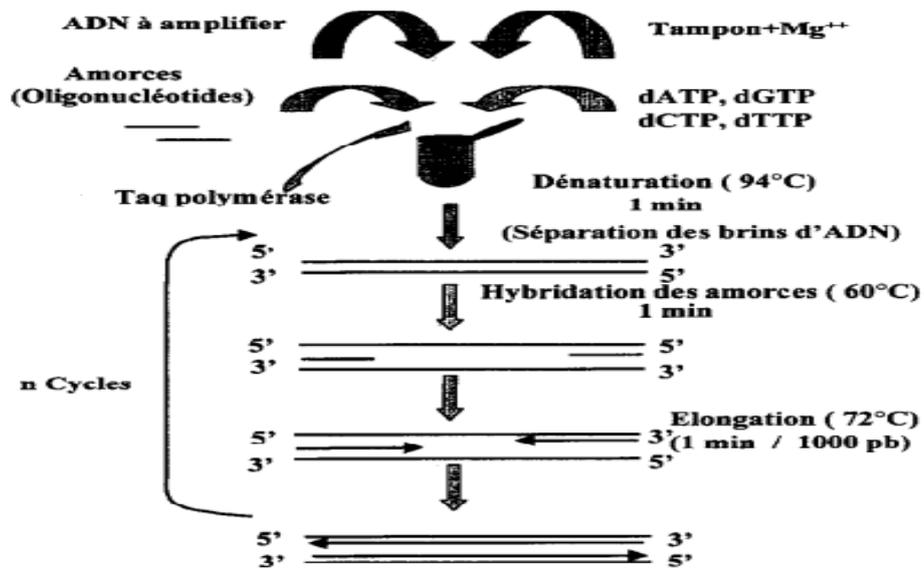


Figure 13: Principe de la méthode réaction de polymérisation en chaîne PCR (Laudenbach et al., 1999)

a Protocole

Dans un premier temps, nous préparons les tubes Eppendorf de 0.2 ml selon le nombre des ADN que nous souhaitons amplifier. Un contrôle positif est utilisé (échantillon normal), un contrôle négatif (ne contenant aucun ADN) et l'ADN des patients à étudier. Les tubes sont ensuite identifiés, puis le mix PCR est préparé.

On aliquote le mix préparé dans les différents tubes, puis on ajoute dans chaque tube 1 µl d'ADN correspondant.

Tableau I : Composition du milieu réactionnel de Mix PCR

Réactif	Volume en µl
Eau distillée	12 µl
DreamTaq Green PCR Master Mix (2X)	10 µl
Amorce Forward (10 µM)	1 µl
Amorce reverse (10 µM)	1 µl
ADN	1 µl
Volume finale	25 µl

Ensuite, les tubes sont placés dans le ThermoCycleur et le programme de dénaturation/hybridation/ élongation est lancé.

Le programme employé est le suivant :

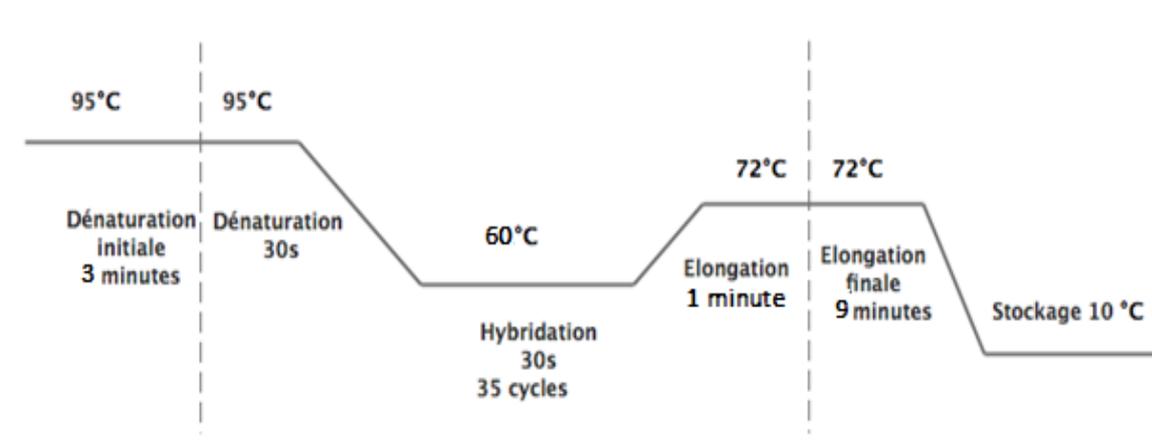


Figure 14: Le programme des cycles des réactions de PCR.

b Electrophorèse :

➤ Protocole

Alors, on prépare le gel d'agarose est préparé à 2% (2g d'agarose pour 100 ml de tampon de migration TBE (Tris Borate EDTA)) 10X dilué à 10%. Le mélange est porté à ébullition puis 2 μ l de BET (Bromure d'éthidium) sont ajoutés. Le gel préparé est coulé dans un moule à électrophorèse, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel (environ 30 minutes) en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN. Après refroidissement, on installe le moule dans la cuve qui est remplie du tampon de migration, on dépose dans chaque puits un mélange de 7 μ l de produit PCR. Et finalement, on visualise les bandes d'ADN fluorescentes sous UV.

3.3 Séquençage de Sanger

Le séquençage de l'ADN est une méthode visant à déterminer la séquence linéaire des bases A, C, G et T impliquées dans la structure de l'ADN (figure 15).

Cette technique initialement appliquée par Frederick Sanger en 1977, et reste la plus utilisée dans le monde à l'heure actuelle, qui consiste l'utilisation des kits spécifiques, de marquage par quatre fluorophores, ainsi que l'automatisation du processus (Lamoril et al., 2008).

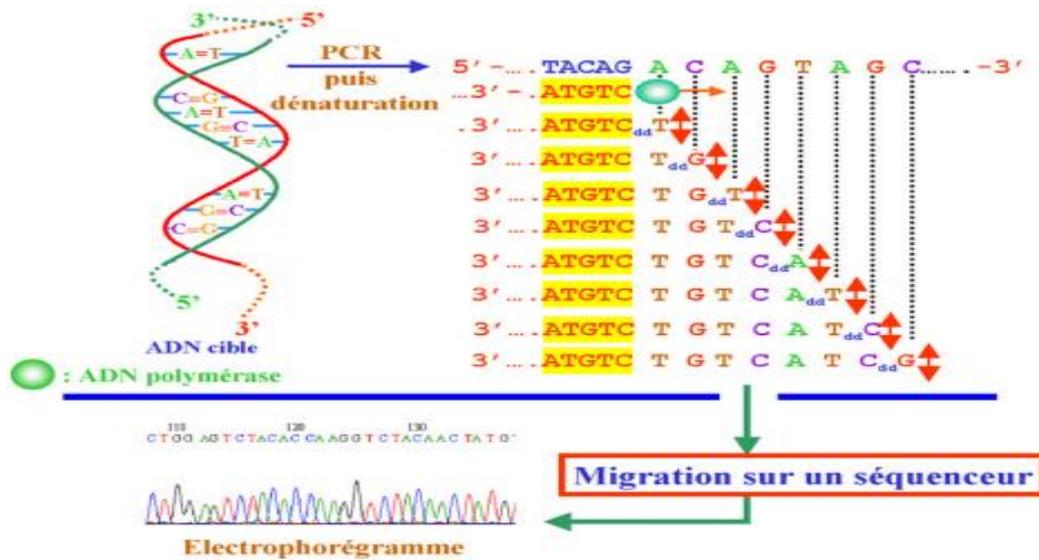


Figure 15: Principes du séquençage selon la méthode de Sanger

Avant d'entamer le séquençage, il faut passer par des étapes de préparation du produit à séquençer afin d'obtenir un résultat optimal.

Protocole

Le processus de séquençage comprend trois étapes principales: la purification du produit de PCR initial, amplification de l'ADN en présence de nucléotides marqués et une repurification du produit de réaction de séquençage pour éliminer les réactifs en excès qui peuvent causer des problèmes lors de la migration au niveau de séquenceur.

i- *Purification du produit PCR :*

➤ Principe :

La purification du produit PCR consiste à l'élimination des traces des constituants de la réaction de PCR, les amorces, les résidus, les dNTP..., et ne garder que l'ADN à séquençer pour ne pas influencer les réactions.

➤ Protocole

Les produits PCR sont purifiés grâce à l'ExoSap qui se constitue de deux enzymes hydrolytiques ; l'exonucléase I qui est responsable de la dégradation des amorces, et la phosphatase alcaline responsable de la phosphorylation des dNTP qui n'étaient pas incorporés dans la réaction.

Dans un tube Eppendorf de 0.2 ml, on met de la solution ExoSap et le produit PCR. Le mélange réactionnel est simplifié dans le tableau suivant :

Tableau II: Mélange réactionnel utilisé pour la purification du produit PCR

Réactif	Volume en μl
Produits PCR	4
ExoSap	1

On met le mélange réactionnel dans le ThermoCycleur et on lance le programme spécifique de l'ExoSap. Le programme usuel utilisé est présenté dans la figure suivante :

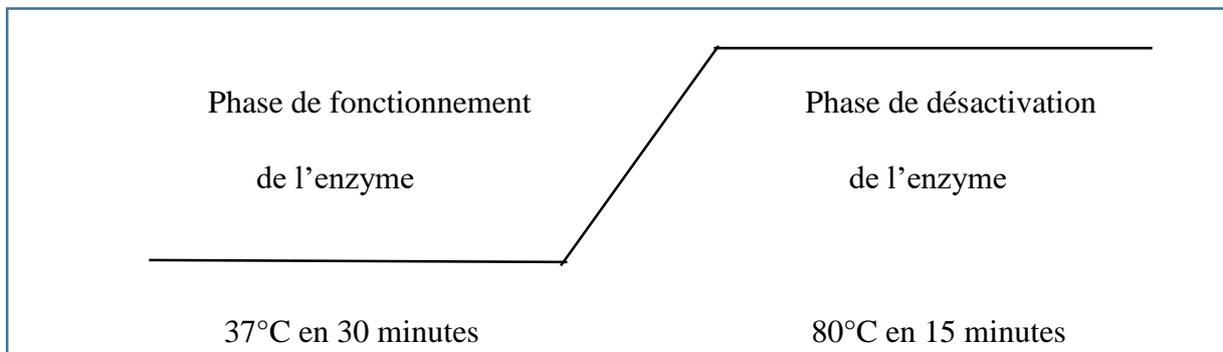


Figure 16: Programme des cycles de la purification par ExoSap

ii- Réaction de séquence :

➤ Principe

C'est une technique similaire de PCR, se base principalement sur une copie d'un fragment d'ADN qui va se séquencer à l'aide d'une Taq polymérase.

Excepté que dans cette réaction, en plus des 4 dNTP, une petite quantité de 4 ddNTP (didésoxyribonucléotides) est ajouté dont le groupement OH du carbone 3' du désoxyribose est remplacé par un atome d'hydrogène pour bloquer chaque réaction d'extension dès qu'ils sont incorporés.

➤ Protocole

Les produits PCR purifiés sont amplifiés linéairement au cours de la réaction de séquence.

Alors, dans des tubes Eppendorf, on ajoute le Mix préparé avec un volume final de 10ul, présenté dans le tableau suivant :

Tableau III: Mélange réactionnel de la réaction de séquence

Réactif	Volume en μ l
Tampon	2
Eau pure	1
Amorce (F ou R)	1
BigDye	2
Produits PCR purifiés	4

Le BigDye : c'est le Kit de la réaction de séquence qui se constitue de : Taq polymérase, dNTP, ddNTP marqués, tampon et $MgCl_2$

Il faut noter que dans la réaction de séquence, on utilise généralement qu'une seule amorce qui est le Forward, comme on peut utiliser l'amorce Reverse, sauf si on n'a pas obtenu le résultat, ou pour une confirmation de diagnostic.

Et après, on met les tubes dans le ThermoCycleur et on lance le programme illustré dans le Tableau suivant :

Tableau IV: Programme de la réaction de séquence

Stade	Température	Temps	Cycles
1	96°C	10 s	25
	50°C	5 s	
2	60°C	3 min	1
	10°C	∞	

iii- Purification du produit de la réaction de séquence

➤ Principe

Cette étape consiste à purifier les produits de séquence en éliminant l'excès des réactifs de la réaction de séquence pour que le séquençage ne sera pas gêner.

➤ Protocole

Le produit responsable de cette purification, c'est le kit BigDye® XTerminator™ qui contient :

- SAM™Solution (tampon)
- BigDye®XTerminator™Solution (résines)

Le tableau suivant représente les différents réactifs utilisés pour la purification ;

Tableau V: Mélange réactionnel de la purification du produit de réaction de séquence

Réactif	Volume en µl
X-terminator	10
Sam (Tampon)	45
Produit de réaction de séquence	10

Dans les puits de la plaque, 45 µl de produit SAM™ Solution et 10 µl de produit BigDye® XTerminator™ Solution et 10 µl de produit de réaction de séquençage sont placés, ainsi, pré-vortexés pour mettre la résine en suspension. La plaque a ensuite été placée sous agitation douce pendant 30 minutes, puis centrifugée à 13 000 g pendant 3 minutes, et le surnageant contenant les fragments à séquencer a été transféré dans les puits de la plaque de séquençage.

Les produits de séquence peuvent être conservés à -20°C avant et après purification.

On a mis la plaque sur le séquenceur 3500Dx Genetic analyzer (Applied Biosystems, Life Technologies). Il s'agit d'un dispositif d'électrophorèse capillaire automatisé qui guide le flux électrique d'ions à travers le capillaire pour déplacer les fragments d'ADN. En arrivant au site de détection, les quatre fluorochromes du ddNTP terminal sont excités. Après cette excitation, chaque fluorochrome émet une lumière de longueurs d'onde différentes qu'il sera détecté par un logiciel d'analyse de séquence et converti en une séquence.

Résultats

VI. Résultats

1 Caractéristiques cliniques et histo-pathologiques de la population étudiée

1.1 Répartition des patients selon l'âge

Depuis Janvier 2018 jusqu'au Décembre 2020, 101 patients atteints de cancer colorectal ont été recrutés au niveau des services de chirurgie viscérale et de Gastroentérologie du CHU Hassan II de Fès. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 43,78 ans. L'âge moyen chez les femmes atteint le CCR était de 42 ans et 43 ans chez les Hommes. D'après la figure 17, les personnes âgées entre 40 et 50 ans constituaient la tranche d'âge la plus dominante avec un pourcentage de 23% suivi de celle de 30-40ans avec 21%. Cependant, les patients âgés de moins de 20 ans constituaient la tranche d'âge la moins touchée par le CCR (2%).

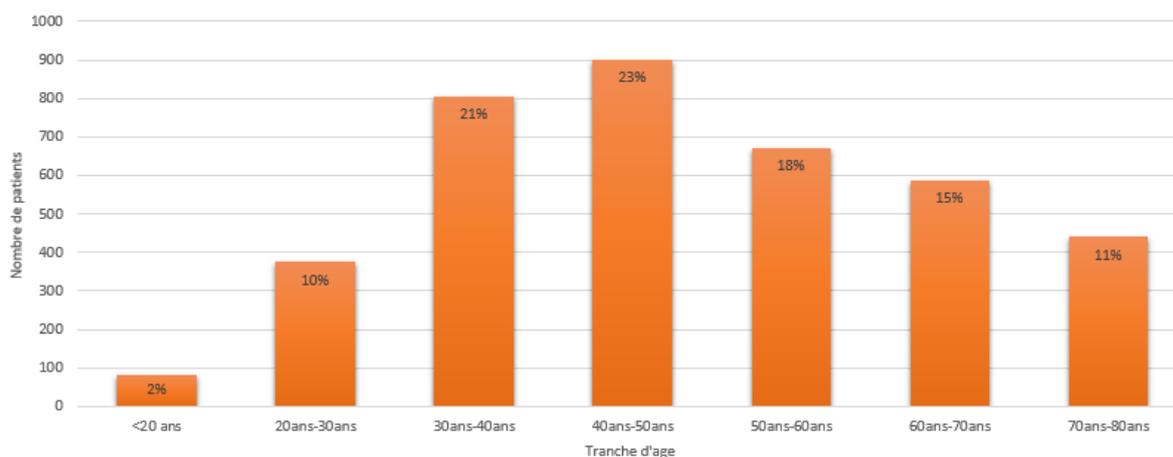


Figure 17: Pourcentage de différentes tranches d'âge des patients atteints du CCR

1.2 Répartition des patients selon le sexe

Les données émanant de notre population montrent une prédominance masculine avec un pourcentage de 51% versus 49 % des femmes avec un sex-ratio de 1,02 (Figure18). Ces résultats montrent que les Hommes sont les plus touchés par le cancer colorectal, ce qui concorde avec plusieurs données épidémiologiques rapportées dans la littérature (Sun et al., 2020) (White et al., 2018).

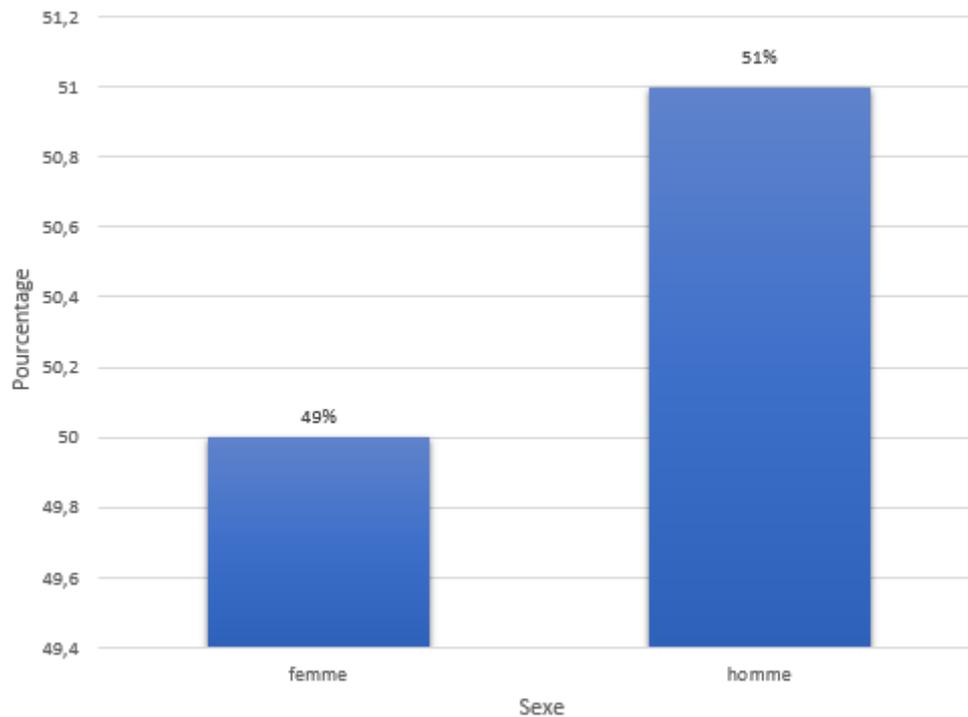


Figure 18: Répartition selon le Sexe

1.3 Répartition des patients selon la présence des polypes

La manifestation du CCR diffère d'un patient à un autre, selon le métabolisme de chacun, parfois il commence par la présence des polypes au niveau du colon ou du rectum. Néanmoins, dans certains cas, le CCR se déclare directement sans avertissement.

Le graphique ci-dessous représente la répartition des cas CCR en fonction de la présence des polypes (Figure 19). Les résultats montrent que seulement 19% de la population avaient des polypes au moment du diagnostic, parmi lesquels 81% avaient un nombre de polypes inférieurs à 30 et 20% détenaient un nombre de polypes supérieur à 30.

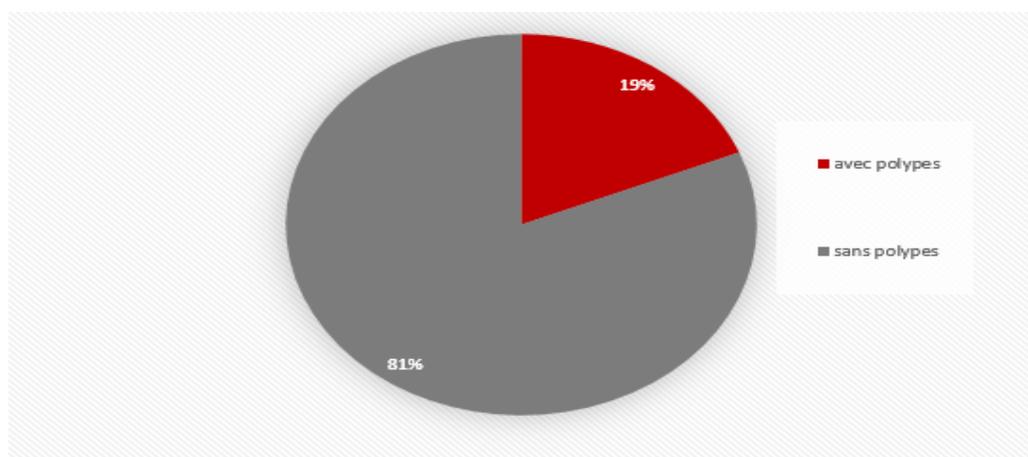


Figure 19: Répartition des cas selon la présence de polypes.

1.4 Répartition des cas selon la localisation et le degré de la différenciation de la tumeur

D'après le graphe ci-dessous, la localisation colique de la tumeur était la plus dominante avec un pourcentage de 69% versus 31% pour la localisation rectale (Figure20).

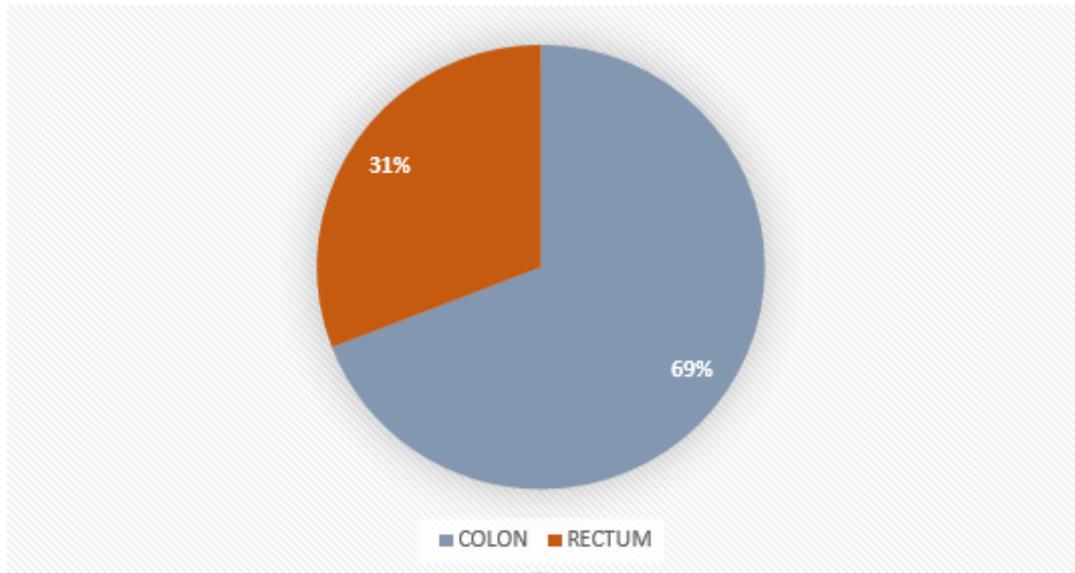


Figure 20: Répartition des cas selon la localisation tumorale.

Les résultats anatomopathologiques des différents échantillons tumorales montrent que toutes les tumeurs étaient des adénocarcinomes qui différaient au niveau du degré de différenciation. On trouve alors que 61% des adénocarcinomes sont bien différenciés, 28% sont moyennement différenciés et 11% seulement sont peu différenciés (Figure21).

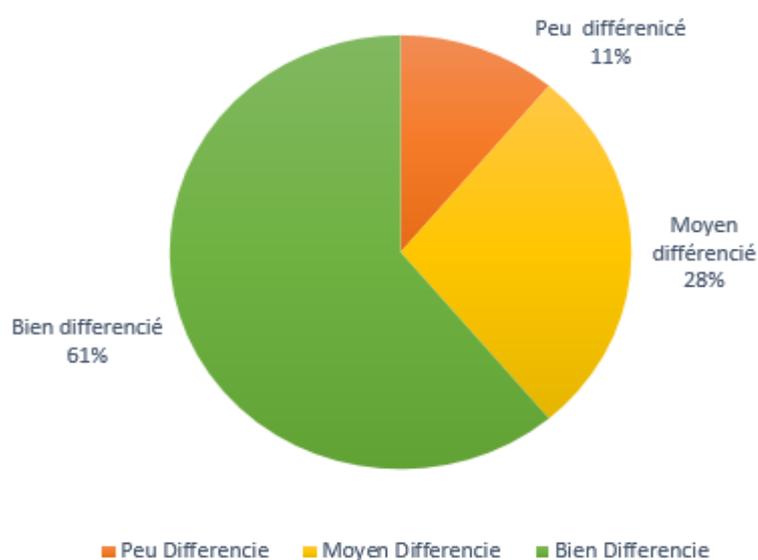


Figure 21: Répartition des cas selon le degré de différenciation des tumeurs.

2 Caractérisation moléculaire du gène *MUTYH*

Le gène *MUTYH* est un gène de réparation de l'ADN appartenant au système de réparation BER (Base Excision Repair), impliqué dans le processus de réparation des lésions oxydatives de l'ADN. Les mutations germinales bialléliques du gène *MUTYH* prédisposent au syndrome de polypose atténuée liée au gène *MUTYH* (PAM).

Dans le but d'étudier l'implication du gène *MUTYH* dans la survenue du CCR chez la population Marocaine, nous avons recherché par séquençage de Sanger les mutations récurrentes Y165C et G382D. La méthode de Sanger constitue un moyen fiable et sensible permettant de déterminer avec certitude la succession exacte des nucléotides de la région du gène ciblé. La mutation Y165C se situe au niveau de l'exon 7 du gène *MUTYH*, tandis que la substitution G382D se trouve au niveau de l'exon 13 du même gène (Figure 22).

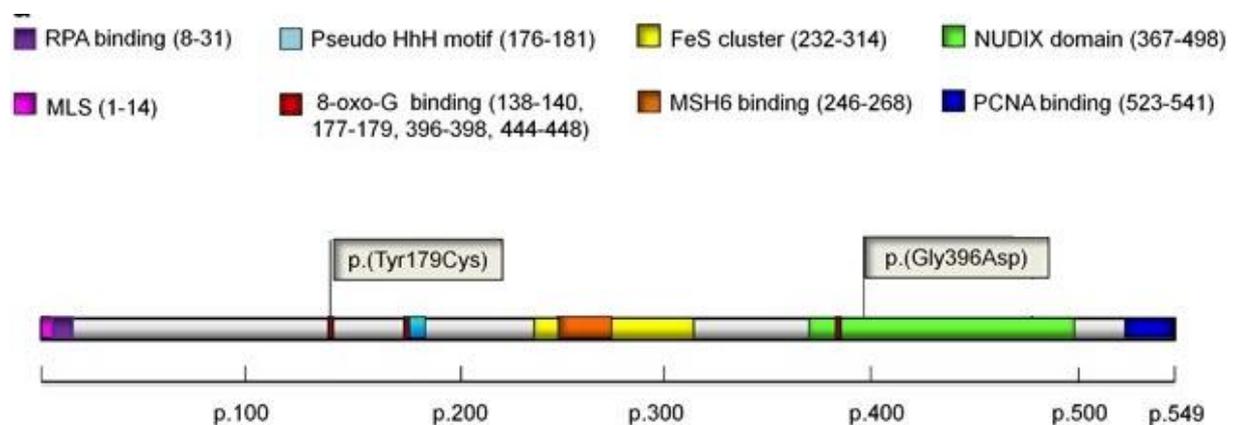


Figure 22: Localisation des variants identifiés sur la protéine *MUTYH* (Ruggieri et al., 2013)

Les résultats du séquençage de la population étudiée montrent la présence des deux mutations récurrentes chez trois patients (3/101), dont deux cas manifestaient les substitutions Y165C et G382D à l'état homozygote et l'autre cas exprimait les deux mutations à l'état hétérozygote composite.

L'identification des mutations causales chez les patients atteints de CCR, nous a permis de réaliser le diagnostic presymptomatique chez les membres de la famille. Pour atteindre cet objectif, nous avons eu recours au séquençage de Sanger pour valider dans un premier temps la mutation trouvée chez le cas index, et dans un second temps, rechercher le variant chez les membres de la famille ayant donné leurs consentements pour bénéficier du test.

Le tableau 1 résume les données cliniques relatives aux patients porteurs des mutations bi-alléliques du gène *MUTYH*.

Tableau VI: Les données cliniques des patients porteurs de mutations germinales

Patients	Age de diagnostic	Sexe	Nombre de polypes	CCR	Histoire familiale	Histologie	Emplacement de polypes	Mutation <i>MUTYH</i>
P50	38	M	100-30	Oui	Oui	Polype en dysplasie de bas grade	Rectum+Colon	p.Y165C (homozygote)
P51	34	F	>100	Oui	Oui	Adénome tubuleux vilieux	Rectum+Colon	Y165C+G382D
P52	40	F	<30	Oui	Oui	Adénome tubuleux en dysplasie de haut grade	Colon	G382D (homozygote)

La substitution Y165C a été identifiée à l'état homozygote chez un Homme dont l'âge au moment de diagnostic des polypes était de 38 ans, trois ans plus tard il a été diagnostiqué d'un CCR. Les polypes étaient en dysplasie de bas grade avec un nombre compris entre 30 et 100, ainsi qu'une localisation à la fois rectale et colique. L'enquête familiale faite par le personnel de CHU Hassan II révèle la présence de deux frères qui sont diagnostiqués de polypes et de trois cousins atteints de cancer colorectal. La recherche de la mutation causale chez les apparentés du cas index a montré la présence de la mutation Y165C chez tous les cas malades (Figure23).

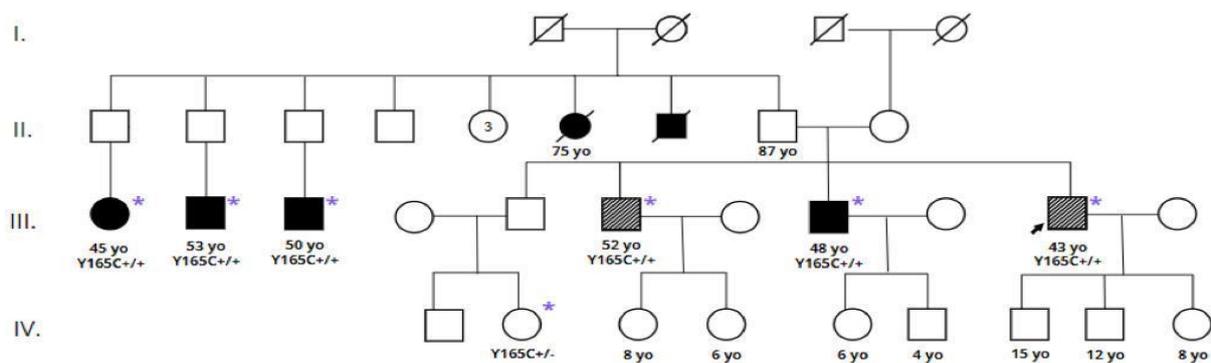


Figure 23: Arbre généalogique du patient P50 (cette arbre a été réalisé en collaboration avec le service de gastro-entérologie et le service de chirurgie viscérale)

Nous avons également identifié les deux substitutions Y165C et G382D à l'état hétérozygote composite chez la patiente P51 qui au moment du diagnostic des polypes était âgée de 34 ans

(figure 24 et 25). Les polypes étaient assez nombreux (>100) et s'étalaient sur tout le colon et le rectum.

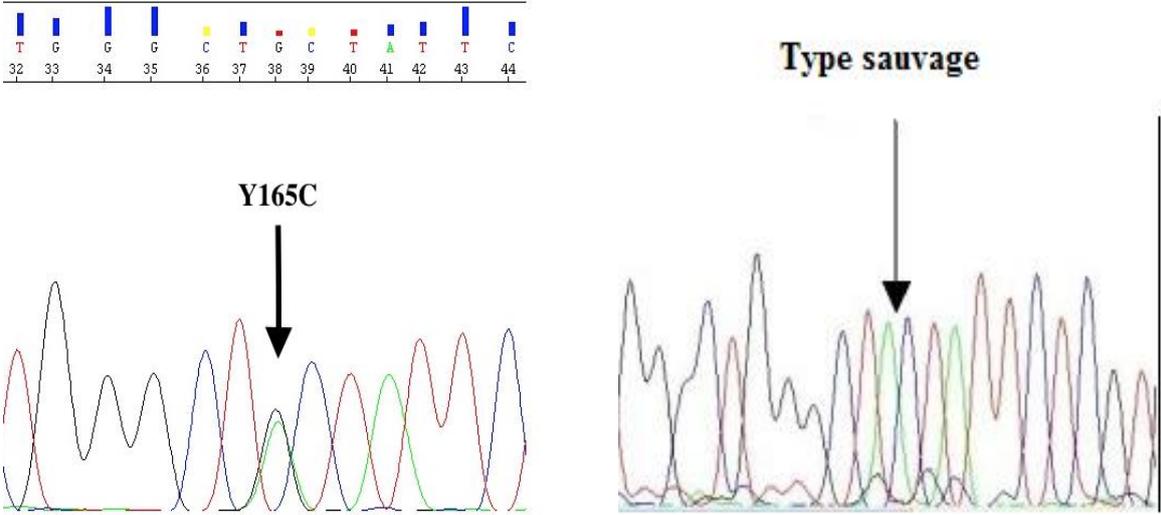


Figure 24: Profil électrophoregrammes montrant la mutation Y165C et l'état sauvage

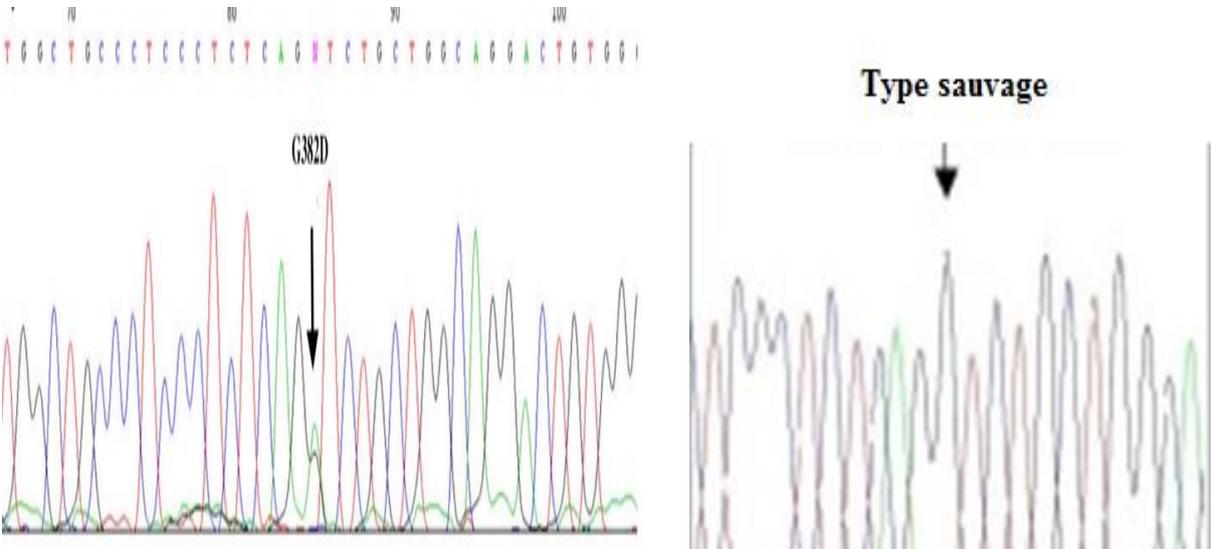


Figure 25: Profil électrophoregrammes montrant la mutation G382D et l'état sauvage

L'étude histo-pathologique des polypes montre qu'il s'agit des adénomes tubuleux-villeux en dysplasie de bas grade. Le cancer colorectal a été mis en évidence deux ans plus tard durant le suivi habituel de la patiente. L'histoire familiale de la maladie révèle un oncle âgé de 48 ans suivi pour CCR associé à une polypose, et une tante maternelle diagnostiquée d'une polypose (Figure 26). L'analyse presymptomatique a été réalisée sur les individus ayant donné leurs consentements pour participer à l'étude. Les résultats montrent la présence à l'état hétérozygote composite des deux substitutions étudiées chez les cas malades. La mère âgée de 60 ans étant asymptomatique a manifesté la mutation Y165C à l'état mono-allélique.

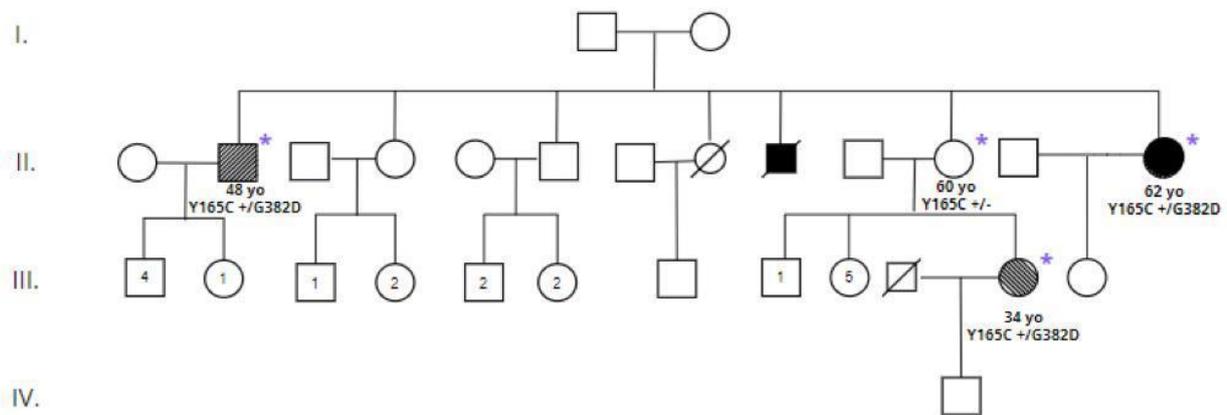


Figure 26 : Arbre généalogique du patient P51 (cette arbre a été réalisé en collaboration avec le service de gastro-entérologie et le service de chirurgie viscérale)

La patiente P52 âgée de 40 ans a été diagnostiquée d'une polypose colique dont le nombre était inférieur à 30. Le diagnostic moléculaire des exons 7 et 13 du gène *MUTYH* révèle la présence de la substitution G382D à l'état homozygote. Le diagnostic presymptomatique de deux sœurs et trois frères asymptomatiques a confirmé la présence de la substitution G382D mais à l'état hétérozygote (Figure 27)

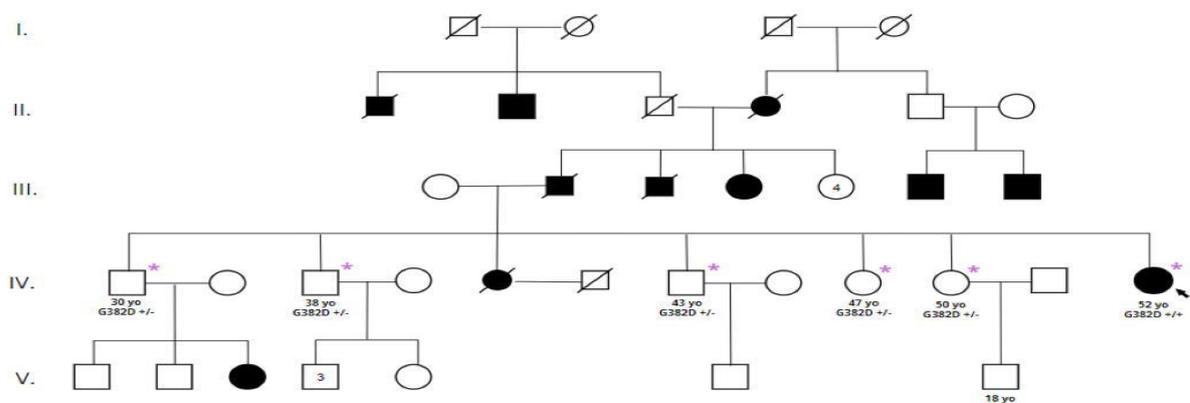


Figure 27: Arbre généalogique de la patiente P52 (cette arbre a été réalisé en collaboration avec le service de gastro-entérologie et le service de chirurgie viscérale)

Discussion

VII. Discussion

La polypose adénomateuse associée au gène *MUTYH* (MAP) est parmi les syndromes héréditaires du cancer colorectal qui se manifeste à cause des mutations homozygotes des variants pathogènes bi-alléliques dans le gène *MUTYH* (Kidambi et al., 2018). Elle se caractérise par son mode autosomique récessive l'opposé du classique PAF (Polyposes adénomateuse familiales), ainsi que l'apparition des polypes atténués avec un nombre entre 30 et 100 polypes. Les patients MAP manifestent souvent des symptômes comme suit : diarrhée ou constipation, douleurs inhabituelles lors de l'évacuation des selles, saignement, perte de poids et asthénie.

Le gène *MUTYH* est localisé au niveau du chromosome 1 1p34.3-p32.1 et s'étend sur 11,2 kb, il se compose de 16 exons (Buecher, 2011). La protéine *MUTYH* joue un rôle primordial dans le processus de réparation d'ADN par excision de base qui rentre souvent dans la prévention de la mutagenèse causée par le 8 oxo-dG. Par conséquent, toute déficience ou absence de la protéine *MUTYH* est une cause principale de l'apparition de la polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* (MAP) (Hegde, 2013).

Plus de 100 mutations germinales du gène *MUTYH* ont été rapportées. La plupart d'entre elles sont des mutations nonsense, bien que de petites délétions, duplications et insertions se produisent également. Deux mutations hot-spot, Y165C et G382D, ont été identifiées chez les populations caucasiennes. Les mutations Y165C ou G382D sont présentes chez 90 % des patients caucasiens atteints de la MAP, une mutation bi-allélique de Y165C et / ou G382D est présente chez 70 %. Cependant, il semble y avoir une différenciation ethnique et régionale dans le spectre des mutations *MUTYH* (Nielsen et al., 2011).

Au Maroc, très peu d'études ont tenté d'étudier les facteurs génétiques responsables du syndrome PAM. En effet, une seule étude Marocaine réalisée par Laarabi et al avait recherché trois mutations récurrentes du gène *MUTYH* chez une population constituée de 52 patients CCR et 10 cas avec une polypose (Laarabi et al., 2012) .

L'objectif de ce travail étant d'évaluer la prévalence des mutations Y165C et G382D dans une large population constituée de 101 patients CCR, le but est de d'estimer l'association entre la présence de ces variants à l'état bi-allélique et le risque de cancer colorectal. Afin de répondre aux objectifs tracés, nous avons amplifié par PCR les exons 7 et 13 du gène *MUTYH*. Ensuite, nous avons réalisé le séquençage bidirectionnel par la méthode de Sanger.

La population étudiée est constituée de 101 patients ayant été diagnostiqués avec un cancer colorectal, l'âge moyen est de 43 ans, on note une légère prédominance du sexe masculin 51% versus 49% pour les femmes. Les résultats de la caractérisation moléculaire du gène *MUTYH* montrent la présence des deux mutations récurrentes Y165C et G382D chez trois patients parmi 101 cas étudiés soit une prévalence de 3%. Les cas porteurs de mutations germinales bi-alléliques étaient jeunes (< 50 ans), le nombre de polypes varie entre 30 et plus de 100 pour le cas P51. Ces résultats concordent parfaitement avec ceux rapportés dans la littérature. Au Canada, Croitoru et al ont réalisé une étude visant à examiner l'association entre les mutations hétérozygotes (mono-allélique) et homozygotes (bi-allélique) du gène *MUTYH* et le risque du cancer colorectal. L'étude canadienne a inclut 1238 cas CCR dont l'âge varie entre 20-74 ans. L'analyse moléculaire du gène *MUTYH* a mis en évidence 12 patients porteurs de mutations germinales bi-allélique (12/1238) soit une prévalence estimée de 0.97%. L'âge de diagnostic du CCR chez les cas porteurs de mutations était entre 35 et 67 ans (Croitoru et al., 2004).

En Espagne, Balaguer et al ont mené une investigation multicentrique dont l'objectif est d'établir le risque de CCR associé aux variants Y165C et G382D du gène *MUTYH*. La population étudiée était constituée de 1116 cas CCR nouvellement diagnostiqués ayant un âge moyen de 40,2 ans avec une prédominance masculine de 59% (n=658) versus 41% des femmes (n=458). Le dépistage moléculaire des deux mutations récurrentes par la technologie TaqMan a identifié 8 cas CCR porteurs de mutations bi-alléliques du gène *MUTYH* soit une prévalence de 0,7%. En comparaison avec les cas non mutés, les patients avec mutation *MUTYH* positive étaient jeunes avec une localisation tumorale le plus souvent proximale et manifestaient des adénomes colorectaux synchrones (Balaguer et al., 2007).

Aux États-Unis, la prévalence rapportée par les études varie entre 0.5 et 1.7%. En effet, Wang et al. ont réalisé le screening des deux variants hotspot chez 444 patients CCR dont 328 cas avaient un CCR à un âge au-delà de 51 ans, tandis que 116 sujets développaient le CCR avant 50 ans. Au total, deux cas seulement (0.5%) manifestaient une mutation bi-allélique sur le gène *MUTYH* à un âge de 39 et 46 ans (Wang et al., 2021). La deuxième étude réalisée par Riegert- Johnson et al. sur une série de malades CCR diagnostiqués avant l'âge de 50 ans, l'âge moyen était 40 ans (varie 17-49) avec une prédominance cette fois-ci féminine (53%). Les variants à l'état homozygote ou hétérozygote composite étaient identifiés chez 4 patients (1.7%) avec un âge moyen de 41 ans et un nombre de polypes inférieur à 10 (Riegert-Johnson et al., 2007).

Au Brésil, Piroshky et al. ont rapportés la fréquence la plus élevée des mutations récurrentes Y165C et G382D. La population étudiée était constituée de 75 cas CCR dont l'âge moyen de diagnostic était de 50.4 ans. Deux mutations bi-alléliques ont été identifiées chez deux cas ayant une polyposé (2.7%) (Pitroski et al, 2011).

Les personnes présentant un risque de PAM ou un diagnostic génétique de PAM doivent être examinées par coloscopie tous les 1 à 2 ans. Une fois les polypes adénomateux sont détectés, une coloscopie de suivi annuel est recommandée jusqu'à décision de procéder à une colectomie.

La colectomie doit être envisagée lorsque plus de 20 adénomes sont détectés, avec une taille >1cm et une histologie avancée. D'autre part, la recto-colectomie avec anastomose iléo-anale est recommandée en présence d'un nombre élevé de polypes dans le rectum. Par la suite, le patient doit suivre une surveillance endoscopique basse, du rectum ou du réservoir iléal (Bonnet, 2014).

Vu le caractère héréditaire des cancers colorectaux, l'identification de la mutation génétique, permettrait également aux membres de la famille de bénéficier d'un diagnostic génétique précoce et ciblé, même en absence de signes phénotypiques évidents de l'atteinte. Ainsi, en cas de détection de la mutation, les sujets porteurs pourront, alors, bénéficier d'un suivi préventif, qui permettrait d'anticiper et éradiquer tout aspect phénotypique anormal d'une façon prudente et sans risque. Ce qui va, éventuellement, se répercuter positivement sur la qualité de leur vie.

Conclusion et perspectives

VIII. Conclusion et perspectives

Alors qu'initialement la cancérogenèse colorectale semblait être liée à une seule voie de signalisation cellulaire, codée par quelques gènes avec un schéma simple de l'adénome tubuleux à l'adénocarcinome, l'étude de formes familiales et les progrès de la biologie moléculaire ont permis d'ouvrir une boîte de Pandore... Il existe maintenant plusieurs voies de la cancérogenèse avec différents types histologiques de polypes conduisant au cancer. Le nombre de gènes impliqués a augmenté exponentiellement en même temps que les modes de transmission se complexifiaient.

Les principaux objectifs de ce travail étaient, d'une part, d'étudier l'implication des mutations Y165C et G382D dans la prédisposition au CCR chez la population Marocaine. D'autre part, de décrire le profil mutationnel des patients MAP. Afin de répondre à ces objectifs, on a réalisé une analyse par PCR des deux exons 7 et 13 suivis d'un séquençage par la méthode de Sanger. Ainsi, on a pu mettre en évidence 3 patients porteurs de mutations germinales bi-alléliques du gène MUTYH soit une prévalence de 3%.

Les travaux réalisés dans le cadre de ce projet, nous ont permis dans un premier temps, de décrire pour la première fois le profil mutationnel des patients MAP Marocains. Dans un second temps, nous avons confirmé le diagnostic moléculaire à travers l'identification de la mutation causale, chose qui nous a permis d'offrir un diagnostic pré-symptomatique aux membres des familles.

Ce travail contribue essentiellement dans la description du paysage mutationnel des gènes incriminés dans la susceptibilité au CCR au Maroc. Elle contribue également dans la compréhension de la physiopathologie des phénotypes étudiés, à travers l'identification des facteurs génétiques pouvant expliquer l'initiation de la cancérogenèse.

Il faut noter également que l'identification de l'étiologie génétique, aurait également des retombées socio-économiques importantes, allant du diagnostic, à la prévention, passant par le traitement, en offrant une prise en charge adaptée aux membres de la famille, à travers la surveillance continue.

Références bibliographiques

IX. Références bibliographiques

- Al-Tassan, N., Chmiel, N. H., Maynard, J., Fleming, N., Livingston, A. L., Williams, G. T., Hodges, A. K., Davies, D. R., David, S. S., Sampson, J. R., & Cheadle, J. P. (2002). Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics*, 30(2), 227-232. <https://doi.org/10.1038/ng828>
- Anne-Christel Rolling & Olivier Cauquil. (2011). *La polypose adénomateuse familiale—Ref: GUIPOL11*. <https://www.e-cancer.fr/>. <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/La-polypose-adenomateuse-familiale>
- Balaguer, F., Castellví-Bel, S., Castells, A., Andreu, M., Muñoz, J., Gisbert, J. P., Llor, X., Jover, R., de Cid, R., Gonzalo, V., Bessa, X., Xicola, R. M., Pons, E., Alenda, C., Payá, A., & Piqué, J. M. (2007). Identification of MYH Mutation Carriers in Colorectal Cancer : A Multicenter, Case-Control, Population-Based Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(3), 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.12.025>
- Balchen, V., & Simon, K. (2016). Colorectal cancer development and advances in screening. *Clinical Interventions in Aging, Volume 11*, 967-976. <https://doi.org/10.2147/CIA.S109285>
- Beaugerie, L., & Sokol, H. (2014). *Les fondamentaux de la pathologie digestive : Enseignement intégré, appareil digestif*. Elsevier-Masson.
- Belhamidi, M. S., Sinaa, M., Kaoukabi, A., Krimou, H., Menfaa, M., Sakit, F., & Choho, A. (2018). Epidemiological and pathological profile of colorectal cancer : About 36 cases. *Pan African Medical Journal*, 30. <https://doi.org/10.11604/pamj.2018.30.159.15061>
- Boland, C. R., & Goel, A. (2010). Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*, 138(6), 2073-2087.e3. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.12.064>

- Bonnet, D. (2014). Polypose adénomateuse familiale et oncogénétique. *Archives de Pédiatrie*, 21(5), 92-93. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(14\)71477-0](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(14)71477-0)
- Bouguenouch, L., Samri, I., Belhassan, K., Sayel, H., Abbassi, M., Bennis, S., Benajah, D. A., Ibrahimi, A., Amarti, A., & Ouldim, K. (2016). Syndrome de Lynch : À propos d'un cas et revue de la littérature. *The Pan African Medical Journal*, 24, 142. <https://doi.org/10.11604/pamj.2016.24.142.4398>
- Buecher, B. (2011). La polypose associée aux mutations bi-alléliques du gene MUTYH*. *e a*, 18, 7.
- Bullinger, E., & Schliemann, M. (2013). Computational Systems Biology of Cancer by Emmanuel Barillot, Laurence Calzone, Philippe Hupé, Jean-Philippe Vert and Andrei Zinovyev. *BioMedical Engineering OnLine*, 12(1), 76. <https://doi.org/10.1186/1475-925X-12-76>
- Bustos-Fernandez, L. (2013). *Colon : Structure and Function*. Springer Science & Business Media.
- Carr, S., & Kasi, A. (2022). Familial Adenomatous Polyposis. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538233/>
- Casper, M., Plotz, G., Juengling, B., Trojan, J., Lammert, F., & Raedle, J. (2009). Adenoma Development in a Patient with MUTYH-Associated Polyposis (MAP) : New Insights into the Natural Course of Polyp Development. *Digestive Diseases and Sciences*, 55(6), 1711-1715. <https://doi.org/10.1007/s10620-009-0916-z>
- Coffin, B., Lémann, M., & Jian, R. (1994). Sensibilité viscérale digestive. *médecine/sciences*, 10(11), 1107. <https://doi.org/10.4267/10608/2534>
- Collura, A., Lefevre, J. H., Svrcek, M., Tougeron, D., Zaanani, A., & Duval, A. (2019). Instabilité des microsatellites et cancer—De l'instabilité du génome à la médecine personnalisée. *médecine/sciences*, 35(6-7), 535-543. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019093>

- Croitoru, M. E., Cleary, S. P., Di Nicola, N., Manno, M., Selander, T., Aronson, M., Redston, M., Cotterchio, M., Knight, J., Gryfe, R., & Gallinger, S. (2004). Association Between Biallelic and Monoallelic Germline MYH Gene Mutations and Colorectal Cancer Risk. *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, *96*(21), 1631-1634.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djh288>
- Curia, M. C., Catalano, T., & Aceto, G. M. (2020). MUTYH : Not just polyposis. *World Journal of Clinical Oncology*, *11*(7), 428-449. <https://doi.org/10.5306/wjco.v11.i7.428>
- Drake, R. lee, Vogl, W., & Mitchell, A. W. M. (2006). *Gray's Anatomie pour les étudiants*. ELSEIVIER
- Duval, A., & Hamelin, R. (2002). Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers : Toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Research*, *62*(9), 2447-2454.
- Eastwood (auth.), G. L., & M.D. (eds.), L. B.-F. (1983). *Colon : Structure and Function* (1^{re} éd.). Springer US.
<http://gen.lib.rus.ec/book/index.php?md5=7a89219c17095e1b62e221713bba678f>
- Fearon, E. R., & Vogelstein, B. (1990). A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, *61*(5), 759-767. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(90\)90186-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-i)
- Goodenberger, M., & Lindor, N. M. (2011). Lynch syndrome and MYH-associated polyposis : Review and testing strategy. *Journal of Clinical Gastroenterology*, *45*(6), 488-500. <https://doi.org/10.1097/MCG.0b013e318206489c>
- Grady, W. M. (2004). Genomic instability and colon cancer. *Cancer Metastasis Reviews*, *23*(1-2), 11-27. <https://doi.org/10.1023/a:1025861527711>
- Hegde, M. (2013). ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis). *Genetics in Medicine*, *16*(1), 16.

- Heitmann, P. T., Vollebregt, P. F., Knowles, C. H., Lunniss, P. J., Dinning, P. G., & Scott, S. M. (2021). Understanding the physiology of human defaecation and disorders of continence and evacuation. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *18*(11), 751-769. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00487-5>
- Idos, G., & Valle, L. (1993). Lynch Syndrome. In M. P. Adam, G. M. Mirzaa, R. A. Pagon, S. E. Wallace, L. J. Bean, K. W. Gripp, & A. Amemiya (Éds.), *GeneReviews®*. University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>
- J H Lefèvre. (2013). *Génétique et expression phénotypique des polyposes liées à APC et MUTYH*. 7.
- Jass J R. (2007). Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology*, *50*, 113–130, 18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.2006.02549.x>
- Karoui, M., Tresallet, C., Brouquet, A., Radvanyi, H., & Penna, C. (2007). Carcinogénèse colorectale. *Journal de Chirurgie*, *144*(2), 97-104. [https://doi.org/10.1016/S0021-7697\(07\)89480-4](https://doi.org/10.1016/S0021-7697(07)89480-4)
- Karunaharamoorthy, A., & Dimitrios, M. (s. d.). *Colon*. Kenhub. Consulté 21 juillet 2022, à l'adresse <https://www.kenhub.com/en/library/anatomy/the-colon>
- Kidambi, T. D., Goldberg, D., Nussbaum, R., Blanco, A., Umetsu, S. E., Terdiman, J. P., & Lee, J. K. (2018). Novel variant of unknown significance in MUTYH in a patient with MUTYH-associated polyposis : A case to reclassify. *Clinical Journal of Gastroenterology*, *11*(6), 457-460. <https://doi.org/10.1007/s12328-018-0870-4>
- Kuipers, E. J., Grady, W. M., Lieberman, D., Seufferlein, T., Sung, J. J., Boelens, P. G., van de Velde, C. J. H., & Watanabe, T. (2015). Colorectal cancer. *Nature Reviews Disease Primers*, *1*(1), 15065. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.65>
- Laarabi, F. Z., Cherkaoui Jaouad, I., Baert-Desurmont, S., Ouldim, K., Ibrahim, A., Kanouni, N., Frebourg, T., & Sefiani, A. (2012). The first mutations in the MYH gene reported

- in Moroccan colon cancer patients. *Gene*, 496(1), 55-58.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.12.024>
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J.-C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : Une révolution en marche. Première partie. *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée*, 23(5), 260-279.
<https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016>
- Laudenbach, V., Mantz, J., & Desmonts, J. M. (1999). Comprendre la biologie moléculaire. *Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation*, 18(7), 725-747.
[https://doi.org/10.1016/S0750-7658\(00\)88453-1](https://doi.org/10.1016/S0750-7658(00)88453-1)
- Laurent-Puig, P., Agostini, J., & Maley, K. (2010). Oncogénèse colorectale. *Bulletin du Cancer*, 97(11), 1311-1321. <https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1216>
- Lázaro-Silva, D. N., De Mattos, J. C. P., Castro, H. C., Alves, G. G., & Amorim, L. M. F. (2015). The Use of DNA Extraction for Molecular Biology and Biotechnology Training : A Practical and Alternative Approach. *Creative Education*, 06(08), 762-772. <https://doi.org/10.4236/ce.2015.68079>
- Lee, T.-H., & Kang, T.-H. (2019). DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(23), 6092.
<https://doi.org/10.3390/ijms20236092>
- Mahadevan, V. (2017). Anatomy of the caecum, appendix and colon. *Surgery (Oxford)*, 35(3), 115-120. <https://doi.org/10.1016/j.mpsur.2017.01.014>
- Menahem, B., Alves, A., Regimbeau, J. M., & Sabbagh, C. (2020). Colorectal family polyadenomatous diseases. What management in 2020? *Journal de Chirurgie Viscérale*, 157(2), 132-142. <https://doi.org/10.1016/j.jchirv.2019.07.010>
- NanoVue. (s. d.). *NanoVue Plus Spectrophotometer—GE Healthcare Life Sciences—PDF Catalogs / Technical Documentation*. Consulté 21 juillet 2022, à l'adresse

<https://pdf.medicalexpo.com/pdf/ge-healthcare-life-sciences/nanovue-plus-spectrophotometer/80554-97449.html>

Nielsen, M., Morreau, H., Vasen, H. F. A., & Hes, F. J. (2011). MUTYH-associated polyposis (MAP). *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 79(1), 1-16.

<https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2010.05.011>

Olsen, A.-K., Bjørtuft, H., Wiger, R., Holme, J., Seeberg, E., Bjørås, M., & Brunborg, G. (2001). Highly efficient base excision repair (BER) in human and rat male germ cells. *Nucleic Acids Research*, 29(8), 1781-1790.

Peltomäki, P. (2003). Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(6), 1174-1179. <https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.060>

Pitroski, C. E., Cossio, S. L., Koehler-Santos, P., Graudenz, M., Prolla, J. C., & Ashton-Prolla, P. (2011). Frequency of the common germline MUTYH mutations p.G396D and p.Y179C in patients diagnosed with colorectal cancer in Southern Brazil. *International Journal of Colorectal Disease*, 26(7), 841-846.

<https://doi.org/10.1007/s00384-011-1172-1>

PubChem. (s. d.). *MUTYH - mutY DNA glycosylase (human)*. Consulté 21 juillet 2022, à l'adresse <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/gene/MUTYH/human>

Rajagopalan, H., Nowak, M. A., Vogelstein, B., & Lengauer, C. (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 3(9), 695-701. <https://doi.org/10.1038/nrc1165>

Recio-Boiles, A., & Cagir, B. (2022). Colon Cancer. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470380/>

Ried, T., Knutzen, R., Steinbeck, R., Blegen, H., Schröck, E., Heselmeyer, K., du Manoir, S., & Auer, G. (1996). Comparative genomic hybridization reveals a specific pattern of chromosomal gains and losses during the genesis of colorectal tumors. *Genes*,

- Chromosomes & Cancer*, 15(4), 234-245. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2264\(199604\)15:4<234::AID-GCC5>3.0.CO;2-2](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2264(199604)15:4<234::AID-GCC5>3.0.CO;2-2)
- Riegert-Johnson, D. L., Johnson, R. A., Rabe, K. G., Wang, L., Thomas, B., Baudhuin, L. M., Thibodeau, S. N., & Boardman, L. A. (2007). The Value of *MUTYH* Testing in Patients with Early Onset Microsatellite Stable Colorectal Cancer Referred for Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Syndrome Testing. *Genetic Testing*, 11(4), 361-366. <https://doi.org/10.1089/gte.2007.0014>
- Ruggieri, V., Pin, E., Russo, M. T., Barone, F., Degan, P., Sanchez, M., Quايا, M., Minoprio, A., Turco, E., Mazzei, F., Viel, A., & Bignami, M. (2013). Loss of *MUTYH* function in human cells leads to accumulation of oxidative damage and genetic instability. *Oncogene*, 32(38), 4500-4508. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.479>
- Sampson, J. R., & Jones, N. (2009). *MUTYH*-associated polyposis. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 23(2), 209-218. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2009.03.006>
- Sampson, J. R., Jones, S., Dolwani, S., & Cheadle, J. P. (2005). *MutYH* (*MYH*) and colorectal cancer. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 4), 679-683. <https://doi.org/10.1042/BST0330679>
- Sawicki, T., Ruskowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers*, 13(9), 2025. <https://doi.org/10.3390/cancers13092025>
- SHamida. (2020). HISTOLOGIE DU COLON ET DU CANAL ANALE. In *HISTOLOGIE DU COLON ET DU CANAL ANALE* (p. 4). http://univ.ency-education.com/uploads/1/3/1/0/13102001/histo2an-colon_canal_anal2020hamida.pdf
- Shaukat, A., Kahi, C. J., Burke, C. A., Rabeneck, L., Sauer, B. G., & Rex, D. K. (2021). ACG Clinical Guidelines : Colorectal Cancer Screening 2021. *Official Journal of the*

American College of Gastroenterology / ACG, 116(3), 458-479.

<https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001122>

Sun, M., Wang, Y., Sundquist, J., Sundquist, K., & Ji, J. (2020). Temporal Trends of Sex Disparity in Incidence and Survival of Colorectal Cancer : Variations by Anatomical Site and Age at Diagnosis. *Clinical Epidemiology, Volume 12, 73-81.*

<https://doi.org/10.2147/CLEP.S240006>

Tumeurs du côlon et du rectum. (s. d.). 23.

Wang, M., Zhu, F., Luo, N., Han, T., & Wang, M. (2021). A case report of a patient with first phenotype of papillary thyroid carcinoma and heterochronous multiprimary tumor harboring germline MUTYH Arg19*/Gly286Glu mutations. *Oral Oncology, 112,* 104987. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104987>

White, A., Ironmonger, L., Steele, R. J. C., Ormiston-Smith, N., Crawford, C., & Seims, A. (2018). A review of sex-related differences in colorectal cancer incidence, screening uptake, routes to diagnosis, cancer stage and survival in the UK. *BMC Cancer, 18(1),* 906. <https://doi.org/10.1186/s12885-018-4786-7>

Win, A. K., Reece, J. C., Buchanan, D. D., Clendenning, M., Young, J. P., Cleary, S. P., Kim, H., Cotterchio, M., Dowty, J. G., MacInnis, R. J., Tucker, K. M., Winship, I. M., Macrae, F. A., Burnett, T., Le Marchand, L., Casey, G., Haile, R. W., Newcomb, P. A., Thibodeau, S. N., ... Jenkins, M. A. (2015). Risk of colorectal cancer for people with a mutation in both a MUTYH and a DNA mismatch repair gene. *Familial cancer, 14(4), 575-583.* <https://doi.org/10.1007/s10689-015-9824-x>

Histologie de tube digestive 2013 https://nanopdf.com/queue/histologie-du-tube-digestif-cours-l3-bichat-2012-2013_pdf?queue_id=-1&x=1658319865&z=NDEuMjQ5LjgyLjE1MA==

Classement du cancer Colorectal- le nombre estimé des nouveaux cas en 2020 selon Globocan

https://gco.iarc.fr/today/online-analysis-map?v=2020&mode=population&mode_population=continents&population=900&population_s=900&key=asr&sex=0&cancer=41&type=0&statistic=5&prevalence=0&population_group=0&ages_group%5B%5D=0&ages_group%5B%5D=17&nb_items=10&group_cancer=1&include_nmssc=0&include_nmssc_other=0&projection=natural-earth&color_palette=default&map_scale=quantile&map_nb_colors=5&continent=0&show_ranking=0&rotate=%255B10%252C0%255D

ANNEXE

X. Annexe

Principe extraction d'ADN

La molécule d'ADN se situe au niveau du noyau des cellules, et pour pouvoir déterminer les mutations recherchées, il faut toujours commencer par extraction d'ADN.

La technique d'extraction se base principalement sur une lyse cellulaire qui vise à faire sortir l'ADN des cellules par le genomic lysis. Ainsi que sur l'utilisation de la protéinase K qui sert à cliver les protéines dans la préparation des acides nucléiques, comme elle permet aussi l'élimination de nucléase et enlever les contaminants, et les débris cellulaires par centrifugation. Finalement, l'ADN se regroupe en formant un précipité blanc visible (tempon d'élution) et se conserver à -20°C dans une solution de conservation (Lázaro-Silva et al., 2015).

Principe PCR

L'ADN extrait est dénaturé par chauffage à 94°C. A cette température, les deux brins d'ADN sont séparés par coupure de liaison hydrogène. Ils vont servir de matrices pour la Taq polymérase. La température est ensuite ramenée à une valeur d'environ 55 à 60°C pour réhybrider les amorces. La température d'hybridation optimale varie en fonction de la nature des amorces choisies et de l'ADN cible. La température de réaction est ensuite été augmentée à 72°C, qui est la température d'élongation optimale pour la Taq polymérase. L'enzyme synthétise les brins complémentaires de chacune des deux matrices en incorporant des désoxyribonucléotides libres présents dans le mélange réactionnel (mix). La polymérisation se déroule à environ 1 kilobase par minute. La température a de nouveau été portée à 94°C, ce qui a entraîné la dénaturation des hybrides brins natif-brin neosynthétisés.

Le cycle est répété généralement 25 à 35 fois et dans chaque cycle, les brins nouvellement synthétisés agissent comme des modèles. Par conséquent, la quantité totale d'ADN correspondant à la séquence amplifiée augmente de façon presque exponentielle.

Electrophorse :

L'électrophorèse sur gel d'agarose est une technique qui permet la séparation des molécules chargées sous l'action d'un champ électrique en fonction de leur taille et de leur charge électrique. A pH neutre, les molécules d'ADN chargé négativement en raison de la présence du phosphate migrent vers l'anode. Le BET s'étant intercalé entre les bases de l'ADN va permettre de visualiser les bandes d'ADN sous UV.

➤ Visualisation des bandes d'ADN

Le bromure d'éthidium est un agent d'intercalation couramment utilisé comme marqueur d'acide nucléique dans les laboratoires de biologie moléculaire. Lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets, il devient fluorescent avec une couleur rouge orangé, 20 fois plus intense lorsqu'il est lié à l'ADN. Après la migration des bandes d'ADN, le gel est éclairé sous ultraviolet à l'aide d'un trans-illuminateur afin d'observer les bandes d'ADN fluorescentes.

Si la PCR est satisfaisante, on procède au séquençage dans le but de détecter les mutations génétiques.

Principe Sequençage

Premièrement, l'ADN cible doit être dénaturé pour obtenir de l'ADN simple brin. L'ADN polymérase réalise alors la synthèse d'ADN complémentaire à partir d'une amorce spécifique ou complémentaire du brin (sens ou anti-sens) identique ou différente de celle utilisée pour la PCR.

De l'extrémité 5'p à l'extrémité 3'OH, cette enzyme ajoute de manière aléatoire et cohérente des désoxyribonucléotides triphosphates complémentaires (dNTP) et des didésoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP). Par exemple, ddATP peut être ajouté à la place de dATP. La réaction ayant lieu dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués avec des fluorophores différents de quatre couleurs pour chaque ddNTP. Si ddNTP est incorporé à la place de dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus poursuivre sa polymérisation. La réaction d'extension cesse.

Statistiquement, des ddNTP complémentaires sont incorporés au moins une fois à la place des dNTP lors de la réaction de chaque base dans l'ADN cible. Ainsi, en fin de réaction, des fragments de différentes tailles sont récupérés.

Ensuite, une analyse de la réaction est effectuée. Diverses méthodes d'analyse sont possibles. L'électrophorèse capillaire réalisée sur des machines de séquençage est la meilleure méthode.

Et pendant la transition, chaque fragment (y compris les ddNTP marqués au fluorophore) est excité par un laser, et le signal résultant est analysé par un logiciel dédié.

Finalement, L'analyse informatique de ces signaux permet d'obtenir des séquences étudiées, par exemple sous forme d'électrophoregrammes.

Résumé

Titre : Polyposes adénomateuses liées au gène *MUTYH*

Auteur : OUJANE Chaymae

Les mots clés : Cancer colorectal, Polypose adénomateuse, Gène *MUTYH*, PCR, Séquençage d'ADN.

La polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* est une maladie héréditaire récessive liée au cancer colorectal, le gène *MUTYH* est le gène responsable, situé sur le chromosome 1 spécifiquement [1p34.3-p32-1].

Le but de notre travail est d'établir un diagnostic moléculaire du gène *MUTYH*, et estimer la prévalence de la polypose adénomateuse liée au gène *MUTYH* (MAP) liée aux deux mutations récurrentes Y165C et G382D chez la population étudiée, au sein du laboratoire génétique du CHU Hassan II de Fès. Ainsi installer le diagnostic moléculaire de cette pathologie afin de différencier entre d'autre pathologie liée au CCR, qui ont été avant diagnostiquer dans le même bain sans prendre en considération le statut moléculaire, aussi que la prise en charge des patients atteints de la polypose et réalisation d'une étude presymptomatique des membres de la famille des cas porteurs de mutations.

Nous avons étudié 101 patients atteints du cancer colorectal, qui sont pris en charge au niveau des services d'Hépto-Gastroentérologie et le service de chirurgie viscérale du CHU Hassan II de Fès. Afin d'établir la prévalence de mutations liées à la protéine du gène *MUTYH*, nous avons amplifié par PCR les deux exons 7 et 13, nous avons par la suite recherché les mutations récurrentes par la méthode de Sanger.

D'après la caractérisation moléculaire du gène *MUTYH*, nous avons mis en évidence 3 mutations chez patients parmi 101, deux variants à l'état homozygote (Y165C ou G382D) et l'autre à l'état hétérozygote composite (Y165C et G382D).