كلية العلوم و التقنيات فاس
ⵜⴰⵖⵉⵡⴰⵏⵜ ⵏ ⵜⵎⴰⵙⵙⴰⵏⵉⵏ ⴷ ⵜⵙⵏⵉⴳⵉⵜⵉⵏ
Faculté des Sciences et Techniques de Fès

جامعة سيدي محمد بن عبد الله
ⵜⴰⵙⴷⴰⵡⵉⵜ ⵙⵉⴷⵉ ⵎⵓⵃⵎⵎⴰⴷ ⴱⵏ ⵄⴱⴷⵓⵍⵍⴰⵀ
Université Sidi Mohamed Ben Abdellah

Centre d'Etudes Doctorales : Sciences et Techniques de l'Ingénieur

N° d'ordre : 11 /2020

THESE DE DOCTORAT

Présentée par

Mme : El Otmani Ihsane

Discipline : Biomédecine

Spécialité : Génétique et biologie moléculaire

Sujet de la thèse : Biomarqueurs pronostiques et prédictifs de réponse au traitement néoadjuvant dans le cancer du rectum.

Formation Doctorale : Recherche biomédicale et translationnelle

Thèse présentée et soutenue le **lundi 17 février devant le jury composé de :**

Nom Prénom	Titre	Etablissement	
Mazaz Khalid	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Président
Mehdi Karkouri	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Casablanca	Rapporteur
Basma El Khannoussi	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Rabat	Rapporteur
Samia Arifi	Pr Agrégé	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Rapporteur
Bachir Benjelloun	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Examinateur
Hinde EL Fatemi	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Examinateur
Touria Bouhafa	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Examinateur
Chbani Laila	PES	Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès	Directeur de thèse

Laboratoire d'accueil : Laboratoire de Recherche Biomédicale et Translationnelle.

Etablissement : Faculté des Sciences et Techniques de Fès

Biomarqueurs pronostiques et prédictifs de réponse au traitement néoadjuvant dans le cancer du rectum.

Dédicaces

Avant tout, je remercie Dieu de m'avoir donné la force et le courage pour continuer ce travail jusqu'au bout, ainsi que la patience pour surmonter toutes les difficultés et les épreuves de la vie.

Chères maman et papa ***Latifa El Otmani & Abdenabi El Otmani****, Je vous dédie ce travail en témoignage de mon profond respect, mon grand amour et toute ma gratitude pour les sacrifices que vous avez consenti. Vos prières, vos conseils et soutien m'ont toujours accompagné, m'ont donné force et m'ont éclairé le chemin, aucun de mes mots ne saurait exprimer l'ampleur de ma reconnaissance. Que Dieu vous garde et vous accorde meilleure santé et longue vie.*

Saloua et Salma*, très chères sœurs je vous dédie mon travail en témoignage de mon amour. Ce travail est le résultat de l'encouragement et le soutien que vous ne cessez de manifester, j'espère que vous y trouverez les fruits et le témoignage de ma grande fierté de vous avoir dans ma vie.*

Mon très cher frère ***Hamid,*** *ma* ***belle sœur Fatima Zahra,*** *et mes neveux* ***Anas et Nada,***
Mon très cher frère ***Said,*** *ma* ***belle sœur Saloua,*** *et mes neveux* ***Alae et Zayd,***
Mon très cher frère ***Adil,***
Je vous remercie de m'avoir encouragé et soutenir avec vos conseils bienveillants pendants ces longs années d'études ou j'ai été loin de vous, merci pour vos soucis pour mon bien être, trouvez ici l'expression de mon amour.

A toute ma famille El Otmani…

A Mes très chers amies d'enfance ***Hanane el kaloubi****,* ***Latifa el Otmani et Jihan el mekadmi****, et mes amies de l'école Moussa Ibn Noceir, Collège Allal El Fassi et du lycée Al Wahda à Taounate.*

Pour les précieux moments passés ensemble, je vous dédie ce travail en vous souhaitant tout le bonheur du monde.

A mes amies ***Sara louati****,* ***Halima amaanan, Meriem asri, Amal boulouz****,* ***Mounia ennami****, et* ***Ilham el Rhazouani****. Je vous dédie mon travail en témoignage de mon sincère sentiment de fraternité que je vous porte et en souvenir des agréables moments passés ensemble.*

A toute l'équipe du laboratoire de génétique médicale, du CHU HASSAN II de Fès : ***Laila Bouguenouch, Hanane Sayel, Said Tghanint, Imane Samri, Laila Quebibo, Oussama kettani, Ahakoud mohammed, Mody Diop, Khadija Belhassan, badr el Makhzen, Meriem Maatallaoui, Hajar Azami Idrissi, Hanae Daha Belghiti, Fatima zahra moufid, Ihsane el bouchikhi et Nada senhaji*** *et aussi aux doctorants du laboratoire. Je vous dédie ce travail en souvenir des moments de joie, de bonne humeur et de convivialité que nous avons partagé ensemble.*

A tous les résidents, techniciens et à madame ***Sanae El Bardei*** *et* ***Naima Bouguerine****, majore du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU HASSAN II de Fès,*

Aux doctorants du laboratoire d'anatomie pathologique, ***Fatima El Agy****,* ***Sara Boukanssa****, et* ***Sanaa Guemrani****.*

Je vous remercie pour l'aide et le soutiens que vous m'avez donné.

Ma spéciale dédicace à ***Mr Aissaoui Mohemmadi****, technicien du laboratoire au service d'anatomie pathologique au CHU HASSAN II, de Fès et* ***Siham Soujaa*** *technicienne du laboratoire d'anatomie Al Azhar. Mes immenses remerciements pour votre assistance technique et coopération durant ma thèse. Je vous souhaite tout le succès et le bonheur.*

Remerciements

A ma directrice de thèse.

J'aimerais tout d'abord adresser mes sincères remerciements à Madame Chbani Laila, Professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, anatomopathologiste au laboratoire d'anatomie pathologique et de pathologie moléculaire au CHU Hassan II de Fès, et Directrice de ma thèse, qui m'a donné l'opportunité de réaliser ce travail. Je vous remercie de m'avoir fait intégrer le domaine de la recherche en cancérologie et de m'avoir fait partager votre expérience et vos connaissances. Un grand merci pour votre disponibilité, votre confiance qui m'a permis de développer une autonomie durant ces années de thèse. Sous votre direction j'ai eu la chance de vivre l'expérience la plus enrichissante et satisfaisante de ma vie professionnelle, et je suis très reconnaissante de cette occasion que vous m'avez donnée.

Aux Membres du jury.

J'exprime ma gratitude à Monsieur ***Khalid Maazaz****, Professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et Chef du service de chirurgie viscérale au CHU Hassan II de Fès, pour l'honneur qu'il me fait en présidant le jury de cette thèse et pour l'intérêt qu'il a porté à ce travail. Vous trouvez en ce travail l'expression de mon profond respect.*

Je tiens à remercie très vivement Monsieur ***Mehdi Karkouri****, Professeur à la faculté de Médecine et de Pharmacie de Casablanca et chef du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU IBN ROCH à Casablanca, de l'intérêt qu'il a accordé à ce travail et d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse. Vos remarques nous sont très utiles. Je* vous prie de voir dans cette thèse, l'expression de mon estime et de ma reconnaissance.

Mes remerciements à Madame ***Khannoussi Basma****, Professeur à la faculté de Médecine et de pharmacie de Rabat et Chef du laboratoire d'anatomie pathologique à l'Institut National d'oncologie à Rabat, pour avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce travail à travers ses fructueuses remarques et corrections. Je* vous prie de voir dans cette thèse, l'expression de mon estime et de ma reconnaissance.

*Je remercie chaleureusement Madame **Samia Arifi**, Professeur à la faculté de Médecine et de pharmacie de Fès, d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse et du temps qu'elle a consacré pour améliorer et corriger mon travail grâce à ses remarques très utiles. Veuillez accepter l'expression de mes considérations les plus distinguées.*

*Je tiens également à exprimer mes vifs remerciements à Madame **El Fatemi hind**, professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et chef du laboratoire d'anatomie pathologique au CHU HASAN II de Fès. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de porter votre regard d'experte sur mon manuscrit.*

*Je souhaite aussi remercier chaleureusement Madame **Touria Bouhafa**, professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, pour avoir accepté aimablement de juger mon travail et d'avoir dégager du temps pour vous y consacrer. Je vous présente mes immenses gratitudes.*

*Merci également à Monsieur **Bachir Benjelloun**, Professeur à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès, d'avoir accepté de juger ce travail et pour le temps consacré à l'évaluation de ma thèse. Je vous présente mes remerciements et ma gratitude.*

---

*Je tiens à exprimer ma gratitude et mes profonds remerciements à Mme le Professeur **Afaf AMARTI RIFFI** et toute son équipe expérimentée, rigoureuse et pleinement investie dans le bon fonctionnement du laboratoire AL AZHAR, du grand intérêt qu'elle a porté à ce travail, de son aide incessante et de son soutien et investissement tout au long de ma thèse. Vous trouvez ici l'expression de ma reconnaissance la plus sincère.*

*Je remercie également monsieur **Ouldim Karim**, Professeur de génétique médicale à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et chef du laboratoire de génétique médicale au CHU Hassan II de Fès, pour ses encouragements, vous trouver ici mes remerciements et ma gratitude.*

*Je dis un grand merci à madame **laila Bouguenouch,** professeur de génétique médicale à la faculté de médecine et de pharmacie de Fès et au laboratoire de génétique médicale du CHU Hassan II de Fès,*

pour son aide précieuse, sa passion et son enthousiasme. Ses qualités humaines exceptionnelles et ses compétences professionnelles m'ont fourni une assistance de tous les instants que j'ai fort appréciée. Pour toutes ces raisons je lui fais part de ma profonde gratitude et de mon estime.

J'adresse mes vifs remerciements à Mme. ***Naima BOUGRIN****, majore du laboratoire central d'analyses médicales du CHU Hassan II de Fès, pour son aide tout au long de ce travail. Que ce travail puisse être le message de mes sentiments les plus respectueux et de ma sincère reconnaissance.*

Liste des abréviations

ACE : Antigène carcino-emryonnaire

APC : Adenomatous polyposis coli

A : Alanine

ADN : Acide désoxyribonucléique

ASCO : American society of clinical oncology

AJCC : American joint committee on cancer

Ag : Antigènes

AUC : Area under the curve

BET : Bromure d'éthidium

BDT : Big Dye Terminator

BRAF : B-Raf proto-oncogene

CCR : Cancer colorectal

CR : Cancer rectal

C : Cystéine

CIP : Cyclin Kinase Inhibitor

CG : Cytosine-guanine

CD : Clusters de différenciation

CRT : La chimioradiothérapie

CAP 50 : Capécitabine 50

CG : Centres germinatifs

CIN : Chromosomal instability

DPC4 : Deleted in Pancreatic Carcinoma

DNMT : DNA-methyl transferase

DAB : Diaminobenzidine

DO : Densité optique

DDC : Dopa decarboxylase

dNTP : Désoxyribonucléotides-triphosphates

ddNTP : Didéoxyribonucléotides triphosphates

EER : Echoendoscopie rectal

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor

ET : Effet thérapeutique

EURECA-CC2: 2nd European Rectal Cancer Consensus Conference (Conférence européenne de consensus sur le cancer du rectum)

ETM : Excision totale du mésorectum

FGFR : Fibroblast Growth Factor Receptor

5-FU : 5-Fluorouracile

FRET : Fluorescence resonance energy transfer

GTPases : L'enzyme guanosine triphosphate

G : Glycine

GL : Ganglion lymphatique

Gy : Gray

HES : Hématéine-Eosine-Safran

HER2 : Human Epidermal Growth Factor Receptor-2

HNPCC : Hereditary non polyposis colorectal cancer

HR : Hazard ratio

IRM : L'imagerie par résonance magnétique

IHC : Immunohistochimique

IEC : Invasion extra-capsulaire

IGFR : Insulin-like Growth Factor Receptor

IC : Instabilité chromosomique

ILC : Interleukin C

K-ras : V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma

LOH : Loss of heterozygosity (perte d'hétérozygotie)

LoD : Limit of detection

MICI : Maladie inflammatoire chronique de l'intestin

MAPK : Mitogen-activated protein kinases

MSI : Microsatellite instability

MMR : Mismatch repair

MSH : MutS Homolog

MLH1 : MutL Homolog 1

NK : Natural killer

PAF : Polyposes adénomateuses familiales

PET-scan FDG : Positron emission tomography-Fluorodesoxyglucose

PI3K : Phosphatidylinositol 3-kinase

TP53 : Tumor protein 53

PDGFR : Platelet Derived Growth Factor Receptor

PCR : Polymerase Chain Reaction

PBS : Phosphate buffered saline

R : Arginine

RT : Radiothérapie

S : Sérine

SG : Survie globale

SSR : Survie sans Récidive

SRM : survie sans récidive métastatique

SMAD : Small mothers against decapentaplegic

TAE : Tris-Acetate EDTA buffer

TR : Toucher rectal

Th 1 : T Helper cell type 1

TNM : Tumor-Nodes-Metastasis

TDM : Tomodensitometrie

TGFβ : Transforming Growth Factor-β

TRG : Tumor Regression Grade

UICC : Union Internationale Contre le Cancer

Liste des Tableaux

Tableau 1 : Les mutations du gène KRAS les plus fréquentes sur les codons 12 et 13 26
Tableau 2 : 7ème et 8ème stadification TNM du cancer colorectal selon la Commission Americaine du cance (AJCC)(Tong et al., 2018) 48
Tableau 3 : classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 8e édition 2017) 49
Tableau 4 : Classification pTNM des métastases dans les cancers colorectaux 49
Tableau 5 : Préparation du mélange réactionnel pour dosage de la concentration d'ADN 86
Tableau 6 : Caractéristiques des amorces des gènes KRAS, NRAS, et BRAF 88
Tableau 7 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification de l'ADN, on utilisant le Mix platinum pour l'amplification de l'exon 2 du gène KRAS et NRAS et de l'exon 15 du gène BRAF .. 89
Tableau 8 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification de l'ADN, on utilisant le Kit green Taq polymérase pour l'amplification de l'exon 3,4 des gènes NRAS et KRAS. 90
Tableau 9 : Programme de la réaction de PCR pour les gènes KRAS et NRAS 90
Tableau 10 : Programme de purification du produit de la PCR 95
Tableau 11 : Programme de la réaction de séquence 95
Tableau 12 : Volumes des réactifs du mix pour la réaction de séquence 96
Tableau 13 : Programme de la réaction de séquence 96
Tableau 14 : Préparation du mélange réactionnel pour le mélange d'amorce PCR. 99
Tableau 15 : Protocole de cycle optimisé de la PCR 99
Tableau 16 : Mélange d'immobilisation de l'ADN. 100
Tableau 17 : exemple d'un tableau récapulatif des résultats 102
Tableau 18 : Caractéristiques démographiques et clinicopathologiques des patients 117
Tableau 19 : Association entre les critères clinicopathologiques et la réponse thérapeutique 120
Tableau 20 : L'analyse multivariée des résultats significatifs dans l'analyse univariée 122
Tableau 21 : .Caractéristiques clinicopathologiques des deux groupes 123
Tableau 22 : Taille des ganglions lymphatiques dans les deux groupes 125
Tableau 23 : Comparaison entre le groupe d'étude et le groupe contrôle 126
Tableau 24 : Associations entre le nombre des centres germinatifs et les différentes 131
Tableau 25 : Description des caractéristiques des patients et des ganglions lymphatiques 134
Tableau 26 : Analyse univariée de la survie globale et de la survie sans rechute selon les différentes caractéristiques 136
Tableau 27 : Les caractéristiques clinicipathologiques et moléculaires 141
Tableau 28 : Association entre les deux groupes selon la réponse thérapeutique et les différents biomarqueurs 143

Tableau 29 : Association entre les caractéristiques clinicopathologiques et la réponse thérapeutique 144
Tableau 30 : Fréquence des mutations dans le gène KRAS 148
Tableau 31 : Association entre les caractéristiques clinicopathologiques et la présence des mutations dans les gènes KRAS et NRAS 152
Tableau 32 : Analyse descriptive des caractéristiques clinicopathologiques et lymphocytaire des patients. 157
Tableau 33 : Association entre la réponse thérapeutique et l'immunoscore 158
Tableau 34 : association entre les différents paramètres et l'infiltration des CD3 et CD8 160

Liste des Figures

Figure 1 : Coupe frontale du rectum (Rouviere et al, 1924) *6*
Figure 2 : Coupe sagitale du rectum, A: chez l'homme B: chez la femme (rouviere et al., 1924) *9*
Figure 3 : Le mésorectum (carol, F et al, 2014) *10*
Figure 4 : Vascularisation du rectum, les trois artères: supérieure, moyenne et inférieure ..*11*
Figure 5 : Aspect histologique de la paroi colique A. HESx250. Histologie élémentaire de la paroi colique B. HES x250. Adénocarcinome lieberkuhnien avec infiltration de la sou-muqueuse (http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique) *15*
Figure 6 : Incidence estimée et taux de mortalité normalisés du cancer du rectum selon l'âge (dans le monde) en 2018, tous âges (Globocan 2018,http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars) *17*
Figure 7 : Echographie endorectal A. Paroi rectale normale B. Paroi rectale *22*
Figure 8 : Séquence de transformation, colon normal-adénome-adénocarcinome *24*
Figure 9 : Activation de la voie de signalisation Wnt impliquant le couple *25*
Figure 10 : Séquence Adénome-Adénocarcinome avec les différentes altérations *26*
Figure 11 : Activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT((Lievre et al., 2008) *27*
Figure 12 : Activation des voies de signalisation intracellulaire *28*
Figure 13 : Activation de la voie TGFβ (Robert, 2010) *29*
Figure 14 : Activation de la voie p53 impliquée dans la carcinogenèse (Robert Jackes, 2010) *30*
Figure 15 : La polypose adénomateuse colique (Macroscopie)("Cours," college francais des pathologistes.)http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique) *31*
Figure 16 : Système de réparation des mésappariements (MMR) (Robert, 2010) *32*
Figure 17 : Méthylation de l'ADN (Robert, 2010) *35*
Figure 18 : l'expression du MSH6 par immunohistochimie. A, forte expression nucléaire. B, absence d'expression au niveau nucléaire, témoin interne (lymphocytes) (Huh et al., 2016) *36*
Figure 19 : Examen macroscopique d'un cancer du rectum localement avancé *42*
Figure 20 : HES x250. Un adénocarcinome bien différencié et infiltrant *43*
Figure 21 : HESx250. Un adénocarcinome moyennement différencié *44*
Figure 22 : HESx250. Un adénocarcinome peu différencié *44*

Figure 23 : HESx250. Un adénocarcinome muniсeux (CoPath, 2013) *45*
Figure 24 : HESx250. Un carcinome rectal à cellules en bague *46*
Figure 25 : a. tumeur envahissant la sous-séreuse, absence de métastase ganglionnaire et absence de métastase distale (T3, N0, M0), classée Stade IIA.b. Tumeur perforant le péritoine, présence de métastases ganglionnaires et de métastases distales (T4a,N+,M1a) définissant le stade IVA (ASCO, 2018) *50*
Figure 26 : la régression tumorale des cancers du rectum après traitement néoadjuvant selon les différentes classifications(Frédéric Bibeau et al., 2011) *51*
Figure 27 : Arbre décisionnel du traitement adjuvant dans le cancer du rectum *57*
Figure 28 : Arbres décisionnel dans le traitement du cancer du rectum *58*
Figure 29 : Arbre décisionnelle pour la surveillance post traitement du cancer *60*
Figure 30 : Diagramme d'illustration des critères de sélection des patients *63*
Figure 31 : Examen macroscopique d'une pièce de résection antérieure du rectum à l'état frais. A : mesure de la taille de la pièce B : encrage en bleu de la surface du mésorectum C : insertion d'une compresse sans ouvrir en regard de la tumeur et pour assurer sa fixation (Laboratoire d'anatomie pathologique CHU HASSA II, Fès) *65*
Figure 32: Examen macroscopique après fixation au formol à 10% A. Pièce de résection antérieur du rectum avec encrage du mésorectum, B. Coupes sériées de la pièce opératoire C. curage ganglionnaire (Laboratoire d'anatomie et de pathologie moléculaire, CHU HASSAN II, Fès) *66*
Figure 33 : A. Appareil d'imprégnation par le toluène (histokinette) B. Appareil d'inclusion dans la paraffine (Laboratoire d'anatomie, CHU HASAN II Fès) *67*
Figure 34 : Technique de microtomie et de montage sur lames A : coupe au microtome avec ruban paraffine, B : Etalement du ruban au bain marie (Laboratoire d'anatomie, CHU HASAN II Fès) *68*
Figure 35 : Appareil de coloration automatisée (Laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès) *69*
Figure 36 : Lames colorées avec la coloration HES *70*
Figure 37 : Les étapes de déparaffinage des lames (laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès) *72*
Figure 38 : Le protocole expérimental de la technique d'immunohistochimie indirecte *73*

Figure 39 : Automate pour immunohistochimie de la marque VENTANA Benchmark ULTRA (Laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès) *75*
Figure 40 : Evaluatioon de l'expression de HER2 ..... *76*
Figure 41 : Schéma illustratif de la méthode de conception de l'immunoscore *80*
Figure 42 : Schéma illustratif pour le classement de l'immunoscore en 3 groupes *81*
Figure 43 : Détermination de la zone tumorale et du pourcentage des cellules tumorales sur la lame colorée avec la coloration HES et bloc correspondant de la biopsie (Laboratoire d'Anatomie, CHU HASSAN II, Fès) *82*
Figure 44 : Etapes d'extraction d'ADN à partir d'un tissus à l'aide du kit d'extraction Invitrogen. *84*
Figure 45 : Photo du NanovuePlus TM *85*
Figure 46 : Photo d'un Fluorométre (Qubit 3.0) *86*
Figure 47 : Thermocycleur utilisé dans l'amplification de l'ADN tumorale extrait *87*
Figure 48 : Principe de la technique PCR standard (Lamoril et al., 2008) *89*
Figure 49 : Le séquenceur 3500 DX utilisé pour le séquençage de l'ADN *93*
Figure 50 : Principe du séquençage selon la technique de Sanger (Lamoril et al., 2008) *94*
Figure 51 : Principe de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie pas résonance *94*
Figure 52 : Le pyroséquenceur utilisé au laboratoire de pathologie moléculaire du *97*
Figure 53 : Utilisation d'une sonde biotinylée pour la réalisation d'un *98*
Figure 54 : Principe de la technique du pyroséquencage de l'ADN *98*
Figure 55 : Illustration d'une station de travail pour la préparation de l'ADN *101*
Figure 56 : Illustration de la cartouche PyroMark Q24 (Vue de dessus) *101*
Figure 57 : (a) Schéma générale décrivant la procédure d'analyse de l'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques. (b) Evaluation de l'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques selon les différentes catégories *106*
Figure 58 : Répartition des patients en fonction de l'année du diagnostic du cancer du rectum *110*
Figure 59 : Répartition des patients selon leur provenance *111*
Figure 60 : Répartition des patients selon les tranches d'âges *112*
Figure 61 : Répartition des patients selon les tranches d'âge et le sexe *112*
Figure 62 : Les signes cliniques évocateurs du cancer rectal dans notre population *114*

Figure 63 : Courbes de Kaplan Meier (a). La survie sans rechute,.....115
Figure 64 : Courbes de Kaplan Meier de la survie globale en fonction de la réponse thérapeutique.....122
Figure 65 : Corrélation entre le nombre des ganglions métastatiques et le.....125
Figure 66 : Pourcentage de métastases en fonction de la taille des ganglions lymphatiques dans les deux groupes 128
Figure 67 : Caractéristiques (ROC) de comparaison du ratio des GL positifs et l'apparition de rechute (valeur seuil 0.13), AUC, 60%, sensibilité : 86 %, spécificité : 47 %).....129
Figure 68 : Les courbes de survie globale en fonction du nombre.....132
Figure 69 : Les courbes de survie sans rechute selon la présence ou l'absence de.....133
Figure 70 : Les fonctions de survie a. la survie sans rechute en fonction du ratio des GLs.133
Figure 71 : Coloration HES x 250 avec la présence d'un effet thérapeutique.....135
Figure 72 : (a) courbes de Kaplan-Meier pour la durée de survie globale en fonction de la présence de colloïde (b) courbes de survie globale selon la présence de l'effet thérapeutique de type nécrose (c) courbes de survie globale en fonction de l'effet thérapeutique de type fibrose. 137
Figure 73 : Courbes de kaplan-meier pour la durée de survie en mois selon 137
Figure 74 : Marquage nucléaire marron avec l'anticorps Ki-67 par immunohistocimie,..138
Figure 75 : Immunohistochimie avec l'anticorps anti-MSH 6 .A. MSH 6 stable (Grossissement x 100), B. MSH 6 instable (Grossissement x200).....139
Figure 76 : Immunomarquage avec l'anticorps anti-erbB1, score 3+ (Grossissement X400) 140
Figure 77 : Marquage du p53 par immunohistochimie au niveau nucléaire A. Grossissement x 100.....140
Figure 78 : Exemple d'une représentation graphique de l'absorbance des extraits d'ADN.147
Figure 79 : Analyse sur gel d'Agarose à 2% des produits d'amplification par PCR.....147
Figure 80 : Electrophérogramme montrant la mutation c.34G>T.....149
Figure 81 : Electophorégramme montrant une mutation c.436G>A.....149
Figure 82 : Mutation dans l'exon 4 du gène KRAS, détectée.....150
Figure 83 : Survie Globale des patients A. Survie globale des patients en fonction du Ki 67, B. Survie Globale des patients en fonction du MSI, C. Survie globale des patients en fonction des

mutations de l'exon 2 du gene KRAS, D. Survie globale des patients en fonction des scores de l'HER2 ..... *154*
Figure 84 : Survie sans rechute en fonction des différents scores de l'HER 2 ..... *155*
Figure 85 : a : Marquage immunohistochimique dans le core de la tumeur (CT) (Grossissement x40) b : Marquage immunohistochimique dans la marge d'invasion (MI) (Grossissement x40) *156*
Figure 86 : Survie des patients en fonction des Immunoscores A.survie gloale en fonction des 5 immunoscores B. Survie globale en fonction de immunoscores classé en 3 groupes C : Survie sans rechute en fonction de l'immunoscore. *161*

Table des matières

INTRODUCTION 1

ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE 5

I. RAPPELS 6

A. Anatomique 6

I.1. Anatomie descriptive *6*

1. Le rectum 6

1 .1 Le rectum pelvien 7

1. 2 Le rectum périnéal 7

2. Les rapports de la loge rectale 7

2. 1. Les rapports postérieurs 8

2.2. Les rapports antérieurs 8

2.3. Les rapports latéraux: 9

3. Le mésorectum 10

4. la vascularisation 10

4.1 Les artères 10

4 .2. Veines rectales 12

5. Innervation 12

6. Drainage lymphatique 12

I. 2. Anatomie fonctionnelle *14*

1. Physiologie de la continence anale. 14

2. L'exonération 14

B. Histologique 14

II. EPIDEMIOLOGIE DU CANCER DU RECTUM 16

1. Epidémiologie descriptive 16

1.1 Fréquence des cancers colorectaux 16

1 .2. Répartition selon l'âge et le sexe 17

2. Epidémiologie analytique 18

III. LES ASPECTS CLINIQUES ET PARACLINIQUES DU CANCER DU RECTUM 19

1. Signes cliniques 19

2. Le diagnostic clinique 20
2 .1. Le toucher rectal (TR) 20
3. Le diagnostic paraclinique 21
3.1. Rectoscopie au tube rigide 21
3.2. La coloscopie sous anesthésie générale 21
3.3. L'echoendoscopie rectal (EER) 21
3.4. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) 22
3.5. La tomodensitométrie par émission de positron (PET-scan FDG) 22
3.6. La Tomodensitometrie (TDM) 23
3.7. La biopsie 23
IV. MECANISMES DE LA CARCINOGENESE COLORECTALE 23
1. Les principales voies de signalisation impliquées dans de la carcinogenèse colorectale 24
1.1 La voie WNT/wingless (voie APC/β caténine) 24
1.2. La voie K-ras et PI3K/Akt 25
1. 3. La voie du TGFβ (Transforming Growth Factor) 29
1.4. La voie p53 30
1.5. Chronologie d'apparition des altérations génétiques 30
2. Classification des mécanismes génétiques responsables de la progression tumorale dans le CCR 31
2.1. Instabilité chromosomique (IC) 31
La polypose Adenomateuse familiale (PAF) 31
2.2 Instabilité des microsatellites (MSI). 32
Le syndrome HNPCC (herediditary non polyposis colon cancer) 33
2.3. Mécanismes épigénétiques 34
2.3.1. Méthylation de l'ADN 34
3. Intérêt de la recherche des biomarqueurs moléculaires dans les cancers rectaux. 35
3.1 Définition d'un biomarqueur 35
3.2 Intérêt de la recherche des mutations des gènes de la famille RAS, BRAF 35
3.3. Intérêt de la recherche d'une instabilité des microsatellites 36
3.3.1 Etude de l'instabilité microsatellitaire par immunohistochimie 36
3.3.2. Etude de l'instabilité microsatellitaire par biologie moléculaire 36
3.3.3. Intérêt de la détermination du statut MSI dans les cancers rectaux 37

4. HER2 et cancer du rectum 38
V. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL 40
1. l'infiltration immunitaire 40
2. L'immunoscore 40
VI. ASPECTS ANATOMOPATHOLOGIQUES 41
1. Rôle de l'anatomie pathologique en préopératoire 41
1. 2 Biopsie 41
2. Prise en charge anatomopathologique de la pièce opératoire 41
2.1 Examen macroscopique 42
2.2. Examen microscopique 43
2.2.1 Types histologiques 43
a. L'adénocarcinome: 43
b. L'adénocarcinome mucineux (colloïde) 45
c. L'adénocarcinome à cellules en bague à chaton 45
2.2.2 Les facteurs histopronostiques 46
a. Le curage ganglionnaire 46
b. L'invasion vasculaire et l'engainement périnerveux 47
c. L'infiltration lymphocytaire 47
d. Stades pTNM 47
e. Régression tumorale 50
VII. TRAITEMENTS DU CANCER DU RECTUM 52
A. Méthodes de traitement 52
1. Chirurgie 52
1 .1. Exérèse carcinologique chirurgicale du cancer du rectum non superficielle 52
1.2. Les indications des types d'exérèses chirurgicales dans cancers du rectum non superficiel. 53
1.3 Résection du rectum avec rétablissement de continuité 54
1.4 Exérèse locale (endoscopique ou chirurgicale) des cancers superficiels du rectum 54
1.5 L'amputation abdominopérinéale 54
2. Radiothérapie (RT) et chimioradiothérapie (CRT) 54
2.1. Indications de la radiothérapie 55
2. 2. La chimioradiothérapie préopératoire. 55

2.3 La radiochimiothérapie comparée à la chirurgie seule 56
2.3.1 Efficacité sur la survie globale (SG) 56
2.3.2 Efficacité sur la survie sans Récidive (SSR) 56
2.3.3 Efficacité par rapport à la récidive locale (SRL) 56
2.3.4 Efficacité sur la survie sans récidive métastatique(SRM) 56
4. chimiothérapie adjuvante 56
B. Arbres décisionnels 57
C. place de la chimiothérapie néoadjuvante dans les tumeurs rectales non résécables ou métastatiques. 58
1. Les Thérapeutiques anticancéreuses visant à inhiber la voie RAS/MAPK 58
VII. LA SURVEILLANCE : POST-THERAPEUTIQUE 59
1. surveillance dans les 5 premières années 59
2. Surveillance après 5ans 60
MATERIELS ET METHODES 61
I. DESCRIPTION DE L'ETUDE 62
1. La taille de l'échantillon 62
2. Calcul de la taille d'échantillon 62
3. Critères d'inclusion et d'exclusion 63
3.1. Critères d'inclusion 63
3.2. Critères d'exclusion 63
4. Considérations éthiques 64
5. Recueil des données cliniques 64
II. ETUDE ANATOMO-PATHOLOGIQUE 64
1. Examen macroscopique à l'état frais 64
2. Fixation du tissu 65
3. Examen macroscopique après fixation 66
4. Imprégnation et inclusion 67
5. Coupe et coloration 68
III. ETUDE IMMUNOHISTOCHIMIQUE (IHC) DE L'EXPRESSION DES BIOMARQUEURS 70
1. Principe de la technique 70
2. Le protocole expérimental de la technique IHC 71

3. Interprétation du marquage Immunohistochimique 73
4. Les anticorps utilisés dans notre étude 73
4.1. Evaluation de l'expression du Ki-67 74
4.2. Evaluation de l'expression des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN (MSI) 74
4.3. Evaluation de l'expression de l'HER-2 76
4.4. Evaluation de l'expression du P53 77
4.5. Conception de la technique immunoscore 77
4.5.1 Intérêt de l'étude de l'immunoscore 77
4 .5.2. Calcul de la densité des lymphocytes T CD3 et CD8 78
4.5.3 Méthode de calcul de l'immunoscore 79
III . BIOLOGIE MOLECULAIRE 82
1. Méthodes de Biologie moléculaire 82
1.1. Etape pré-analytique : préparation des lames et détermination du pourcentage des cellules tumorales 82
1.2. Extraction des ADN à partir du tissu fixé 82
1.2.1. Déparaffinage 83
1.2.2. Lyse des protéines tissulaires 83
1.2.3. Lavage après précipitation de l'ADN 83
1.2.4. Elution de l'ADN 84
1.3.5. Dosage de l'ADN extrait 85
a. Dosage par Nanovue TM 85
b. Dosage par Qubit 3.0 85
1.3. L'amplification de l'ADN tumorale par PCR 86
1.3.1. Choix des Amorces 86
1.3.2. Principe de la technique de PCR 87
1 .3.3. Protocole de la technique 88
1 3.4. Visualisation des produits PCR 91
a . Principe 91
b. Réactifs nécessaires 91
1.4. Séquençage de l'ADN 91
1.4.1. Intérêt général du séquençage 92

1 .4.2. Le séquençage classique de Sanger 92
a. Principe de la technique de Sanger 93
b. Protocole du séquençage Sanger 95
 La purification du produit de PCR 95
 La réaction de séquence 95
 Purification de la réaction de séquence 96
c. Analyse des séquences 97
1.4.3. Le pyroséquencage 97
a. Principe du pyroséquencage 97
..... 97
b. Protocole du pyroséquençage 98
IV. ETUDE DES CARACTERISTIQUES DES GANGLIONS LYMPHATIQUES 103
1. Détermination du nombre des ganglions lymphatiques 103
2. Détermination de la taille des ganglions lymphatiques 104
3. Centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques. 104
4. L'invasion extra-capsulaire (IEC) dans les ganglions lymphatiques. 104
5. L'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques 104
V. ANALYSE STATISTIQUE DES DONNEES 107
1. Méthodes statistiques 107
2. La survie globale (SG) 107
3. La survie sans rechute (SSR) 107
RESULTATS 109
PARTIE I. CARACTERISTIQUES DEMOGRAPHIQUES ET TUMORALES DE LA POPULATION ETUDIEE. 110
1. Caractéristiques démographiques 110
1.1. Répartition des patients en fonction de l'année du diagnostic du cancer du rectum 110
1.2. Répartition des cas selon leur provenance 111
1.3. Répartition des cas selon l'âge 111
1.4. Répartition des cas selon le sexe 112
1.5. Localisation de la tumeur 113
1.6. Répartition des patients selon les signes évocateurs 113

1.7. La durée moyenne du diagnostic 114
1.8. Type de chirurgie réalisée 115
1.9. Traitement néoadjuvant 115
1.10. La survie des patients 115
2. Caractéristiques anatomopathologique de la tumeur 116
2.1. Sur biopsie 116
2.2. Sur pièce opératoire 116
3. Etude analytique 119
3.1. Corrélation entre la réponse thérapeutique et les différents paramètres clinicopathologiques 119
PARTIE II. CARACTERISTIQUES DES GANGLIONS LYMPHATIQUES 123
1. Etude descriptive 123
1.1. Nombre des ganglions lymphatiques 123
1.2. Taille des Ganglions lymphatiques 125
2. Etude analytique 126
2.1. Comparaison des caractéristiques ganglionnaires entre le groupe d'étude et le groupe contrôle 126
2.2. Le ratio des ganglions positifs 128
2.3. Comparaison des centres germinatifs avec les caractéristiques clinicopathologiques 129
2.4. Analyse de la survie en fonction de l'effraction capsulaire et du nombre global des ganglions lymphatiques et du ratio des ganglions positifs. 132
2.5. Comparaison de l'effet thérapeutique dans les ganglions lymphatiques avec les paramètres clinicopathologiques et la survie. 134
PARTIE III. ETUDE DES BIOMARQUUEURS 138
A. Marqueurs protéiques 138
1. Etude descriptive 138
1.1. Evaluation de l'expression du Ki -67 138
1. 2. Evaluation de l'expression des protéines MMR (N=57) 139
1. 3. Evaluation de l'expression de l'HER-2 139
1. 4. Evaluation de l'expression du p53 140
2. Etude analytique 142

2.1. Relation entre les caractéristiques clinicopathologiques et les différents biomarqueurs. 143
B. Marqueurs génétiques 146
1. Etude descriptive 146
1.1. Patients 146
1.2. Dosage et qualité de l'ADN 146
1. 3. Résultats de l'amplification des différents exons du gène KRAS 147
1.4. Les mutations du gène KRAS 148
1.5. Les mutations du gène NRAS 150
1.6. Les mutations du gène BRAF 150
2. Etude analytique 151
2.1. Association entre la réponse thérapeutique et les mutations RAS 151
2.2. Corrélation entre la survie des patients et les différents biomarqueurs 154
PARTIE IV. MICROENVIRONNEMENT TUMORAL LYMPHOÏDE 156
1. Calcul de la médiane de la densité des lymphocytes 156
2. calcul de l'immunoscore 156
3. Groupes de l'immunoscore 156
4. comparaison entre l'immunoscore et la réponse thérapeutique 158
5. Survie des malades en fonction de l'immunoscore. 161
DISCUSSION 162
A. Particularités épidémiologiques du cancer du rectum au Maroc et dans notre région 163
B. Quels effets du traitement néoadjuvant sur la tumeur et les caractéristiques ganglionnaires 165
C. Quel impact de type de réponse histologique au niveau ganglionnaire sur le pronostic ? 170
D. Biomarqueurs prédictifs et pronostiques de réponse au traitement néoadjuvant ... 171
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES 177
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 180
ANNEXES 207

Introduction

Le cancer devient un problème de santé croissant et une cause majeure de décès dans le monde. Selon GLOBOCAN 2018, la mortalité par cancer est passée de 8,8 millions en 2015 à 9,6 millions en 2018, avec plus de 18 millions nouveaux cas estimés (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018).

Le cancer colorectal (CCR) représente le cancer digestif le plus fréquent(Ferlay et al., 2018). Le cancer rectal (CR) est le troisième cancer fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes et représente respectivement 10% et 9,2% de tous les cancers (Bray et al., 2018; Schreuders et al., 2015). De plus, le CR seul est classé comme le 9 ème cancer dans le monde après le cancer du foie, avec 704 376 (3,9%) nouveaux cas et 310 394 (3,2%) décès de tous les cancers rapportés dans le dernier rapport mis à jour par la base de données GLOBOCAN (Bray et al., 2018). L'incidence accrue du CR est notamment observée dans les pays développés, en particulier dans l'est de l'Europe (25,9%), en Australie / Nouvelle-Zélande et en Asie orientale, par rapport aux régions d'Afrique et d'Asie du Sud (4,8%) (Deng, 2017) .

Au Maroc, le cancer colorectal est le troisième cancer chez les femmes après les cancers du sein, du col utérin et de l'utérus et le deuxième chez les hommes après le cancer du poumon (Elidrissi Errahhali et al., 2017). La prise en charge actuelle des CR est particulièrement complexe et nécessite des approches multidisciplinaires incluant la gastroentérologie, la chirurgie, l'oncologie, la radiothérapie et l'anatomopathologie, ainsi que le rôle important de l'oncogénétique (Berho et al., 2015). La probabilité de survie à 5 ans est d'environ 55 % approximativement (De Bari et al., 2012). Le CR représente presque 30 % des cas du cancer colorectal (Arnold et al., 2017) .

Son traitement dépend d'un certain nombre de facteurs prédictifs et pronostiques tels que la localisation de la tumeur dans le rectum et l'extension tumorale locale (Buzatti and Petroianu,2017). Les traitements néoadjuvants (Radiothérapie seule ou Radiochimiothérapie) suivis de la chirurgie avec exérèse totale du mésorectum sont efficaces dans la prise en charge des cancers du rectum localement avancés, ces derniers correspondent à des cancers de stade T3 ou T4, avec ou sans envahissement ganglionnaire régional. Cette stratégie permet de diminuer le taux de récidives locales et de faciliter l'exérèse chirurgicale (Ilyas et al., 1999).

Ce cancer expose à une diffusion métastatique (hépatique et pulmonaire surtout), et à des récidives locales très pénibles et généralement non résécables. En dépit des progrès réalisés dans son dépistage et sa prise en charge, son pronostic reste sombre. Cependant il est accessible à une

stratégie de prévention efficace vu qu'il se développe habituellement sur une lésion préexistante évoluant pendant plusieurs années(Golo et al., 2018).

Les exérèses du cancer rectal trouvent leurs difficultés dans le siège de cet organe, dans sa vascularisation lymphatique, dans ses rapports avec l'appareil sphinctérien et viscères uro-génitaux, et dans son innervation étagée. Pour cela la chirurgie du cancer rectal reste délicate et grevée de récidives, de troubles fonctionnels sphinctériens et de troubles urogénitaux (Buzatti and Petroianu, 2017).

Le bilan radiologique post-traitement néoadjuvant basé sur l'IRM pelvienne ou l'endoscopie ulta-sonde et le CT-scan thoraco-abdominal est un outil permettant de fournir des informations essentiels concernant la réponse thérapeutique, ainsi que l'étendue de la tumeur locale et à distance (Hötker et al., 2014). En effet, une réévaluation du stade tumoral par IRM avant chirurgie permettra de modifier la stratégie thérapeutique, en cas de bonne réponse thérapeutique pour les cancers du rectum localement avancés et ceux du bas rectum(Cui et al., 2019).

Alors que la réponse au traitement préopératoire reste le facteur pronostic majeur qui révèle l'agressivité de la tumeur, il n'existe pas aujourd'hui de facteurs biologiques prédictifs de la réponse tumorale.

En vue de développer une chirurgie adaptée à la réponse individuelle des patients, des essais, en cours de réalisation, vise à démontrer que la désescalade chirurgicale est possible pour les tumeurs radiosensibles (Rullier et al., 2017). D'autres études proposent, en cas de réponse clinique complète, une simple exérèse de la cicatrice résiduelle et une conservation du rectum en l'absence de résidu tumoral avec une surveillance étroite.

Notre étude, exclusive et première en son genre, consiste à mener une étude rétrospective et prospective afin de déterminer les facteurs prédictifs de réponse aux traitements qui représentent des facteurs déterminants pour la décision thérapeutique. Alors que L'efficacité du traitement néoadjuvant sur la régression tumorale chez les patients marocains atteints du cancer rectal n'a pas encore été étudiée, en plus d'un manque de données épidémiologiques, cliniques et pathologiques.

L'objectif principal de ce travail consiste à identifier des biomarqueurs prédictifs de réponse aux traitements néoadjuvants dans le cadre d'une réponse complète.

Les objectifs secondaires consistent en une étude descriptive et analytique des données épidémiologiques, cliniques, histomoléculaires et thérapeutiques du cancer du rectum des

patients dans la région de Fès, une comparaison de nos résultats avec ceux de la littérature, et enfin l'étude de l'effet de ces paramètres sur la survie des patients.

Etude bibliographique

I. Rappels

A. Anatomique

I.1. Anatomie descriptive

1. Le rectum

Le rectum est la partie terminale du tube digestif faisant suite au colon sigmoïde, là où se termine le méso- sigmoïde, en regard de la troisième vertèbre sacrée. Il descend dans l'excavation pelvienne et traverse les parties molles du périnée postérieur pour se terminer à l'orifice anal. Sur le plan morphologique on peut distinguer 3 parties : haut, moyen, et bas rectum **(Fig .1)**.

Anatomiquement le rectum est subdivisé en 2 portions : le rectum pelvien (ampoule rectale) et le rectum périnéal (canal anal) (Rouvière et al., 1924).

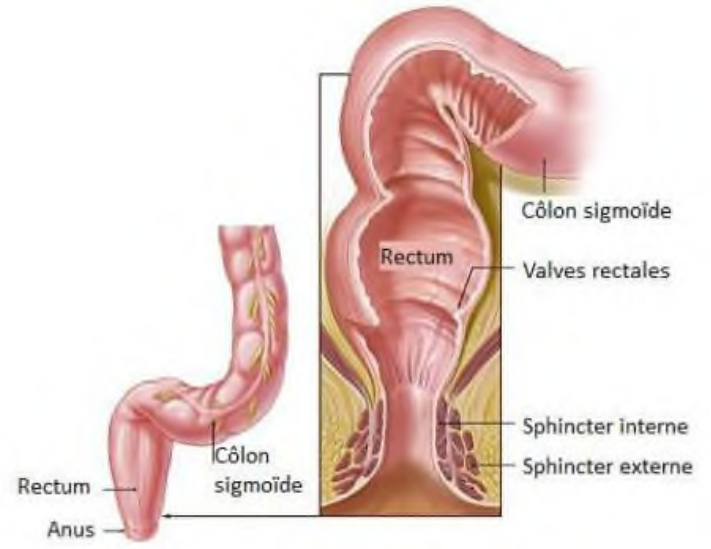


***Figure 1 : Coupe frontale du rectum** (Rouviere et al, 1924)*

1 .1 Le rectum pelvien

Située dans la concavité sacro coccygienne, l'ampoule rectale mesure entre 12 à 14 cm, son diamètre est d'environ 6 cm dans le sens transversal et 2 cm dans le sens antéropostérieur. C'est un réservoir contractile dont l'origine embryologique est la même que celle de l'intestin primitif, raison pour laquelle il possède un mésorectum. (de Calan et al, 2004). Sa limite inférieure correspond au point où le rectum traverse le releveur de l'anus en décrivant un coude à concavité postérieure pour devenir un canal anal, sa configuration interne est caractérisée par une muqueuse lisse, présentant une série de plis longitudinaux, et d'autres transversaux formant les valvules de Houston (de Calan et al., 2004; Rouvière et al., 1924)

1. 2 Le rectum périnéal

C'est le segment le plus fixe du rectum, situé au niveau de la partie médiane du périnée postérieur, il est entièrement sous péritonéal, sous le cul de sac de douglas et au-dessous du plancher des releveurs de l'anus. Long de 3 à 5 cm, le canal anal s'étend sur un court trajet depuis le diaphragme pelvien des releveurs de l'anus en haut jusqu'à l'orifice anal en bas. Il a une forme cylindrique, et un calibre extérieur de 2 à 3 cm (lahlaidi et al., 1986). C'est une zone sphinctérienne, en effet elle est entourée de deux muscles, le sphincter anal interne et le sphincter anal externe (Fig.1).

Le sphincter interne représente les 2 à 4 cm de la couche musculaire interne du rectum, son extrémité terminale se situe environ 1 cm sous la ligne pectinée. Le sphincter externe est constitué de trois faisceaux continus. Les faisceaux profonds se prolongent par le muscle élévateur de l'anus. L'espace qui sépare les deux sphincters internes et externes est clivable de point de vue chirurgical.

2. Les rapports de la loge rectale

Les rapports de l'ampoule rectale et de la loge rectale sont caractérisés par leur remarquable fixité et leur très grande importance chirurgicale. Ils s'effectuent par l'intermédiaire de la loge fibreuse du rectum ou gaine rectale. Ces rapports présentent quelques différences suivant le sexe considéré.

2. 1. Les rapports postérieurs

Les rapports sont identiques, en arrière, chez les deux sexes et s'effectuent avec la convexité du sacrum par l'intermédiaire du feuillet postérieure de la gaine rectale. Ils s'effectuent avec l'espace retro-rectal limité en arrière par l'aponévrose pré-sacré qui tapisse le sacrum, le coccyx et les muscles pyramidaux et ischio-coccygiens, en adhérent au squelette en dedans des trous sacrés antérieurs (Fig. 2).

Latéralement, cet espace rétro-rectal est fermé de façon plus ou moins complète par la partie toute postérieure des lames sacro-retro-génito-viséco-pubiennes. Comblé par un abondant tissu cellulo-graisseux, cet espace est pratiquement avaculaire et représente un plan de clivage classique de la mobilisation du rectum au cours de la chirurgie de celui-ci.

2.2. Les rapports antérieurs

Chez l'homme :

- La partie supérieure, péritoine du rectum réponds au cul de sac de douglas, qui peut descendre parfois en arrière de la partie toute supérieure des vésicules séminales et des déférents et de la face antérieure du rectum.
- Le segment sous péritonéale de la face antérieure du rectum répond à l'aponévrose postato-péritonéale de Denonvilliers à la partie terminale des canaux déférents et la base prostatique. Plus en dehors aux vésicules séminales. Et enfin en dehors à l'uretère se dirigeant vers la base vésicale.

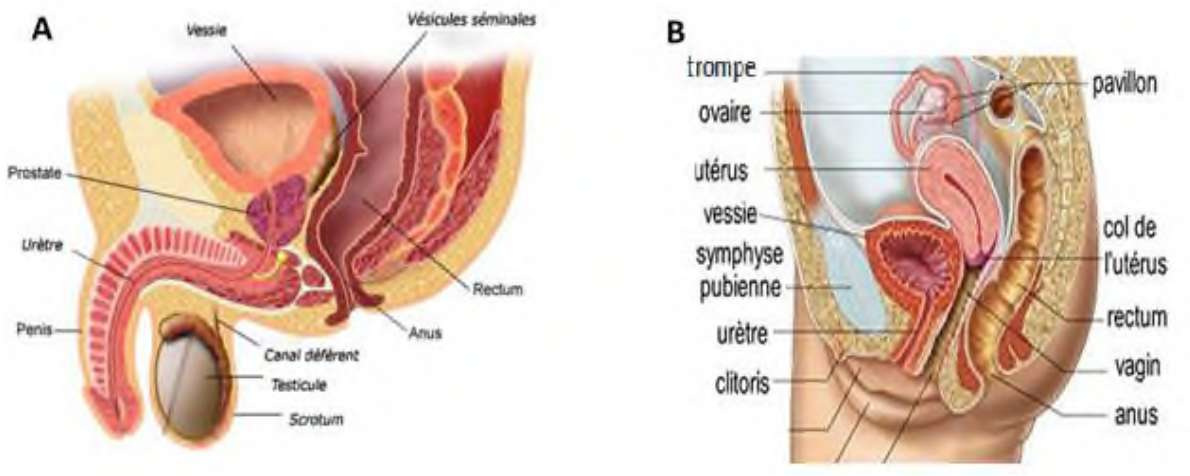


Figure 2 : ***Coupe sagitale du rectum, A: chez l'homme B: chez la femme*** *(rouviere et al., 1924)*

Chez la femme :

- En haut, en avant au cul de sac de Douglas, il est en rapport avec la face postérieure de l'utérus et du dôme vaginal. En bas, le péritoine est soulevé par les ligaments utéro-sacrés qui devisent le Douglas en 2 étages : un étage supérieur ou peuvent se prolaber les anses grêles, le cæcum et l'appendice et un étage inférieur, situé en dessous des ligaments utérosacrés par son intermédiaire la face antérieure du rectum répond à la face postérieure de l'utérus et latéralement à la partie la plus interne des ligaments larges.
- Le segment sous péritonéal répond à la face postérieure du cul de sac vaginal postérieur dont le rectum est séparé par la cloison recto-vaginale. Cette cloison est l'équivalent de l'aponévrose de Denonvilliers. Plus en dehors le paramètre exploitable par le toucher rectal est traversé obligatoirement par l'uretère.

2.3. Les rapports latéraux:

Ils sont essentiellement pariétaux et sont différents dans la partie supérieure péritonisée, qui est en rapport avec le colon pelvien, les anses grêles, chez la femme il est en rapport avec les ovaires et l'infundibulum à ce niveau.

Dans la partie inférieure sous-péritonéale il est en rapport avec le ligament latéral. (Klein, 2000). C'est un tractus fibreux présent sur les faces latérales, puis antérolatérales.

3. Le mésorectum

Le rectum est enveloppé d'un tissu cellulo-graisseux, essentiellement sur sa face postérieure, il est appelé mésorectum. Ce dernier est entouré par un ensemble de fascia permettant de le délimiter. Ce mésorectum prolonge vers le bas le mésosigmoïde pour se rétrécir progressivement de haut en bas et se terminer sur la face postérieure du rectum au-dessus du sphincter anal. Il contient les branches terminales et proximales des vaisseaux mésentériques inférieurs et leurs ganglions lymphatiques. Il est le champ de dissémination initiale du cancer rectal, son exérèse représente une partie du traitement curatif (Fig. 3). Il est développé sur les trois quarts de la circonférence du rectum sous-péritonéal, en arrière et latéralement et disparait sur les deux derniers centimètres de l'ampoule rectale.

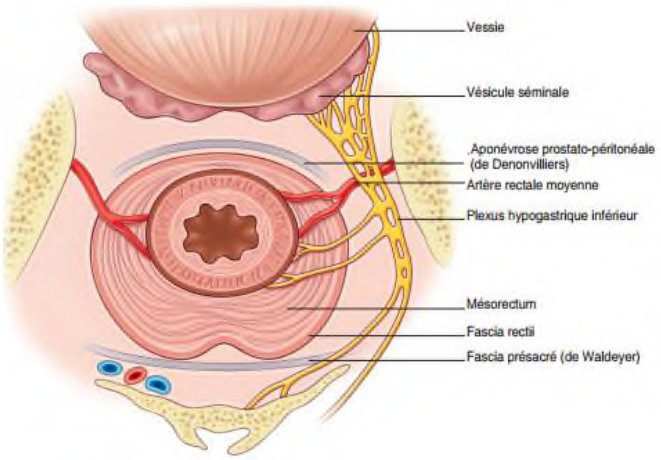


***Figure 3 : Le mésorectum** (carol, F et al, 2014)*

4. la vascularisation

4.1 Les artères

La vascularisation artérielle du rectum est assurée par :

- L'artère rectale supérieure: l'artère la plus importante dans la vascularisation du rectum, c'est une branche terminale de l'artère

mésentérique inférieure, elle se divise en regard de S3 en branche droite qui descend verticalement à la face postérieure de l'ampoule rectale, donnant des branches pour la moitié postérieure droite de l'ampoule rectale. La branche gauche qui est horizontale et vascularise les faces antérieure et gauche de l'ampoule rectale, les branches collatérales traversent la paroi musculaire rectale pour former un réseau sous muqueux qui descend jusqu'à la ligne pectinée (Fig. 4).

- Artère rectale moyenne: inconstant dans 50% des cas pour certains auteurs, elle nait de l'artère iliaque interne se dirige transversalement sur le muscle releveur et au-dessous du ligament latéral et elle se divise en trois à quatre branches.
- l'artère rectale inférieure nait de l'artère pudendale, se dirige transversalement en dedans à travers la fosse ischiorectale, vascularise le sphincter anal interne, le sphincter anal externe, le muscle releveur de l'anus et la sous muqueuse du canal anal (Godlewski and Prudhomme, 2000)
- Artère sacrée médiane nait de la bifurcation aortique, descend sur la ligne médiane en avant du sacrum en arrière du fascia présacré avant de se terminer en regard du coccyx et donnent des branches à la face postérieur du rectum.

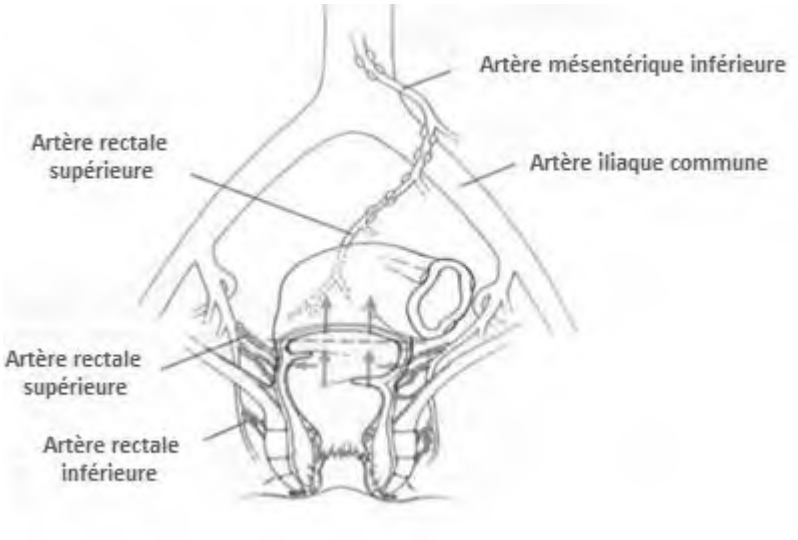


Figure 4 : Vascularisation du rectum, les trois artères: supérieure, moyenne et inférieure (Leblanc et al., 2008)

4 .2. Veines rectales

Le drainage veineux du rectum se fait principalement par la veine rectale supérieure et accessoirement par les veines rectales inférieures, moyennes et la veine sacré médiane. La veine rectale supérieure est formée par la réunion de cinq à six veines traversant la paroi musculaire du rectum et convergeant dans un grand tronc veineux qui reste en avant ou à gauche de l'artère éponyme. Elle forme avec les veines sigmoïdiennes, la veine mésentérique inférieure.

5. Innervation

Elle se fait à partir des plexus hypogastriques qui sont communs au rectum, à la vessie et aux organes sexuels. La préservation de l'innervation pelvienne est possible en l'absence d'envahissement direct, mais elle repose sur des connaissances anatomiques précises (Faucheron, 1999; Istvan et al., 1997) elle doit permettre de diminuer les séquelles urinaires et sexuelles de la chirurgie du cancer de rectum (Masui et al., 1996).

- **Sympathique** : issue de L1, L2 et L3, les racines sympathiques constituent le plexus inter mésentérique situé en avant de l'aorte, encore appelé nerfs hypogastriques supérieurs selon qu'il est totalement plexiforme, ou ce qui est très fréquent, dédoublé. Il existe alors un tronc gauche très proche des vaisseaux mésentériques inférieurs et un tronc droit plus à distance dans l'angle dièdre aorto-cave.
- **Parasympathique** : il est constitué par des branches de S2, S3 et S4. Il est responsable de l'érection chez l'homme. Les nerfs érecteurs (caverneux) cheminent, avec des branches sympathiques, dans les bandelettes neurovasculaires de Wlash, en dehors de l'aponévrose de Denonvilliers, très proches de la face antérolatérale du bas rectum en regard des vésicules séminales (Tiret and Pocard, 1999).

6. Drainage lymphatique

Les vaisseaux lymphatiques sont formés à partir des plexus lymphatiques qui se situent dans la paroi rectale sous la muqueuse rectale et anale. Ils gagnent par la suite les ganglions périrectaux situés dans le mésorectum. Le drainage lymphatique du rectum est un système satellite des artères. Il s'effectue dans la plus grande partie du rectum pelvien au niveau du mésorectum selon un mode ascendant.La particularité du drainage lymphatique du rectum est liée au risque du

récidive locorégionale, c'est pour cela qu'une localisation plus bas situé a un risque plus élevé de récidive locorégionale (de Calan et al., 2004).

Les lymphatiques drainant le rectum périnéal et la jonction anorectale sont dirigés latéralement vers les structures périnéales à travers les muscles releveurs et les sphincters. Le drainage lymphatique se fait principalement à travers le mésorectum vers le pédicule rectal supérieur, et accessoirement vers les ganglions iliaques externes ou internes et les ganglions inguinaux à travers les réseaux lymphatiques pudendaux ou sous-cutanés (Godlewski and Prudhomme, 2000; Rouvière et al., 1924).

I. 2. Anatomie fonctionnelle

Le rectum pelvien ou l'ampoule rectale constitue une unité fonctionnelle destinée à permettre l'accumulation et l'expulsion des matières fécales par l'intervention d'un système capacitif. Par contre le canal anal permet la fonction d'exonération et d'assurer la continence par l'intermédiaire de l'appareil sphinctérien grâce à son système résistif et sensitif. La synergie fonctionnelle du rectum et du canal anal est une entité duale indispensable pour assurer la continence d'une part et l'expulsion des matières et des gaz intestinaux d'autre part (de Calan et al., 2004).

1. Physiologie de la continence anale.

La continence fécale et la défécation sont des fonctions complexes faisant intervenir les muscles lisses à commande involontaire et de muscles striés à commande volontaire (Bouvier, 1991). Les sphincters internes et externes en plus de l'angulation ano-rectale sont responsables de la fonction de continence. L'occlusion du canal anal au repos est assurée par le tonus permanent du sphincter interne grâce à des contractions périodiques allant de bas en haut qui empêchent les suintements liquides par le canal anal. Une rupture ou section du sphincter peut induire des troubles d'incontinence fécale et au gaz (Martel et al., 2004; Masson, 2002.).

2. L'exonération

Une distension de la paroi et une augmentation de la pression intra rectale est créé après arrivée des matières fécales dans l'ampoule rectale. Apres stimulation des tensio-récépteurs, l'information de la sensation de besoin est transmise au cortex cérébral, qui va créer la perception consciente du besoin d'exonérer(de Calan et al., 2004).

La fréquence élevée des troubles ano-réctales peut être expliquée par la complexité des mécanismes concourant à leur accomplissement. Certainement, la défaillance de l'une des structures musculaires ou nerveuses conduira à la perturbation de l'ensemble des séquences motrices. Ces dysfonctionnements sont à l'origine de deux grands symptômes, l'incontinence et la constipation par défaut d'évacuation (Bouvier, 1991).

B. Histologique

La paroi rectale est constituée de dedans en dehors de 4 couches (Fig. 5) (CoPath, 2013):

- la muqueuse (épithélium, chorion, musculaire muqueuse) : constituée de cryptes ou glandes dites « de Lieberhun »

- la sous muqueuse : c'est un tissu conjonctif vascularisé, constitue un réseau de nerfs sympathiques

- la musculeuse : constitué d'une couche d'une couche circulaire interne et une couche longitudibale externe

- la sous séreuse : présente seulement au niveau du haut rectum, il n'existe pas au niveau du moyen et du bas rectum (absence du péritoine), le tissu adipeux au-delà de la musculeuse est nommé mésorectum.

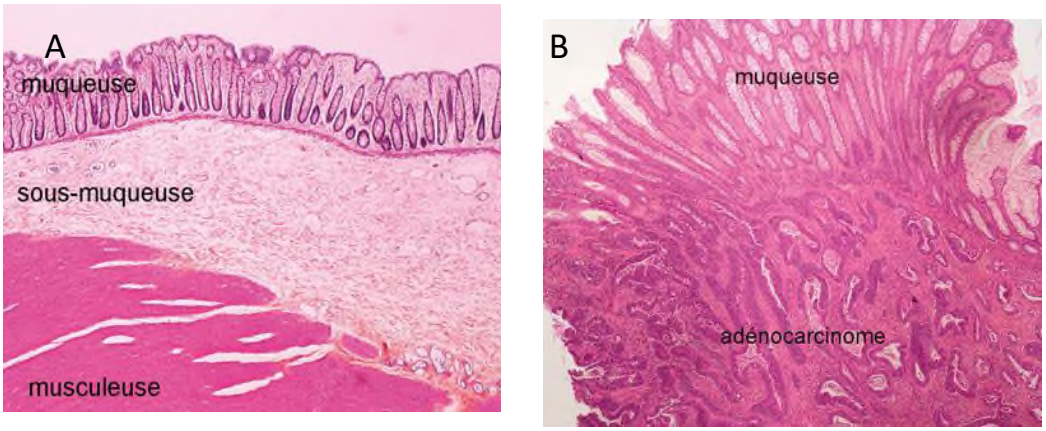


Figure 5 : Aspect histologique de la paroi colique A. HESx250. Histologie élémentaire de la paroi colique B. HES x250. Adénocarcinome lieberkuhnien avec infiltration de la sou-muqueuse (http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique)

II. Epidémiologie du cancer du rectum

1. Epidémiologie descriptive

1.1 Fréquence des cancers colorectaux

Le cancer colorectal représente en 2018 le quatrième cancer en terme d'incidence, après le cancer du sein, de la prostate, et du poumon, avec un taux de 19.7 par 100000 chez les deux sexes et à tout âge (Bray et al., 2018). Le nombre de nouveaux cas estimé en 2018 dans le monde a été de 704.376 nouveau cas (3.9 % de tous les cancers) et de 310.394 décès attribué à cette pathologie (Arnold et al., 2017).

En France l'incidence ajusté pour l'âge du cancer CCR représente 25.2 nouveaux cas par 100000 habitants en 2018 pour les deux sexes, il est classé le troisième cancer après celui du cancer de la prostate et du sein ("Cancer today," 2018.). l'incidence du CCR en chine est approximativement 37.6 nouveaux cas par 100,000, avec un taux de mortalité de 19.1 par 100,000 (Chen et al., 2016).

De très de fortes variations d'incidence du cancer colorectal entre les différentes régions du monde ont été remarquées. L'incidence des cancers colorectaux est la plus élevée chez les deux sexes, dans les pays industrialisés des régions d'Amérique du Nord (Etats-Unis et Canada), Australie, Nouvelle Zélande et plus récemment au Japon. L'incidence la plus faible se produit en Asie, dans des pays comme l'Inde et le Thaïlande, en Amérique du Sud, et en Afrique (Cao et al., 2009; Deng, 2017).

Au Maroc dans la région de Fès le cancer colorectal occupe la première place parmi les cancers digestifs et représente 8.3 % de tous les cancers (Chbani et al., 2012). Une autre étude a été réalisé dans la région de Oujda et a montré que le cancer colorectal est le troisième cancer dans cette région (8,16%) après le cancer du sein et de l'utérus et représente le premier cancers digestifs avec un taux de 48.34% (Elidrissi Errahhali et al., 2017).
30 % cent des cancers colorectaux sont diagnostiqués au niveau du rectum (Ferlay et al., 2007). 1815 (3.77%) nouveaux cas en été enregistrés en 2018 selon Globocan 2018, avec 1139(3.89 %) cas de décès (http://gco.iarc.fr/).

30 % cent des cancers colorectaux sont diagnostiqués au niveau du rectum (Ferlay et al., 2007). 1815 (3.77%) nouveaux cas en été enregistrés en 2018 selon Globocan 2018, avec 1139 (3.89 %) cas de décès (http://gco.iarc.fr/).

1 .2. Répartition selon l'âge et le sexe

Au Maroc le cancer colorectal est marqué par une prédominance masculine, son incidence est de 12.2 par 100.000 chez les hommes avec une mortalité de 7.7 par 100.000, alors que chez les femmes elle est de 9.8 par 100 .000 et une mortalité qui atteint 5.4 par 100.000 (Cancer today, 2018) (Fig. 6).

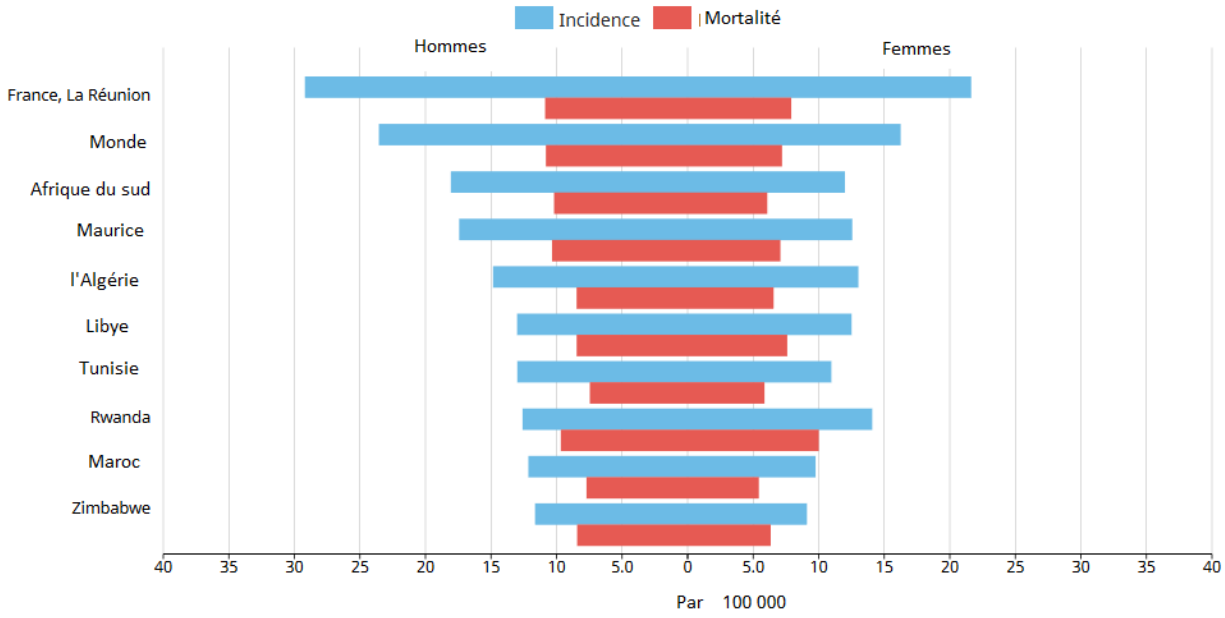


Figure 6 : Incidence estimée et taux de mortalité normalisés du cancer du rectum selon l'âge (dans le monde) en 2018, tous âges (Globocan 2018,http://gco.iarc.fr/today/online-analysis-dual-bars)

L'étude de Chbani et al a montré que les hommes sont plus atteints d'un cancer colorectal que les femmes avec un sex ratio qui varie entre 1.4 et 2.2, et représente le troisième cancer masculin (8%) et le quatrième cancer féminin (7.79%) (Chbani et al., 2012).

Selon le registre du cancer de l'année 2005 de la ville de Rabat, le cancer du rectum représente le deuxième cancer digestif en terme de fréquence après celui de l'estomac, l'âge moyen des

malades est de 51,9 ans chez les hommes et 49 ans chez les femmes. L'incidence du cancer du rectum augmente avec l'âge et est maximale entre 55 et 64 ans chez l'homme et entre 65 et 74 chez la femme (Tazi et al., 2013; TAZI et al., 2009). A Fès une étude réalisée au CHU HASSAN II, a montré que dans 18 % des cas, l'âge des patient a était inférieur à 40 ans (Chbani et al., 2012).

2. Epidémiologie analytique

Les cancers du côlon et rectum partagent les mêmes facteurs de risques et sont multiples, permettent la répartition de la population en trois catégories selon que le niveau de risque soit moyen, élevé ou très élevé. Cela a permis d'établir des stratégies de dépistage en fonction du niveau du risque.

- **Les personnes à un niveau de risque moyen :** sont les personnes de la population générale qui ont plus de 50 ans (94 % des CCR apparaissent après l'âge de 50 ans).
- **Les personnes à un niveau de risque élevé :** sont les patients qui ont un antécédent personnel de de CCR ou de polype adénomateux, les personnes qui ont un parent du premier degré avec un CCR diagnostiqué avant l'âge de 60 ans ainsi que les patients qui ont une maladie inflammatoire chronique de l'intestin (MICI) (maladie de Crohn colique et rectocolite hémorragique) (15 à 20 % de la population) (Devesa et al., 1995).
- **Les personnes à un niveau de risque très élevé** : sont les patients qui ont une prédisposition héréditaire au CCR. Les deux principales entités sont le syndrome de Lynch et les polyposes adénomateuses familiales (PAF et PAF atténuée) (1 à 3 % de la population) (Saurin, 2008).

En plus de ces facteurs l'obésité et les facteurs environnementaux jouent un rôle important dans l'apparition du cancer colorectal.

L'obésité :

Des études récentes indiquent que l'obésité est liée au cancer colorectal, une augmentation de la corpulence de 5 kg/m2 est associée à une augmentation du risque relatif des cancers colorectal chez l'homme à tout âge, que chez la femme préménopausée, L'obésité viscérale du syndrome métabolique ou du diabète de type II, représente aussi un facteur de risque. Une réduction

pondérale durable et la poursuite d'une activité physique régulière sont de nature à réduire l'incidence du CCR (Moghaddam et al., 2007; Schlienger et al., 2009).

Facteurs environnementaux :

Une étude réalisée a montré que l'usage du tabac était associé à une augmentation du risque de cancer colorectal, le risque de décès par cancer augmente avec le nombre de cigarettes fumées (Botteri E.et al .2008) . D'autant plus La consommation d'alcool augmente de façon significative la probabilité de cancer ou d'adénome, principalement lorsqu'elle est quotidienne. Une méta-analyse réalisée à partir des cohortes nord-américaines et européennes a montré que le risque relatif de cancer colorectal s'élève au-delà de 45 g d'alcool/j (Cho, 2004). En 2007, le Centre international de recherche sur le cancer (CIRC) a déclaré qu'il y avait suffisamment de preuves étayées pour déduire que l'alcool est un facteur causal du cancer colorectal (Claudio P et al. 2011).

Un groupe international d'experts a permis de conclure que la consommation de viande rouge et de viandes transformée augmente de manière importante le risque de cancer colorectal (Fund and Research, 2007). Plusieurs mécanismes biologiques ont été suggérés pour expliquer l'association des viandes rouges et transformées au colorectal cancer, dont l'un de ces mécanismes est l'effet mutagène potentiel des amines hétérocycliques (HCA) contenues dans la viande cuite à haute température (Sinha et al., 1994).

Une étude européenne a montré que la consommation d'ail, de lait, de calcium et de fibres alimentaires est considérées comme un facteur protecteur contre le cancer du rectum(Murphy et al., 2012).

III. Les aspects cliniques et paracliniques du cancer du rectum

1. Signes cliniques

Le recueil des informations, par l'interrogatoire, sur les antécédents personnels du patient est nécessaire. Une procédure diagnostique est indiquée chez les patients présentant les symptômes suivants (CSG5, 2004; Hamilton and Sharp, 2004) :

- **A tout âge**: Apparition de rectorragies avec une augmentation ou une diminution de la fréquence des selles s'étalant sur une période de six semaines et/ou la perception d'une masse abdominale palpable et/ou une anémie ferriprive sans cause manifeste.
- **Au-dessus de 60 ans** : Des rectorragies avec ou sans symptômes ou une augmentation ou une diminution de la fréquence des selles.

Généralement les circonstances révélatrices peuvent être : des rectorragies, un syndrome rectal (faux besoins impérieux et fréquents avec émissions afécales de glaires et de sang, épreintes, ténesme), une constipation ou une diarrhée récentes, plus rarement une occlusion, une anémie, et la découverte de métastases(Hamilton and Sharp, 2004).

Les antécédents familiaux du patient doivent également être recueillis. En vue de déterminer les groupes à haut risque (CSG5, 2004). Les patients chez qui l'on suspecte une forme héréditaire doivent être orientés vers un service d'oncogénétique en vue d'une enquête familiale (Kerr, 2003).

2. Le diagnostic clinique

2 .1. Le toucher rectal (TR)

En décubitus dorsal, cuisses fléchies en demandant au malade de pousser pour mieux explorer la face postérieure et la partie haute du rectum, Il évalue la distance de la tumeur par rapport à la marge anale et à la sangle pubo-rectale, évalue également le tonus et contraction volontaire de l'appareil sphinctérien par palpation, et explore la moitié inférieure du rectum. La taille de la tumeur est mesurée en cm. Le TR apprécie également le caractère macroscopique ulcéré, ulcéro-bourgeonnant ou infiltrant de la tumeur. Il apprécie également la mobilité de la tumeur par rapport aux plans pariétaux profonds avec une fiabilité de 68% à 83% (Pessaux et al., 2001), une fixation pariétale évocatrice d'une résection R2 (Dumont F, 2014). Toutefois à cause de la variation de la longueur du canal anal (3 à 5 cm) l'évaluation de la distance entre la tumeur et la marge anale reste peu fiable (Dumont et al., 2015). Un examen clinique complet sera demandé en fonction de la pathologie suspecté, et de l'état général du patient. c'est un examen clé pour apprécier la réponse clinique(Cotte E, et al, 2019).

3. Le diagnostic paraclinique

3.1. Rectoscopie au tube rigide

Permet l'exploration du rectum jusqu'à la charnière recto-sigmoïdienne, peut être réalisée sans préparation ou après une préparation par mini lavement, cet examen est limité par la douleur, et une biopsie rectale est réalisée. Elle mesure avec précision la distance entre le pôle inférieur de la tumeur et la marge anale (Dumont F, 2014), et apprécie l'extension circonférentielle, et l'aspect de la lésion.

3.2. La coloscopie sous anesthésie générale

C'est un examen permettant le diagnostic étiologique des rectorragies. Complétée par une rectoscopie rigide, en même temps anesthésique, afin d'éliminer le risque d'erreur dans la mesure de la distance entre le pole inferieur de la tumeur et la marge anale. Dans le cas des tumeurs d'aspects superficielles la prédiction du degré d'invasion et de l'histologie tumorale est possible à l'aide d'une analyse endoscopique fine avec chromoendoscopie classique ou virtuelle (Ferlitsch et al., 2017).

3.3. L'echoendoscopie rectal (EER)

Permet l'exploration précise de l'infiltration tumorale en profondeur dans la paroi rectale, de l'appareil sphinctérien et des organes de voisinage par une sonde endoanale (Fig. 7). Elle utilise une classification uTN qui dérive du TNM (uT1 : infiltration muqueuse et sous muqueuse ; uT2 : infiltration musculeuse ; uT3 : infiltration de graisse périrectale ; uT4 : extension aux organes de voisinage), a une précision du diagnostic allant jusqu'à 87.5% pour l'extension pariétale (Harewood, 2004) et de 62 à 88 % pour l'atteinte ganglionnaire (Pessaux et al., 2001). L'EER est plus efficace dans le diagnostic des tumeurs aux stades précoces T1 vs T2 que les autres examens tel que l'IRM et le scanner. Toutefois l'EER ne permet pas l'exploration de tous le mésorectum (Valentini et al., 2009). Cet examen est limité en cas de la sténose rectale serrée qui interdit l'exploration de la totalité de la tumeur (Pessaux et al., 2001).

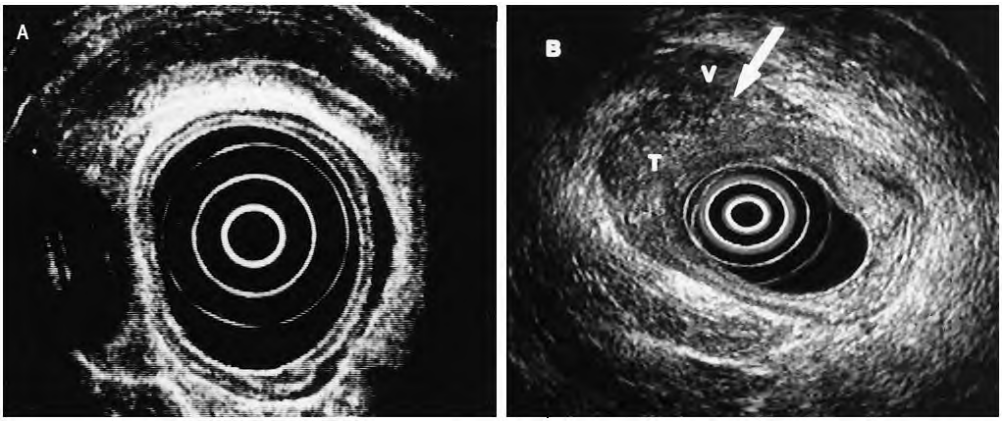


Figure 7 : ***Echographie endorectal A. Paroi rectale normale B. Paroi rectale tumorale, stade uT4. (T: tumeur. V: vessie)****(Pessaux et al., 2001)*

3.4. L'imagerie par résonance magnétique (IRM)

Représente le bilan d'extension du cancer du rectum, réalisée pratiquement dans tous les cas, essentiellement pour les tumeurs localement avancées et de localisation basse. C'est un examen indispensable pour les tumeurs circonférentielles, sténosantes, de stades T3 ou T4 (CSG5, 2004). L'IRM permet de déterminer la localisation de la tumeur par rapport à la marge anale, au bord supérieur du sphincter externe et à la ligne de réflexion péritonéale, mesurer la distance entre le pole inférieur de la tumeur et le bord supérieur du muscle pubo-rectal, déterminer la dimension de la tumeur et sa position dans le pelvis par rapport à la région sacrée et aux organes de voisinages. Il permet également la stadification de la tumeur et des ganglions lymphatiques selon le staging T et N. Après traitement néo-adjuvant, elle permet d'évaluer la réponse tumorale (Patel 2011. Nougaret, 2013).

3.5. La tomodensitométrie par émission de positron (PET-scan FDG)

C'est une imagerie métabolique de médecine nucléaire utilisant le 18F-fluoro-2-deoxy-D-glucose (FDG) comme un marqueur primaire (Kwaan, 2019.), qui a montré un grand intérêt dans le domaine de la cancérologie. C'est un examen qui permet la surveillance avec une grande fiabilité pour détecter les métastases à distance (Lopes et al., 2019). Elle permet d'identifier des images morphologiques douteuses des tumeurs, de différentier les récidives des fibroses post-thérapeutiques. Le PET-TDM est plus performant et sensible que la TDM dans la surveillance

des cancers colorectaux (Soyka et al., 2008). Il permet également une meilleur sélection des patients candidats à une résection curative dans les métastases hépatiques (Sobhani et al, 2008), il est aussi utile en cas d'élévation de l'antigène carcino-emryonnaire (ACE) après récidive chez un patient opéré pour un cancer du rectum.

3.6. La Tomodensitometrie (TDM)

La tomodensitométrie constitue un examen d'exploration à distance. Un scanner du thorax, de l'abdomen et du pelvis (TDM TAP), avec injection de produit de contraste ou, en cas d'insuffisance rénale par scanner thoracique sans injection associé à une IRM abdominale, permet d'estimer le stade de la maladie, à tous les patients chez lesquels un cancer colorectal a été diagnostiqué (CSG5, 2004; Lopes et al., 2019). Sa valeur diagnostique est et de 22 à 73 % pour le status ganglionnaire et de 33 à 77 % dans le cas de l'envahissement pariétal (Pessaux et al., 2001).

3.7. La biopsie

Effectuée à l'aide d'une pince au moment des examens endoscopiques. Ce geste permet de prélever plusieurs fragments millimétriques de la tumeur, en cas de détection d'une lésion suspecte. Il permet de de poser le diagnostic histologique du cancer en plus de la caractérisation histologique (type histologique, degré de différenciation) qui est essentiel pour la prise en charge thérapeutique (F.L.1998).

IV. Mécanismes de la carcinogenèse colorectale

La carcinogenèse du cancer colorectal est un modèle de carcinogenèse multiétapes, impliquant principalement une série de changement histopathologiques, dans 70% des cas il s'agit d'une transformation d'un polype adénomateux préexistant. La plupart des tumeurs colorectales sont des adénocarcinomes (Fig. 8) (Kemp. 2004;Fearon and Vogelstein, 1990). A ce jours il est bien connu qu'une quinzaine de gènes identifiés (des oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeurs) sont impliqués dans les mécanismes de la carcinogenèse colique, leur altération peut être liée à trois principaux mécanismes décrits dans la carcinogenèse colorectale : l'instabilité chromosomique, l'instabilité micro satellitaire, et l'hyperméthylation des ilots CpG (Kemp et al., 2004; Rashid et al., 2001).

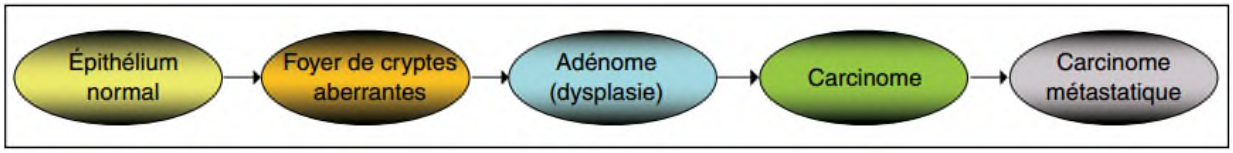


Figure 8 : Séquence de transformation, colon normal-adénome-adénocarcinome (Fearon and Vogelstein, 1990)

1. Les principales voies de signalisation impliquées dans de la carcinogenèse colorectale

La carcinogenèse colorectale est caractérisée par l'altération de quatre voies de régulation : la voie WNT/wingless, la voie de K-ras, la voie du TGFβ et la voie de p53. Différents gènes sont impliqués en fonction de la voie de signalisation en question.

1.1 La voie WNT/wingless (voie APC/β caténine)

60 à 80 % des CCR de phénotype LOH+ (due à une instabilité chromosomique) sont la conséquence d'une mutation située dans le gène APC localisée sur le bras long du chromosome 5 (5q21-q22). La majorité de ces mutations, conduisant à la synthèse d'une protéine tronquée non fonctionnelle après apparition d'un codon stop, se situent dans une région représentant 10% de la séquence codante (NAKAMURA, 1993). Le gène APC a une fonction de contrôle négatif du taux et de l'activité de la β caténine, la mutation du gène APC empêche la formation du complexe cytoplasmique avec la β caténine, cette dernière sera accumulée à l'intérieur de la cellule et aura une action sur la prolifération des cellules tumorales (Fig. 9) (Munemitsu et al., 1995).

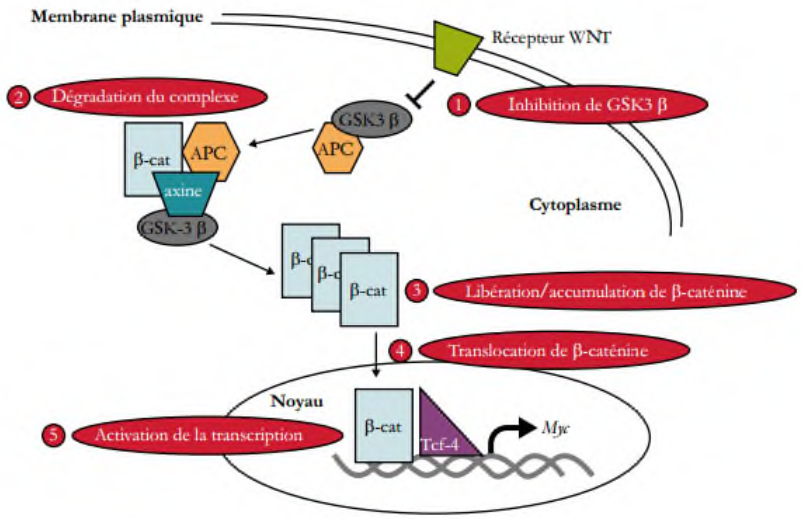


Figure 9 : Activation de la voie de signalisation Wnt impliquant le couple APC/B-caténine *(Laurent-Puig et al., 2010)*

1.2. La voie K-ras et PI3K/Akt

50% des carcinomes colorectaux sporadiques sont liés avec la présence d'une mutation de l'oncogène K-ras. trois isoformes sont décrits dans la famille des gènes RAS : HRAS (11p15,5), NRAS (1p13,2), et KRAS (12p12,1), chacun de ces gènes code pour une protéine de 21 kDa appelé $p21^{ras}$, ces protéines, situées dans la face interne de la membrane cytoplasmique, jouent un rôle dans la transduction du signal du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Les protéines RAS font partie de la famille des GTPases, et jouent un rôle important dans la régulation de la prolifération, de la survie, de la différenciation et de la migration cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse grâce à la transmission de signaux extracellulaires provenant des récepteurs membranaires vers le noyau (Lievre and Laurent-PUIG, 2010; Yang et al., 1998).

La majorité des mutations du gènes KRAS sont localisées au niveau du codon 12 et 13 de l'exon 2 (Tableau 1) (BOS, 1988), des études ont suggérées que la dysplasie ne pourra avoir lieu qu'en cas d'association des mutations des deux gènes KRAS et APC, vue que les mutations du gène KRAS isolées ont été rapportées dans la muqueuse colique normale (Liang et al., 1999) (Fig. 10).

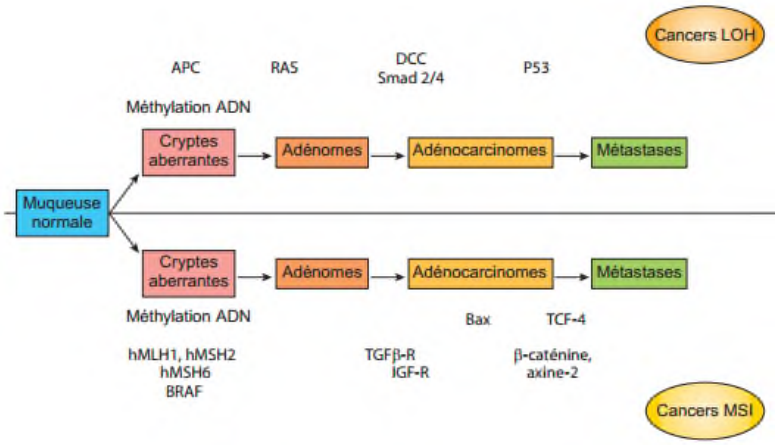


Figure 10 : Séquence Adénome-Adénocarcinome avec les différentes altérations génétiques (Aparicio, 2007)

Dans plus de 90 % des cas, ces mutations concernent, l'acide aminé glycine des codons 12 et 13 par contre l'acide aminé glutamine du codon 61 est rarement touché (Tableau 1) (Jo et al., 2016).

Tableau 1 : Les mutations du gène KRAS les plus fréquentes sur les codons 12 et 13 de l'exon 2 (LIEVRE and LAURENT-PUIG, 2010)

Codon	Base	Mutation	Substitution d'acide aminé
12	1	GGT →CGT	G12R
12	1	GGT →TGT	G12C
12	1	GGT →AGT	G12S
12	2	GGT →GCT	G12A
12	2	GGT →GTT	G12V
12	2	GGT →GAT	G12D
13	2	GGC →GAC	G13D

A :Alanine, **C** :cystéine, **D** :Aspartate, **G** :Glycine, **R** :Arginin, **S** :Sérine, **V**: Valine

L'activation acquise de la voie RAS/MAPK en aval de l'EGFR est due à la présence de telles mutations au niveau tumoral, et totalement indépendante de la fixation du ligand à ce dernier, ce qui confère aux cellules tumorales une résistance aux anticorps antiEGFR dans les cancers colorectaux (Fig. 11) (Lievre et al., 2008).

Concernant les protéines de la famille RAF-1, la mutation du gène BRAF est la seule décrite. 20 % des cancers colorectaux ont été associées à la présence d'une mutation ponctuelle de ce gène, cette mutation unique, localisée au niveau du codon 600 (V600E) provoque une substitution d'une valine en un acide glutamique (Davies et al., 2002). Ces mutations sont exclusives des mutations du gène KRAS. elles surviennent plus fréquemment dans les cancers de type microsatellite instables (MSI) que dans les cancers LOH+ avec perte d'hétérozygotie dans les cancers colorectaux (Davies et al., 2002; LIEVRE and LAURENT-PUIG, 2010).

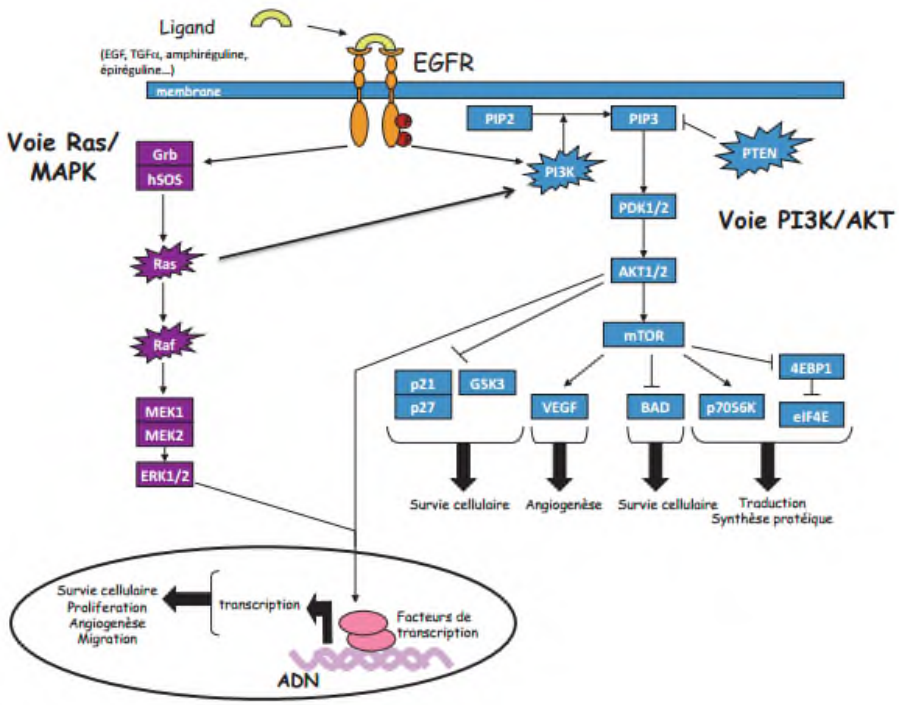


Figure 11 : Activation des voies RAS/MAPK et PI3K/AKT((Lievre et al., 2008)

La voie de la PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) est une voie de signalisation intracellulaire, impliquée dans la voie de signalisation Akt, par sa fonction de régulation de l'apoptose, de la croissance et du cycle cellulaire, ainsi que de l'angiogenèse, elle joue un rôle-clé dans l'homéostasie cellulaire (DREYER et al., 2009).

La voie RAS/MAPK, avec la voie PI3K /AKT, constitue une des voies de transmission du signal les mieux connues conduisant, à la mise en jeu de facteurs de transcription capables d'activer la transcription de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire, dans l'invasion et la migration cellulaire, la survie cellulaire et dans l'angiogenèse, après une cascade de phosphorylations successives. Parmi les principaux récepteurs de facteurs de croissance capable d'activer la voie RAS/MAPK, on trouve l'EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor) et les autres membres de la famille HER, le FGFR (Fibroblast Growth Factor Receptor), l'IGFR (Insulin-like Growth Factor Receptor) et le PDGFR (Platelet Derived Growth Factor Receptor) (Fig. 12) (BOS, 1988; LIEVRE and LAURENT-PUIG, 2010).

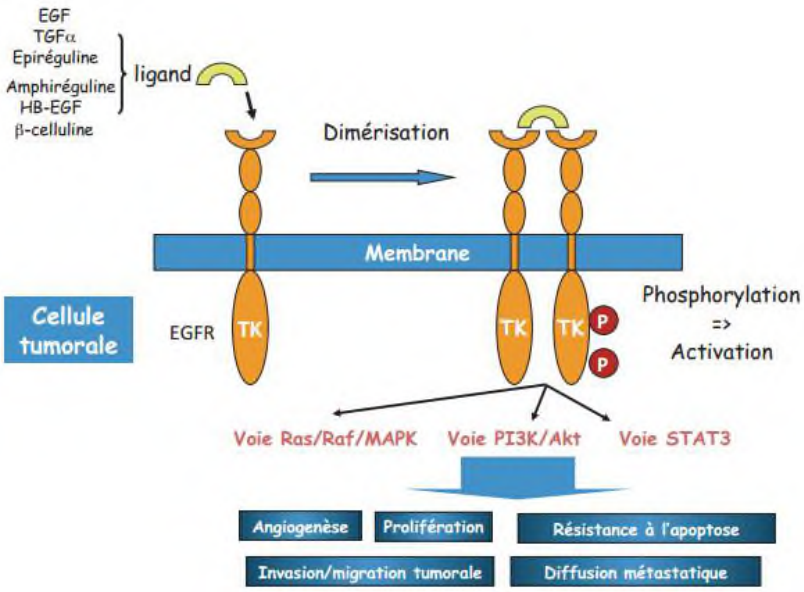


Figure 12 : Activation des voies de signalisation intracellulaire

(LIEVRE and LAURENT-PUIG, 2010)

1. 3. La voie du TGFβ (Transforming Growth Factor)

SMAD4/DPC4 (Deleted in Pancreatic Carcinoma), et SMAD2 sont deux gènes suppresseurs de tumeurs identifiés sur le bras long du chromosome 18 (18q21) et qui surviennent tardivement dans le processus de transformation adénome-carcinome (PIARD et al., 2002). L'activation du TGFβ, conduit à la phosphorylation de SMAD2 et à la formation d'un hétérodimère avec SMAD4, ce complexe SMAD2/SMAD4 induit la transcription de gènes qui inhibent le cycle cellulaire, après sa translocation à l'intérieur du noyau (Fig. 13) (Hahn et al., 1996).

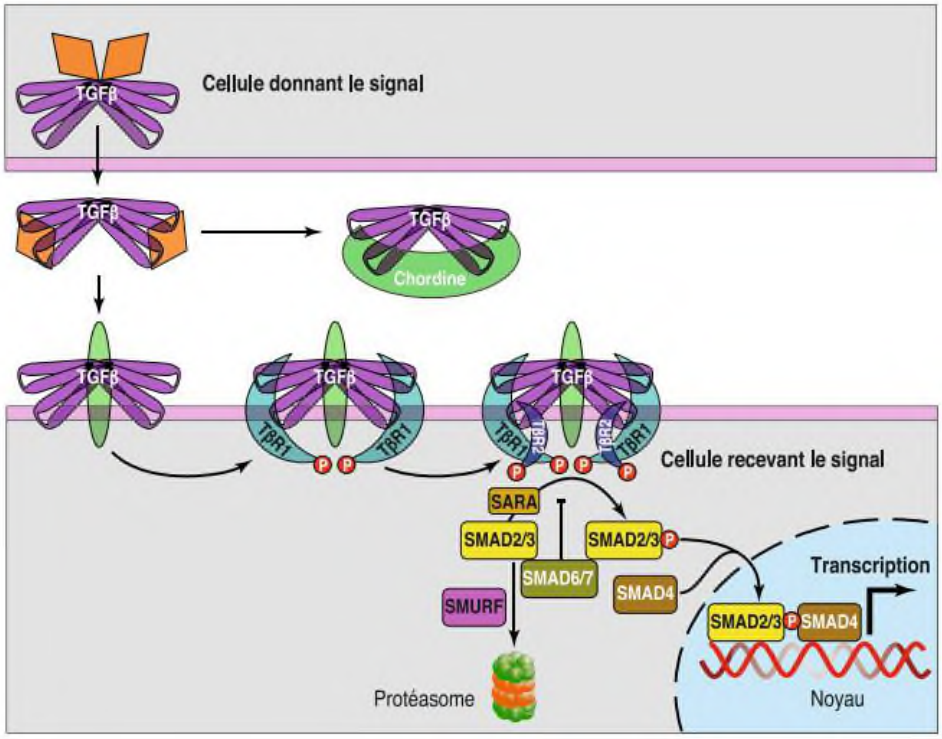


Figure 13 : Activation de la voie TGFβ (Robert, 2010)

1.4. La voie p53

TP53 est un gène suppresseur de tumeurs localisé au niveau du bras court du chromosome 17 (17p). En cas de lésions de l'ADN, la protéine p53 intervient pour bloquer le cycle cellulaire dans la phase G1/S, par le mécanisme d'induction de la transcription du gène inhibiteur du cycle cellulaire CIP/WAF1, pour activer les mécanismes de réparation de l'ADN avant que la cellule se divise (Fig. 14). D'autant plus elle joue un rôle important dans le phénomène de la mort cellulaire programmé (apoptose), et occupe la fonction du « gardien du génome »(Lane, 1992). La présence des mutations dans le gène TP53 représente un facteur de mauvais pronostic. 50% des mutations sont fréquentes dans les cancers colorectaux LOH+(Westra et al., 2005).

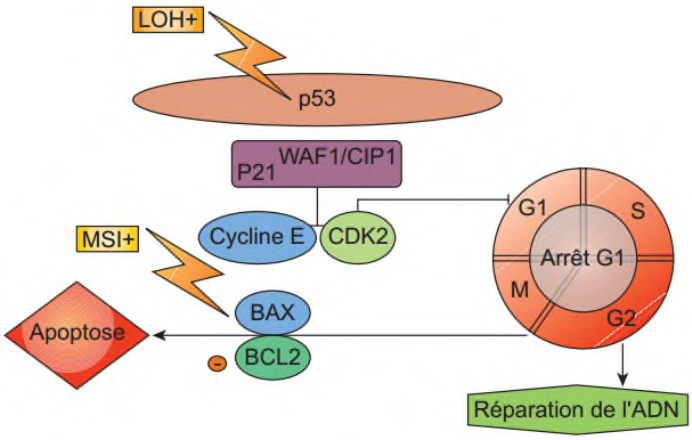


Figure 14 : Activation de la voie p53 impliquée dans la carcinogenèse (Robert Jackes, 2010)

1.5. Chronologie d'apparition des altérations génétiques

Les cancers de phénotype CIN sont caractérisés par l'activation des étapes précoces de la carcinogenèse colorectale, dont en peut citer les altérations dans les gènes APC et KRAS. La formation des foyers des cryptes aberrantes s'accompagne de l'apparition des mutations de KRAS, tandis que celles du gène APC surviennent parallèlement à l'apparition de la dysplasie dans les foyers de cryptes aberrantes. La mutation du récepteur de type II du TGFβ est la plus précoce parmi les mutations des gènes ciblés par le MSI.

Les pertes alléliques, ainsi que les mutations des gènes suppresseurs de tumeurs tel que TP53, SMAD2, SMAD4 caractérisent les altérations survenant tardivement au moment de la transformation adénome-carcinome (Laurent-Puig et al., 2010).

2. Classification des mécanismes génétiques responsables de la progression tumorale dans le CCR

2.1. Instabilité chromosomique (IC)

Responsable de 85% des cancers sporadiques, caractérisée par une aneuploïdie évoquant une instabilité chromosomique, conséquence des pertes ou des gains de chromosomes entiers ou des fragments de chromosomes (Grady, 2004). Appelé aussi LOH (pour Loss of heterozygoty), Des gènes suppresseurs des tumeurs ont été localisés dans les régions chromosomiques délétées, tel que le gène *APC* sur le bras long du chromosome 5q21(37%), *p53* sur le bras court du chromosome 17p13.1(75%), *DCC, SMAD2*, et *SMAD4* sur le bras long du chromosome 18q21(Ried et al., 1996). L'instabilité chromosomique est observée dans la majorité des adénomes, dont la mutation du gène suppresseur de tumeur APC (Adenomatous Polyposis) est la plus précoce, pour cela elle est lié à la carcinogenèse colorectale au moment des stades précoces (Rajagopalan et al., 2003).

La polypose Adenomateuse familiale (PAF)

Une transmission autosomique dominante à pénétrance élevée dans le gène APC est responsable de l'apparition de cette maladie héréditaire, et est responsable de 1% des CCR. Le phénotype de la maladie est lié au niveau de la mutation sur le gène (DE LA CHAPELLE, 2004)**.** Ces cancers sont tous de phénotype LOH + et se caractérise par la présence de centaines à milliers d'adénomes disséminés tout au long du colon et du rectum, et qui se transforment en cancers avant l'âge de 40 ans, affectant aussi bien l'homme que la femme (Fig.15) (PENNA, 2002).

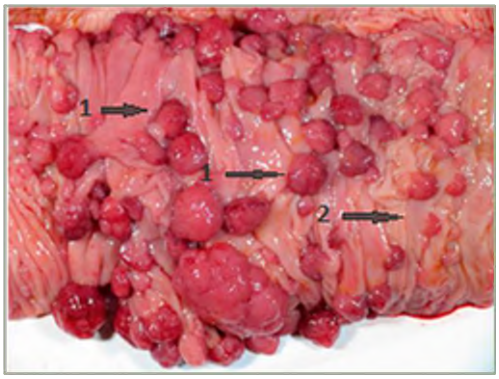


Figure 15 : La polypose adénomateuse colique (Macroscopie)(*"Cours," college francais des pathologistes.)*http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique*)*

1: Polype , 2: Muqueuse macroscopiquement saine

2.2 Instabilité des microsatellites (MSI).

Responsable de 15 % des cancers sporadiques et de la forme familiale du syndrome de Lynch ou le syndrome du HNPCC (hereditary non polyposis colorectal cancer), ne présentant pas d'instabilité chromosomique dans la plupart des cas, par contre elle est liée à une instabilité des microsatellites (MSI pour Micro-Satellite Instability), due à des mutations du système de réparation de l'ADN MMR (mismatch repair)(Monier, 2000). Les séquences répétées mono- à tétra- nucléotiques qui sont largement dispersées dans le génome sont définit comme des **microsatellites.** Au moment de la réplication de l'ADN ces séquences microsatellitaires peuvent subir des erreurs d'appariement (mésappariements) qui sont normalement réparés grâce au système de réparation des mésappariements de bases de l'ADN (DNA mismatch repair ou MMR) (Fig. 16). L'inactivation d'un gène parmi ceux impliqués dans le système de réparation des mésappariements (*MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6*) donne naissance à une instabilité des microsatéllites (Bibeau et al., 2012). Les cancers MSI sont induits par une mutation stabilisatrice de la bêta-caténine responsable de l'altération de cette voie de régulation, en plus de l'inactivation bi-allélique du gène du récepteur type II du TGFβ retrouvé dans 90% des tumeurs MSI type élevé symbolisé par MSI+(Parsons et al., 1995).

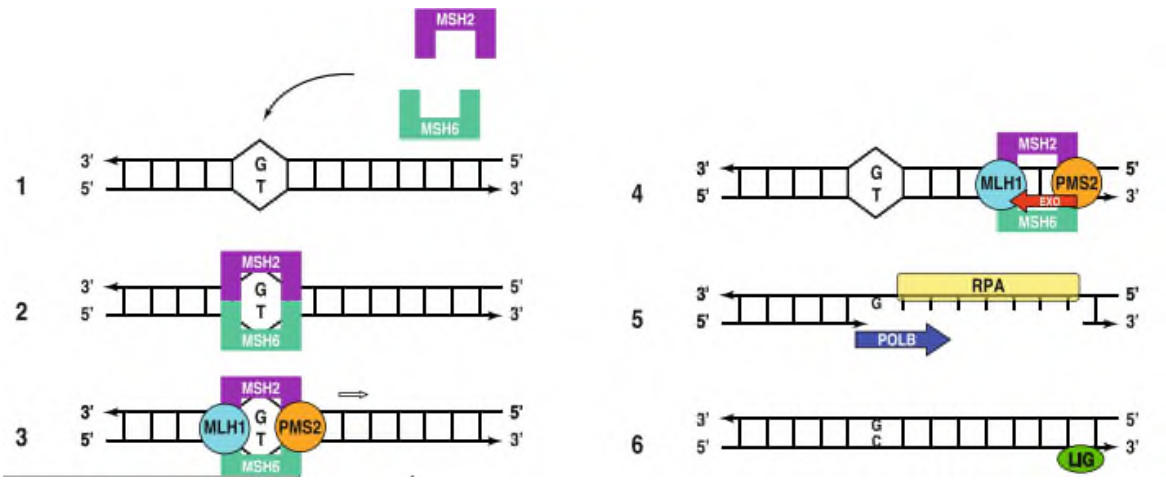


Figure 16 : Système de réparation des mésappariements (MMR) (Robert, 2010)

La figure 16 illustre le mécanisme de réparation des mésappariements (MMR), les protéines MSH2 et MSH6 forment un complexe reconnaissant le mésappariement (exemple ici G/T), cette reconnaissance induit l'intervention de MLH1 et PMS2. Le complexe

tétramérique se déplace par glissement à distance du mésappariement en dégradant le brin par une exonucléase EXO1. Une protection de l'ADN simple brin contre sa dégradation par les nucléases est assurée par une protéine RPA. Ensuite l'ADN polymérase B synthétise le brin complémentaire au simple brin, et une ligase assure la continuité de l'ADN par ligation (Robert, 2010)**.**

Le syndrome HNPCC (herediditary non polyposis colon cancer)

Le syndrome HNPCC représente 3% de l'ensemble des cancers du côlon, caractérisé par une instabilité microsatellitaire (OLSCHWANG et al., 2004; THIBODEAU et al., 1993). Un ensemble de critères cliniques sont nécessaire avant toute affirmation du diagnostic du syndrome de HNPCC, définie par les « critères d'Amsterdam », selon lesquelles, une atteinte de 3 membres de la même famille, d'une association du HNPCC avec d'autres cancers (cancer de l'endomètre, cancer colorectal, cancer du grêle, de l'urètre, du rein ou des voies excréto-urinaires) en plus des critères suivants (OLSCHWANG et al., 2004; Vasen et al., 1999):

- Liaison de parenté entre le malade et les deux autres malades.
- Atteinte d'au moins deux générations successives.
- Apparition du CCR avant l'âge de 50 ans chez l'un des sujets
- Exclusion de la PAF en cas d'un CCR.
- Diagnostic d'un CCR par un examen anotomopathologique.

La présence d'une mutation constitutionnelle sur l'un des gènes MMR, caractérise le syndrome HNPCC ou le syndrome de Lynch, 50 à 70 % des cancers liés au syndrome HPNCC présentent une mutation germinale de hMSH2, et le hMLH1, et rarement le hMSH6 (Aaltonen et al., 1993), une perte allélique ou hypermethylation de la région promotrice, ou mutation ponctuelle sont responsables de l'inactivation de la deuxième copie du gène (OLSCHWANG et al., 2004)(Olayioye et al., 2000)

2.3. Mécanismes épigénétiques

2.3.1. Méthylation de l'ADN

Parallèlement aux mécanismes d'instabilité génétique, plusieurs phénomènes épigénétiques peuvent intervenir dans la carcinogenèse colorectale. L'inhibition de l'expression des cytosines situées sur les ilots CpG des promoteurs riche en dinucléotides CG (cytosine-guanine) est conséquence d'une hyperméthlation des ilots CpG qui est associée à une extinction transcriptionnelle. Ces derniers ne sont pas méthylés habituellement, contrairement aux CG dispersés dans le génome (Rashid et al., 2001). Plusieurs mécanismes épigénétiques qui interagissent entre eux interviennent dans le processus d'inhibition d'un gène portant un ilot CpG à proximité de son promoteur, ces mécanismes sont dépendants d'ADN-méthyltransférase (DNMT) qui catalyse le transfert de groupement méthyles des S-adénosyl-méthionines vers des résidus cytosines (Fig. 17) (Jones and Baylin, 2002). La transformation cellulaire maligne est due à une surexpression de la DNMT-1. Presque 28 à 55 % des cancers colorectaux sont associés à une hypermethylation du gène p16INK4A (Rashid et al., 2001).

Deux types d'anomalies de la méthylation sont observés au niveau des tumeurs. D'une part l'hypermethylation globale sus-décrite retrouvés au stade précoce d'adénome. D'autre part, deux autres types de méthylations nouvellement décrites, la première est connue comme méthylation de type A « pour Age-related-methylation » qui apparait dans les cellules épithéliales normales du colon en fonction de l'âge. Une transformation maligne est due à une altération des gènes impliqués dans la régulation de la différentiation des cellules et leur croissance (KONDO, 2004). La deuxième anomalie est celle du type C qui est cancer spécifique, observée uniquement dans la muqueuse colique anormale(KONDO, 2004).

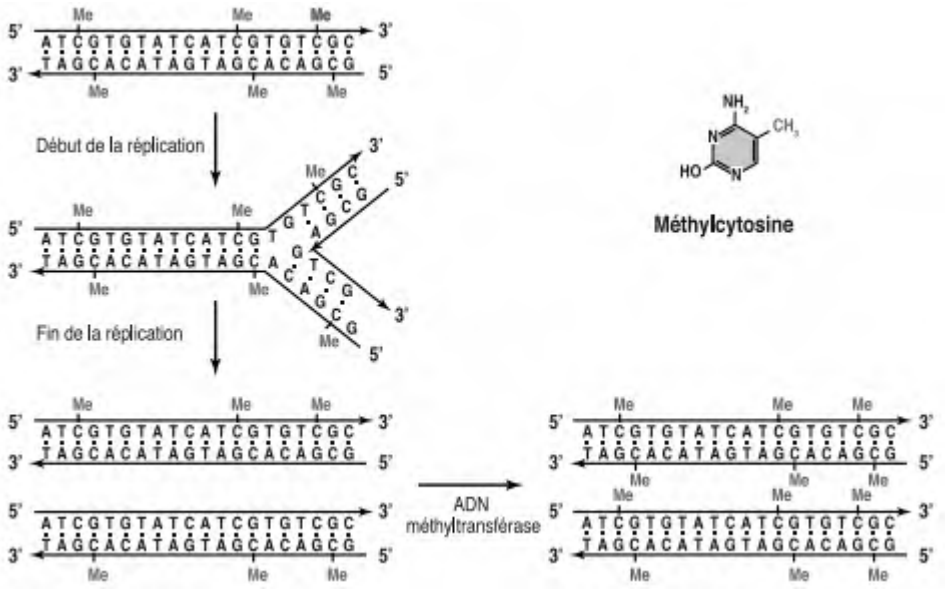


*Figure 17 : **Méthylation de l'ADN** (Robert, 2010)*

3. Intérêt de la recherche des biomarqueurs moléculaires dans les cancers rectaux.

Des études récentes ont été menées sur les tests moléculaires permettant de sélectionner des traitements ciblés et conventionnels pour les patients atteints de cancer colorectal (CCR), et sont standardisés pour devenir une pratique courante pour la gestion des patients atteints de CCR.

3.1 Définition d'un biomarqueur

Le terme biomarqueur prédictif est utilisé pour n'importe quel marqueur moléculaire biologique qu'il soit génomique ou protéomique prédisant une réponse thérapeutique (efficacité, pharmacocinétique, toxicité), ou un diagnostic, ou qu'il soit indicateur d'un mécanisme physiopathologique méconnu (Riou, 2012).

3.2 Intérêt de la recherche des mutations des gènes de la famille RAS, BRAF

Selon les recommandations de la Société Américaine de Pathologie Clinique (ASCO), une mutation RAS (RAS étendu) doit être recherché dans les codons 12 et 13 de l'exon 2, 59, 61 de l'exon 3, et 117 et 146 de l'exon 4 des gène KRAS et NRAS, pour tous patients atteints d'un

carcinome colorectal métastatique, pour lesquels un traitement anti-EGFR est envisagé (Sepulveda et al., 2017).

La Recherche de la mutation V600E dans le gène BRAF (BRAF c. 1799 (p.V600)) sur le tissu tumoral chez des patients atteints d'un carcinome colorectal pour la détermination du pronostic de la maladie.

3.3. Intérêt de la recherche d'une instabilité des microsatellites

3.3.1 Etude de l'instabilité microsatellitaire par immunohistochimie

A la biologie moléculaire s'ajoute l'immunohistochimie utilisée pour la détermination du phénotype MSI (Cawkwell et al., 1999). Grace à l'utilisation des anticorps sur des coupes de tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine, elle permet de détecter une perte de l'expression des protéines MMR, dans les cellules tumorales par rapport aux cellules du tissu normale qui sert comme témoin positif, dans les cancers avec instabilité (MSI+) (Fig. 18) (MARCUS et al., 1999).

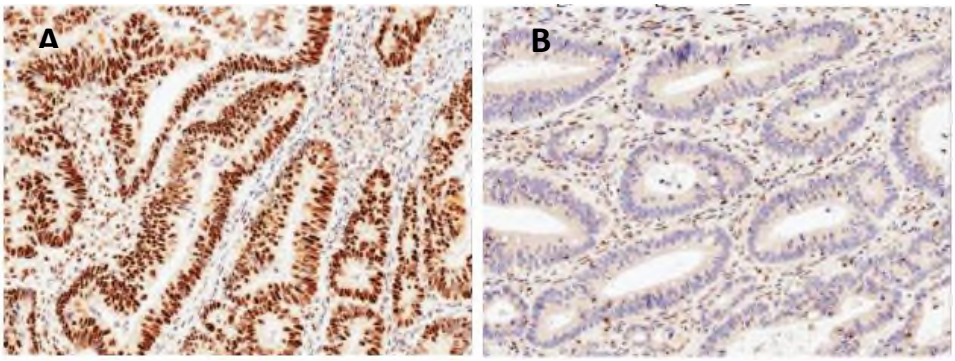


Figure 18 : l'expression du MSH6 par immunohistochimie. A, forte expression nucléaire. B, absence d'expression au niveau nucléaire, témoin interne (lymphocytes) (Huh et al., 2016)

3.3.2. Etude de l'instabilité microsatellitaire par biologie moléculaire

Une instabilité des microsatellites est analysée par des tests de biologie moléculaire après extraction de l'ADN du tissu tumoral et de la muqueuse normale, fixée au formol. L'utilisation d'un panel de 5 régions ciblées par des amorces spécifiques : Bat25, Bat26, NR21, NR24, N4,

27, permet l'amplification par PCR de certaines séquences microsatellites dans les cancers colorectaux (Boland et al., 1998; SURAWEERA et al., 2002). L'analyse se fait par comparaison entre les deux profils du tissu sain et du tissu normal, et la présence d'un allèle de taille différente indique la présence d'une instabilité du locus concerné (Boland et al., 1998). On peut distinguer les tumeurs MSI de type élevé (MSI-H pour MSI-High) présentant une instabilité d'au moins deux de ces marqueurs, et les tumeurs MSI faible (MSI-L pour MSI-Low) montrant une instabilité dans un seul marqueur (Boland et al., 1998). Cette méthode est jugée fiable, par contre elle ne permet pas de déterminer le gène en cause de cette instabilité, seul le séquençage de l'ADN est capable de déterminer les mutations présentes sur les gènes codant pour les protéines de réparation de l'ADN. Cette technique ne peut pas être utilisée dans la pratique courante du diagnostic car elle est longue et couteuse. En effet l'immunohistochimie permet d'orienter vers le gène défaillant à séquencer (perte d'expression de la protéine correspondante)

3.3.3. Intérêt de la détermination du statut MSI dans les cancers rectaux

La détermination du phénotype MSI+ occupe une place de mieux en mieux définie dans la prise en charge des malades atteints de cancer colorectal. Deux caractères doivent être évoqués: le premier consiste à la reconnaissance des cancers se développant dans le cadre d'une prédisposition héréditaire de type HNPCC(BECOUARN et al., 2005), le second concerne la détermination du pronostic des malades atteints de cancers colorectaux et de la prédictibilité de leur réponse à la chimiothérapie.

Des études ont montrées que 70 % de mutations germinales des principaux gènes altérés dans le syndrome HNPCC (hMSH2 et hMLH1) ont été retrouvées chez des malades ayant un phénotype MSI+ dans une population sélectionnée (malades ayant un antécédent familial de cancer colorectal répartit selon l'âge: supérieur à 50 ans et malades de moins de 50 ans)(OLSCHWANG et al., 2004). Pour cela il est recommander actuellement, en cas d'antécédent familial ou personnel de cancer appartenant au spectre étroit carctérisant les tumeurs du syndrome HNPCC, ou chez les malades ayant développé un cancer colorectal entre 40 ans et 60 ans préséléctionnés par immunohistochimie, de rechercher les mutations germinales dans les gènes en cause par biologie moléculaire. Le diagnostic d'une prédisposition héréditaire au syndrome HNPCC est alors discuté en consultation d'oncogénétique après positivité de l'examen. La recherche d'une extinction des protéines hMSH2, hMLH1 ou hmsh6 par immunohistochimie ne peux pas remplacer la biologie moléculaire dans le dépistage de

prédisposition de type HPNCC. En effet, un taux de faux négatifs compris entre 5 et 15 % a été rapporté dans la littérature (phénotype est instable par biologie moléculaire tandis que l'une des trois protéines ne montre pas une extinction), cela peut être expliqué par des problémes liés à la technique de l'immunohistochimie, ou à la présence des mutations faux-sens qui ne provoquent pas d'altérations dans la structure des épitopes (Chapusot et al., 2004).

Une étude récente a montré que l'expression des proeines MMR pourrait être un facteur pronostic indépendant à long terme chez les patients présentant un cancer du rectum et traités par radiothérapie, tandis qu'elle n'a pas montré un intéret prédictif sur la réponse à la radiothérapie (Huh et al., 2016)

L'association entre le statut MSI + et la réponse au 5-Fluorouracile (5-FU) est toujours discutée. Plusieurs travaux expérimentaux ont montré le caractère délétère sur la réponse au 5-FU de lignées présentant un défaut de réparation des mésappariements de l'ADN. En effet cela est probablement expliqué par l'implication des protéines de la réparation des mésappariements dans l'apoptose induite par l'incorporation du 5-FU dans l'ADN nucléaire des cellules tumorales(Tajima et al., 2004). Cependant, les résultats retrouvés en terme de réponse à la chimiothérapie reste controversés, un bénéfice de la chimiothérpie adjuvante chez les malades avec une tumeur MSI+ a été montré dans une étude australienne. Par contre d'autres expériences ont montrés l'absence d'effet de la chimiothérapie adjuvante, après traitement des malades avec un phénotype MSI+, par le 5-FU (CARETHERS, 2004; Moore et al., 2003)

4. HER2 et cancer du rectum

Le gène HER2 (pour human epidermal growth receptor 2) est localisé sur le bras long du chromosome 17 (17q12), (Olayioye et al., 2000). Codant pour une protéine HER2 de type récepteurs aux facteurs de croissance à activité tyrosine kinase, transmembranaire de 185 kD. Ces recepteurs jouent un rôle dans la croissance cellulaire normale et le developpement tissulaire, ainsi que son implication dans le processus de division cellulaire, de différenciation, de survie, de motilité, d'adhérence cellulaire et d'angiogenese (Yarden and Sliwkowski, 2001). L'activation du récepteur par dimérisation ou clivage de son domaine extracellulaire intervient dans la signalisation de la prolifération via les voies de la PI3K / Akt ou de la MAP kinase, ce qui entraîne une croissance, une division et une survie améliorée des cellules. L'utilisation du trastuzumab pour cibler l'HER 2 s'est avéré efficace dans le cancer gastrique et le cancer du

sein, cela a conduit à tester ce médicament ciblant cette molécule dans le cancer colorectal (Bang et al., 2010; Maximiano et al., 2016).

L'expression de la proteine HER2 a été retrouvé dans presque 0.5% à 49.6% des cas du cancer colorectal (Kruszewskia et al., 2010; Meng et al., 2014). Une expression positive classée comme HER2 score 3+ n'a pas été associé avec une bonne réponse thérapeutique après traitement néoadjuvant dans le cancer du rectum localement avancé(Meng et al., 2014).

V. Microenvironnement tumoral

Une approche récente est apparue en cancérologie caractérisant le microenvironnement tumoral comme un parametre extrinséque intérvenant dans la modification du comportement de la cellule tumorale, et faisant part de la définition de la vision « centrocellulaire » (Folkman et al., 2000) . La compréhension des propriétés tumorales a permis d' apprécier l'influence de la composante immunitaire péri- et intratumorale sur le pronostic et l'évolution du cancer.(El Sissy et al., 2017).

1. l'infiltration immunitaire

Le système immunitaire est seul capable d'assurer la reconnaissance et l'élimination des cellules précancéreuses qui sont en voie de transformation cancéreuse (de Guillebon and Tartour, 2015). Cette vision « d'immunosurveillance du cancer » est actuellement démontrée et validée, ainsi qu'elle fait partie d'un concept appellé « l'immunoediting du cancer »(Dunn et al., 2004; Schreiber et al., 2011). Un infiltrat tumoral persistant, polymorphe caractérisent les tumeurs solides, ainsi que leur densité variable en fonction des patients. Il est constitué de cellules immunitaires adaptatitves tels que les lymphocytes B et T portant un récepteur antigénique spécifique et qui sont responsables de la fonction mémoire immunitaire, et de cellules du système immunitaire inné; les macrophages, les cellules dendritiques immatures, les polynucléaires neutrophiles et éosinophiles, les mastocytes, les cellules NK, NK-T, Tγδ, ILC (El Sissy et al., 2017).

2. L'immunoscore

Afin de mettre le point sur le concept du microenvironnement tumoral, la quantification de l'infiltrat immunitaire in situ dans les tumeurs solides à l'aide du test appelé « immunoscore » a été mise en place. L'utilisation de cette méthode a été validé actuellement à l'échelle internationale principalement dans le cancer colorectal (Galon and Bruni, 2019). Cette méthode est basée sur la reconnaissance des CD (les Clusters de différenciation) exprimés sur les cellules immunitaires. Les lymphocytes T CD4 « auxiliaires » ainsi que les lymphocytes T CD8 effecteurs cytotoxiques peuvent se retrouver à des densités différentes au niveau du microenvironnement tumoral. Les Th1 du T CD4 induit le développement des T CD8 cytotoxiques éduquées par des cellules présentatrices d'antigènes tumoraux (Albert et al., 1998).

La reconnaissance de la cellule tumorale par les T CD8 est réalisée grâce à la production de l'IFN-γ produite au cours du processus d'activation des Th1(Pfizenmaier et al., 1985). Par ailleurs les macrophages et les NK sont aussi stimulés par la production de cette cytokine (Smyth et al., 2001). D'autant plus, une meilleure survie sans récidive et une survie globale a été associée à une forte infiltration intratumorale en lymphocytes T CD3+, T CD8+ et T CD45R0+ (mémoires) dans les tumeurs solides (Fridman et al., 2012).

VI. Aspects Anatomopathologiques

1. Rôle de l'anatomie pathologique en préopératoire

La deuxieme conférence européenne de consensus sur le cancer du rectum (EURECA-CC2) a mis le point sur la place de l'anatomopathologiste dans la prise en charge multidisciplinaire adéquate et de son rôle dans la réussite thérapeutique (Valentini et al., 2009).

En effet, l'examen anatomopathologique joue un rôle primordial dans la détérmination du type histologique de la tumeur, du pronostic, da la décision de la prise en charge thérapeutique pré- et/ou postopératoie, qu'il s'agisse de chimiothérapie ou de radiothérapie, et dans la connaissance des mécanismes biologiques de la maladie et des facteurs prédictifs de réponse au traitement (Hu et al., 2011; Valentini et al., 2009).

1. 2 Biopsie

Une biopsie est un prélévement millimétrique de la tumeur rectale dont le but est d'avoir une preuve histologique du cancer avant toute stratégie thérapeutique. Réalisée pendant une rectoscopie, grâce à de petites pinces introduites dans l'endoscope, et ensuite adressée dans un laboratoire d'anatomopathologie pour un examen histopathologique au microscope. Seul un examen anatomopathologique est capable de conclure de façon définitive à la nature des lésions prélevées (Valentini et al., 2009).

2. Prise en charge anatomopathologique de la pièce opératoire

La méthode d'analyse anatomopatholgique dans le cancer du rectum, a pour but principal la classification de la tumeur selon les recommandations intenationnalles (Kirzin et al., 2016). Une estimation du pronostic est donnée par les constatations du pathologiste portées sur les

tumeurs des pièces de résections réctales, et qui va aider le clinicien à la prise en charge ultérieue du patient(De Bari et al., 2012).

2.1 Examen macroscopique

L'examen macroscopique permet de décrire la pièces opératoire (Longueur (cm), distance entre la tumeur et la tranche de section distale), décrire la tumeur (Aspect de la tumeur : bourgeonnante, infiltrante, ulcérobourgeonnante…..), de caractériser les critères d'extension tumorale du rectum et du mésorectum (Adhérence/infiltration d'un autre organe), de repérer les zones les plus informatives, prélever les échantillons suffisants pour l'analyse microscopique (Fig. 19) (Bibeau et al., 2012), et de disséquer les ganglions lymphatique selon les recommandations internationalles(Washington et al., 2009).

L'intégrité du mésorectum est apprécié par l'anatomopathologiste selon qu'il soit complet ou incomplet (Nagtegaal and Van Krieken, 2002; Quirke and Morris, 2007). Le nombre et la taille des polypes sont également détérminés (CoPath, 2013).



Figure 19 : Examen macroscopique d'un cancer du rectum localement avancé

(Frédéric Bibeau et al., 2011)

A : la pièce est ouverte partiellement à l'état frais sans fixation, un segment est laissé intact de part et d'autre de la tumeur, insertion d'une compresse dans la lumière rectale pour faciliter la fixation de la pièce, puis encrage du mésorectum. B : des tranches macroscopiques

sont réalisées afin de sélectionner les parties les plus informatives(Frédéric Bibeau et al., 2011)**.**

2.2. Examen microscopique

2.2.1 Types histologiques

Seuls les types histologiques fréquents et nécessitant un traitement néoadjuvant seron envisagés dans ce chapitre. La classification histologique de référence actuelle est celle décrite par l'OMS qui a été mise à jour en 2019 (Annexe 1) ((Board, 2019).

a. L'adénocarcinome:

Le diagnostic du cancer du rectum du point de vue histologique est simple il s'agit dans 95 % des cas d'un adénocarcinome développé à partir des glandes de Lieberkühn qui ne pose pas de difficulté diagnostique. Différents grades sont définis, en fonction du degré de différenciation variable de la tumeur, et de sa ressemblance avec l'épithélium glandulaire normal et du pourcentage de structures glandulaires (Minamoto et al., 1994; Washington et al., 2009).

- Les adénocarcinomes bien différenciées sont constitués uniquement de structures glandulaires, proches des glandes de Lieberkühn elles sont classées grade 1(G1), (>75% de structures glandulaires) (Fig. 20).

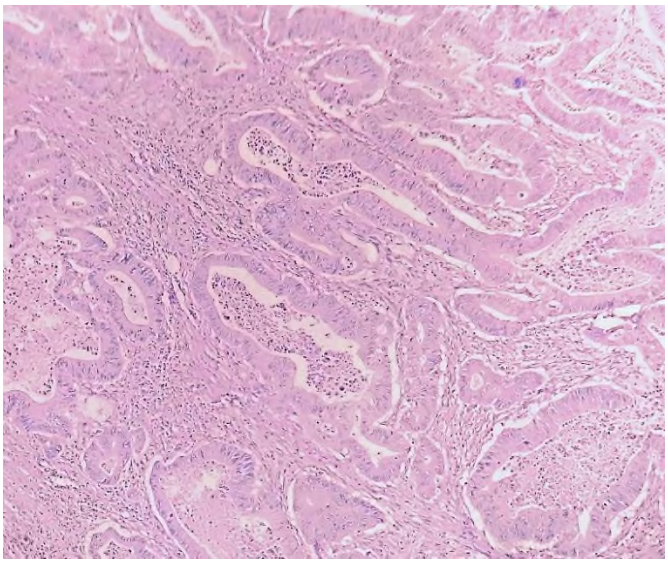


Figure 20 : HES x250. Un adénocarcinome bien différencié et infiltrant (Laboratoire d'Anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

- Les adénocarcinomes moyennement différenciés comportent de nombreuses formations glandulaires (avec lumière) avec la présence des zones plus compactes, font partie du Grade 2 (G2) (25-75% de structures glandulaires) (Fig. 21).

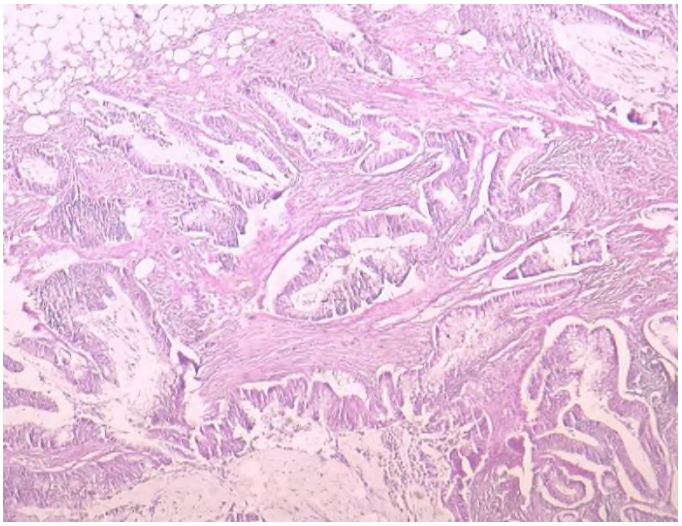


Figure 21 : HESx250. Un adénocarcinome moyennement différencié et infiltrant (Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

- Les adénocarcinomes peu différenciées présentent peu de lumières glandulaires et un stroma qui est souvent réduit (aspect compact), sont classés dans le grade 3 (G3) (Washington et al., 2009) (Fig. 22).

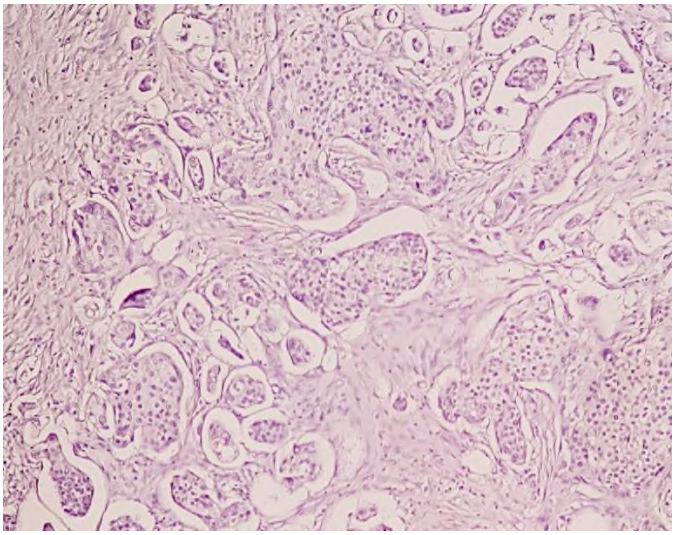


Figure 22 : HESx250. Un adénocarcinome peu différencié (Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

b. L’adénocarcinome mucineux (colloïde)

Cette nomination est utilisée en cas de la présence de larges flaques de mucus dans plus de 50 % de la lésion tumorale. Ce type est caractérisé par des pools de mucine extracellulaire contenant de l'épithélium malin sous forme de structures acineuses, de cellules individuelles ou de bandes de cellules. La plupart des adénocarcinomes mucineux sont caractérisés par une instabilité microsatellitaire de haute fréquence (MSI-H) (Fig. 23) (Aaltonen and Hamilton, 2000; Hamilton and Sharp, 2004).

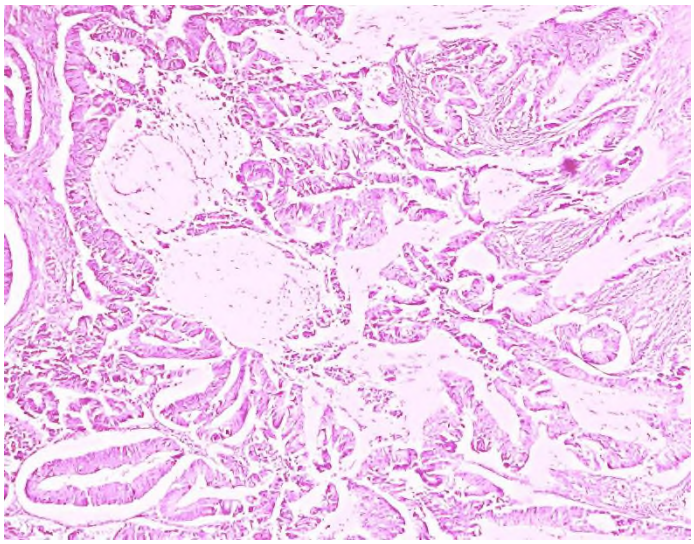


Figure 23 : HESx250. Un adénocarcinome mucineux *(Laboratoire d'Anatomie, CHU HASSAN II, Fès)*

c. L’adénocarcinome à cellules en bague à chaton

Il s’agit de tumeurs très rares. Elles représentent 0.7 % à 2.4% de l’ensemble des carcinomes colorectaux (LAUFMAN and SAPHIR, 1951), Cette variante de tumeur est définit par la présence de plus de 50% des cellules tumorales à mucine intracytoplasmique importante, La cellule contient une grande vacuole de mucine qui remplit le cytoplasme et déplace le noyau (Fig. 24) (Aaltonen et al., 1992.; Hirata et al., 2018; Washington et al., 2009)

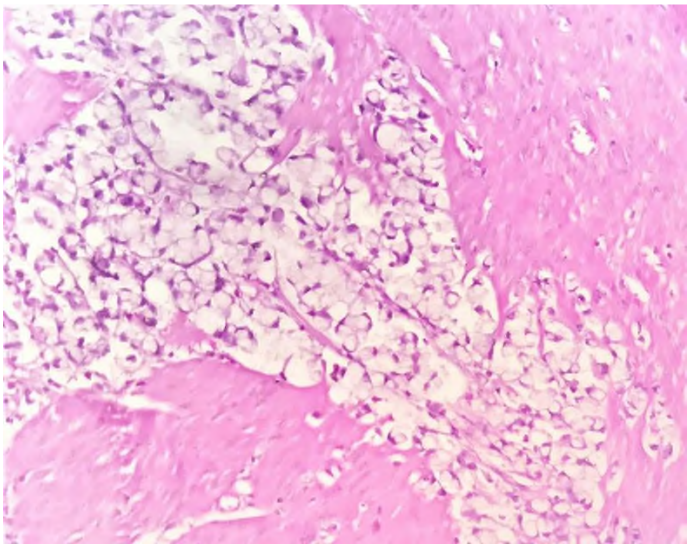


Figure 24 : HESx250. Un carcinome rectal à cellules en bague à chaton (Laboratoire d'Anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

2.2.2 Les facteurs histopronostiques

L'examen anatomopathologique contribue également à la définition des critères nécessaires qui doivent obligatoirement figurées dans le compte rendu final, pour le suivi postopératoire et la décision de prise en charge (Aaltonen et al., 1993).

En plus de la détermination du type hitologique et du degré de différenciation de la tumeur, l'état de la marge distale et de la marge circonférentielle (clairance) de la résection constitue l'un des principaux éléments de l'examen anatomo-pathologique , ainsi que le degré d'intégrité macroscopique du mésorectum, la marge circonférentielle est définit comme étant la distance entre le point d'infiltration maximal et la berge chirurgicale encrée au niveau du mésorectum (Quirke et al., 2009a). Une marge < 2 mm (réséction R1) constitue un facteur prédictif de rechute locale (Frédéric Bibeau et al., 2011; NAGTEGAAL et al., 2011; Nagtegaal et al., 2002).

a. Le curage ganglionnaire

Le statut ganglionnaire doit être précisément évalué car il constitue un critère majeur pour la sélection des patients candidats à des thérapies adjuvantes (De Bari et al., 2012).

Le prélévement de tous les ganglions et tous les nodules du mésorectum est un élément essentiel. En effet les experts américains du collège américain des anatomopathologistes (CAP) et de l'AJCC (American Joint Committee on Cancer) recommande que l'examen d'au moins 12 ganglions régionaux est nécessaire à l'évaluation correcte du statut ganglionnaire. Le réseau

national de lutte contre le cancer (National Comprehensive Care Network, NCCN) propose de revenir sur la pièce opératoire pour compléter son analyse macroscopique si le nombre de ganglions disséqué est inférieur à 12 ganglions (Nagtegaal et al., 2002; NAGTEGAAL et al., 2011).

b. L'invasion vasculaire et l'engainement périnerveux

La présence d'invasion vasculaire et d'engainement périnerveux ont été définit, par analyse multivariée, comme des facteurs de mauvais pronostique (Gospodarowicz MK et al., 2006).

c. L'infiltration lymphocytaire

L'infiltration lymphocytaire dans une tumeur est étroitement associée à l'instabilité des microsatellites, et elle doit être distinguée des lymphocytes péritumoraux semblables à ceux qui sont observés dans les cas de maladie de Crohn (les amas lymphoïdes ou follicules sont trouvés sur les bords de la tumeur et ne devraient pas être interprétés comme étant un ganglion préexistant) (ALEXANDER, 2001). Il a été montré que l'infiltration lymphocytaire est associée à un pronostic favorable (Baxevanis et al., 2013; Rahir and Moser, 2012). En particulier, la présence de lymphocytes T CD8+ dans le microenvironnement de la tumeur représente un bon facteur pronostique chez les patients atteints d'un cancer colorectal (Galon et al., 2006).

d. Stades pTNM

La classification actuelle en vigueur est celle de la 8 eme édition de TNM 2018 (pour Tumor-Nodes-Metastasis) qui suit les recommandations de l'Union Internationale Contre le Cancer (UICC) et la comission américaine du cancer (AJCC), et qui represente la langue principale pour la nomenclature du cancer (Tong et al., 2018).

le 1 er janvier 2018, aux États-Unis, la huitième édition du système de stadification de l'AJCC (AJCC-8) a été mise en œuvre à l'échelle mondiale. Elle a rapporté des modifications importantes en incluant un nouveau stade de classification des métastases péritonéales nommé « stade IVC » pour les patients atteints de CCR, par contre la stadification pT et pN de la 7 éme édition n'a pas été modifiée (tableau 2) (Amin et al., 2017).

Tableau 2 : 7ème et 8ème stadification TNM du cancer colorectal selon la Commission Americaine du cance (AJCC)(Tong et al., 2018)

7 eme edition				8 eme edition			
Stage	**T**	**N**	**M**	**Stage**	**T**	**N**	**M**
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
I	T1-2	N0	M0	I	T1-2	N0	M0
II A	T3	N0	M0	II A	T3	N0	M0
II B	T4a	N0	M0	II B	T4a	N0	M0
II C	T4b	N0	M0	II C	T4b	N0	M0
III A	T1-2	N1/N1c	M0	III A	T1-2	N1/N1c	M0
	T1	N2a	M0		T1	N2a	M0
III B	T3-4a	N1/N1c	M0	III B	T3-4a	N1/N1c	M0
	T2-3	N2a	M0		T2-3	N2a	M0
	T1-2	N2b	M0		T1-2	N2b	M0
III C	T4a	N2a	M0	III C	T4a	N2a	M0
	T3-4a	N2b	M0		T3-4a	N2b	M0
	T4b	N1-2	M0		T4b	N1-2	M0
IV A	tout T	tout N	M1a	IV A	tout T	tout N	M1a
IV B	tout T	tout N	M1b	IV B	tout T	tout N	M1b
				IV C	tout T	tout N	M1c

La détermination du stade ypTNM dans le cancer du rectum doit être effectuée suivant la même démarche que celle effectuée dans le cancer du côlon n'ayant pas reçue de traitement.

Le préfixe « y » signifie qu'un traitement néoadjuvant (radiothérapie, chimiothérapie, ou radio-chimiothérapie) a été appliqué avant la résection de la pièce opératoire. La nomenclature de la classification pathologique est indiquée par « p » (Washington et al., 2009). Le stade ypT désigne le niveau d'envahissement des cellules tumorales viables dans et en dehors de la paroi (tableau 3). Le stade ypN est établit selon l'évaluation des ganglions prélevés (Rullier et al., 2008). pM indique la classification pathologique des lésions distantes dans l'examen microscopique (Tableau 3) (Fig. 25) (Washington et al., 2009).

Tableau 3 : classification pTNM des carcinomes colorectaux (AJCC, 8e édition 2017)

(Glynne-Jones et al., 2018)

TX	Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive
T0	Pas de signe de tumeur primitive
Tis	Carcinome in situ : intra-épithélial ou envahissant la lamina propria
T1	Tumeur envahissant la sous-muqueuse
T2	Tumeur envahissant la musculeuse
T3	Tumeur envahissant la sous-séreuse ou les tissus péri-rectaux non péritonisés
T4	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures et/ou perforant le péritoine viscéral
T4a	Tumeur perforant le péritoine viscéral
T4b	Tumeur envahissant directement les autres organes ou structures[2-3]
NX	Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies régionales
N0	Pas de métastase ganglionnaire régionale
N1	Métastase dans 1 à 3 ganglions lymphatiques régionaux
N1a	Métastases dans 1 ganglion lymphatique régional
N1b	Métastases dans 2-3 ganglions lymphatiques régionaux
N1c	Nodule(s) tumoral, satellite(s)* dans la sous-séreuse, ou dans les tissus non-péritonisés péri-coliques ou péri-rectaux sans métastase ganglionnaire régionale
N2	Métastase dans ≥ 4 ganglions lymphatiques régionaux
N2a	Métastase dans 4-6 ganglions lymphatiques régionaux
N2b	Métastase dans ≥ 7 ganglions lymphatiques régionaux

Tableau 4 : Classification pTNM des métastases dans les cancers colorectaux (AJCC, 8e édition 2017)(Glynne-Jones et al., 2018)

M0	Pas de métastase à distance
M1	Présence de métastase(s) à distance
	M1a : métastases dans un seul organe (foie, poumon, ovaire, ganglion(s) lymphatique(s) non régional(aux)) sans métastase péritonéale
	M1b : métastases dans plus d'un organe
	M1c : métastases dans le péritoine avec ou sans atteinte d'autres organes

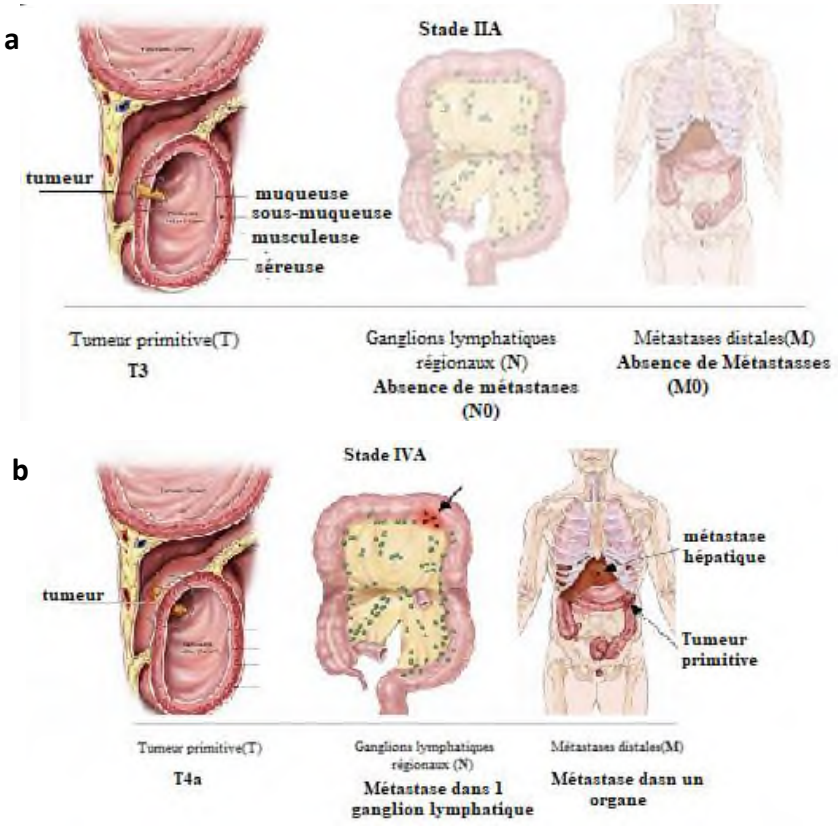


Figure 25 : a. tumeur envahissant la sous-séreuse, absence de métastase ganglionnaire et absence de métastase distale (T3, N0, M0), classée Stade IIA.b. Tumeur perforant le péritoine, présence de métastases ganglionnaires et de métastases distales (T4a,N+,M1a) définissant le stade IVA (ASCO, 2018)

e. Régression tumorale

Le traitement néoadjuvant permet dans presque 8 à 30% des cas une régression du stade tumoral et une réponse histologique complète après destruction des cellules tumorales (Quirke and Morris, 2007). Le downstaging ou réponse pariétale et la réponse cellulaire sont les deux méthodes d'appréciation de la régression tumorale qui permettent d'évaluer la radio et la chimiosensibilité de la tumeur (Frédéric Bibeau et al., 2011). La réponse histopathologique a une valeur pronostic sur le contrôle local du cancer malgré que son appréciation est variable selon plusieurs modèles (Fig. 26) (RÖDEL et al., 2005). La détermination du pourcentage de cellules tumorales résiduelles par rapport aux remaniements cicatriciels post-thérapeutiques, permet d'apprécier d'une manière semi-quantitative la réponse cellulaire, quelle que soit leur localisation dans la paroi rectale(Kim et al., 2016). La classification de Dworak est la plus

ancienne comportant 5 grades qui varient entre l'absence de régression tumorale, une réponse intermédiaire et la réponse complète (Frédéric Bibeau et al., 2011).

La régression tumorale pouvant concerner les ganglions lymphatiques ne font pas partie des modèles de classification actuelle du cancer du rectum. Pour cette raison l'intégration de la régression des ganglions conjointement à celle de la tumeur primitive pourrait mieux refléter l'impact des traitements d'induction, puisque les ganglions initialement métastatiques peuvent aussi présenter des lésions de régression partielles ou complètes (F. Bibeau et al., 2011; Nash et al., 2011).

RCRG original [57]	
RCRG1	Stérilisation complète ou foyers microscopiques résiduels, avec fibrose marquée
RCRG2	Fibrose marquée mais lésion macroscopique présente
RCRG3	Peu ou pas de fibrose, avec lésion macroscopique majeure
m-RCRG [21]	
m-RCRG1	Les aspects macroscopiques peuvent être variés. L'analyse microscopique ne montre pas de résidu tumoral dense, mais peut identifier des foyers de cellules tumorales dispersées représentant moins de 5 % de la zone lésionnelle. Des flaques de mucine peuvent être présentes, mais ne contiennent pas de cellules tumorales.
m-RCRG2	Les aspects macroscopiques peuvent être variés. L'analyse microscopique montre un résidu tumoral et de la fibrose. Le résidu tumoral représente entre 5 et 50 % de la zone lésionnelle.
m-RCRG3	Les aspects macro- et microscopiques sont similaires aux cas pour lesquels il n'a pas été instauré de traitement néoadjuvant. Le résidu tumoral représente plus de 50 % de la zone lésionnelle. De la fibrose peut être présente, mais dans des proportions équivalentes à celles constituant une stroma réaction desmoplastique, lorsqu'aucun traitement néoadjuvant n'a été instauré.
TRG [58]	
TRG1	Absence de cellules tumorales viables
TRG2	Cellules tumorales isolées ou sous forme de petits clusters
TRG3	Fibrose majoritaire avec présence de nombreux foyers tumoraux
TRG4	Zone tumorale majoritaire avec présence significative de fibrose
TRG5	Zone tumorale massive. Absence de fibrose
Système RCPath [59]	
RCPath A	Absence de cellules tumorales résiduelles et/ou flaques de mucus acellulaire
RCPath B	Reliquat tumoral minime (rares foyers tumoraux « microscopiques » difficilement identifiables)
RCPath C	Absence de signe de régression marquée
Grade de Dworak [31]	
Dworak 0	Absence de signe de régression
Dworak 1	Tumeur majoritaire avec fibrose et/ou mucine
Dworak 2	Fibrose ou mucine majoritaire, quelques cellules ou structures tumorales
Dworak 3	Très rares cellules tumorales avec fibrose et/ou mucine majoritaire
Dworak 4	Réponse complète : absence de cellules tumorales, fibrose et/ou mucine uniquement

Figure 26 : la régression tumorale des cancers du rectum après traitement néoadjuvant selon les différentes classifications(Frédéric Bibeau et al., 2011)

RCRG : Rectal Cancer Regression Grading ; **m-RCRG** : modified Rectal Cancer Regression Grading ; **TRG** : Tumor Regression Grade ; **système RCPath** : Royal College of Pathologists system.

VII. Traitements du cancer du rectum

A. Méthodes de traitement

Apres une réunion de concertation pluridisciplinaire entre plusieurs spécialistes, Le meilleur traitement possible est indiqué selon plusieurs paramètres, dont on peut distinguer la distance de la tumeur par rapport à la marge anale, l'envahissement pariétal et ganglionnaire ainsi que la présence de métastases(De Bari et al., 2012). Le risque thérapeutique doit être pris en compte vu que la préservation des fonctions physiologiques post-thérapeutiques est devenue primordiale (Rouanet, 2017). En plus des caractéristiques de la tumeur les caractéristiques du patient (l'indice de masse corporel, l'âge, la surface du mesorectum..) s'imposent pour déterminer les objectifs thérapeutiques et de la stratégie de prise en charge(Rouanet, 2017; Valentini et al., 2009)
Les traitements utilisés pour le traitement du cancer du rectum non métastatique sont : la chirurgie, la radiothérapie (RT), La chimioradiothérapie(CRT) et la Chimiothérapie.

1. Chirurgie

Le pronostic du cancer du rectum est un élément dépendant de la qualité de l'exérèse chirurgicale. Les différentes procédures de la résection rectale varient en fonction de plusieurs paramètres, qui sont le siège de la tumeur, les caractéristiques liées aux patients, l'extension de la tumeur aux organes de voisinage, l'état du sphincter anal et s'ajoute aussi l'expérience du chirurgien.

1 .1. Exérèse carcinologique chirurgicale du cancer du rectum non superficielle

Plusieurs règles d'exérèses carcinologique chirurgicale sont décrites :

- Une proctectomie est réalisée après exploration complète de la cavité abdominale par un bilan complet. La prise en charge ultérieure dépend de l'analyse de la biopsie réalisée sur toutes lésion d'aspect suspecte.
- Une diminution du taux des récidives locorégionales est associée avec l'exérèse extrafasciale du mésorectum. Aussi bien, les séquelles urinaires et sexuelles sont limitées après une résection rectales respectant l'innervation pelvienne (préservation des nerfs autonomes pelviens)(HEALD, 1986).
- les complications nerveuses sont indépendantes des abords coelioscopiques ou robotiques(Jeong et al., 2014).

- Le mésorectum est disséqué avec respect d'une distance de 5 cm sous la limite inférieure d'une tumeur localisée au niveau du haut rectum. Dans le cas d'une localisation tumorale au niveau des deux tiers moyen et inférieur la réséction totale du mésorectum est recommandé(Quirke et al., 2009b). Le qualité de la résection est évalué selon l'absence d'effraction et de segmentation de l'exérèse du méso-rectum, une marge de sécurité distale supérieur ou égale à 1 cm (MOORE, 2003). La marge circonférentielle est un facteur pronostique après chirurgie avec ou sans chimioradiothérapie néoadjuvante.
- Le curage ganglionnaire mésentérique inférieur est possible sans avoir recours à la liaison de l'artère mésentérique inférieur au ras de l'aorte. Tandis que le curage ganglionnaire iliaque n'est pas justifié(Yang et al., 2018).
- La taux de récidive locale et anastomotique est diminuer après réalisation d'un lavage du moignon rectal après clampage du rectum.
- L'utilisation d'une laparoscopie dans l'exérèse rectale peut remplacer la laparotomie dans le cas des tumeurs T1, T2 et T3 faibles on rapportant les mêmes résultats oncologiques(Kang et al., 2010), lorsqu'elle est pratiquée par des spécialistes en chirurgie colorectale. Par contre elle est contre indiquée dans le stade T4, est difficile à réaliser au niveau du tiers inférieur, chez les patients de sexe masculin ainsi que chez les obèses lorsqu'elle est associée à l'exérèse totale du mésorectum(Bell et al., 2018).

1.2. Les indications des types d'exérèses chirurgicales dans cancers du rectum non superficiel.

Les facteurs de sélection des types d'exérèse dépendent du siège de la tumeur, de l'extension locorégionale du cancer, de la marge latérale en IRM, et du patient.

- Haut rectum : une exérèse rectum et de son mésorectum est indiquée jusqu'à 5 cm sous la limite inférieur de la tumeur avec réalisation d'une anastomose colorectale mécanique ou manuelle.
- Moyen rectum : réalisation d'une exérèse complète du mésorectum, et une anastomose colo-anale suivie d'un rétablissement de continuité. Un réservoir colique est réalisé en forme de J d'une longueur de 5 à 6 cm est recommandé (FAZIO et al., 2007)
- Bas rectum : indication d'une exérèse complète du rectum et du mésorectum, avec une anastomose colo-anale protégée avec confection d'un réservoir colique si la marge distale macroscopique est d'au moins 1 cm. Une amputation abdominopérinéale est nécessaire si le

sphincter externe est envahi par la tumeur. La possibilité d'une préservation sphinctérienne est évaluer selon la classification de Rullier des cancers du bas rectum (RULLIER et al., 2013)

1.3 Résection du rectum avec rétablissement de continuité

En cas d'anastomose sous péritonéale il est recommander de dériver temporairement le flux fécale. L'iléostomie à moins de complications péristomiales, avec un rétablissement de continuité digestive, dans les 2 eme- 3 eme semaines, est plus facile à pratiquer comparée à la colostomie (JL. Faucheron, E. Rullie Rapport AFC 2009).

1.4 Exérèse locale (endoscopique ou chirurgicale) des cancers superficiels du rectum

L'exérèse locale curative permettra de préserver le rectum, dans le cas des tumeurs rectales qui risquent d'être superficiel, avec des marges de sécurité latérales et profondes (R0). Cette technique est réalisable dans les cas des adénocarcinomes intra-muqueux purs (T1a), et des adénocarcinomes envahissant la sous-muqueuse superficiel (sm1). Car le pourcentage de risque de métastases ganglionnaires est inférieur à 1 %. En effet cela peut être réalisé grâce à une exploration endoscopique performante basée sur la caractérisation endoscopique de l'aspect macroscopique de la lésion (classification de paris, Kudo 2001), en plus de l'aspect du relief muqueux et vasculaire de surface en chromoendoscopie virtuelle ou classique (classification de NICE, Hayashi 2013).

1.5 L'amputation abdominopérinéale

L'amputation abdominopéritonéale restée pendant longtemps la chirurgie principale des tumeurs rectales avec ces multiples complications. Mais avec l'avènement du traitement néoadjuvant (Radiothérapie, et chimioradiothérapie) a permis de réduire significativement les indications de l'AAP.

En cas d'AAP, une dissection en cône séparant la tumeur des muscles releveurs est évitée après une exérèse tant pelvienne que périnéale. Apres plusieurs essais, on a plus tendance à faire une chirurgie avec conservation sphinctérienne afin d'éviter une colostomie définitive.

2. Radiothérapie (RT) et chimioradiothérapie (CRT)

Les tumeurs rectales sont de nature radiochimiosensibles. La radiothérapie exclusive ou la chimioradiothérapie préopératoires est recommandée (recommandation grade A) par rapport à

la radiothérapie postopératoire en raison d'une meilleure observance, d'une plus grande éfficacité, et mois de toxicité.

2.1. Indications de la radiothérapie

L'apparition de la technique de radiothérapie a permis le control local de la tumeur et la diminution des fréquences des récidives. Une toxicité relative à la radiothérapie peropératoire augmente avec des doses de plus de18 à 20 Gy (De Bari et al., 2012), Une radiothérapie préopératoire peut être proposée en cas d'envahissement pariétal uT3 ou uT4 et/ou en cas d'envahissement ganglionnaire (N+) (Pessaux et al., 2001). En revanche une diminution des rechutes locales après radiothérapie préopératoire courte (25Gy/5 fr) a été observée pour les tumeurs localisées dans les trois tiers du rectum selon l'essai CR07(Sebag-Montefiore, 2009).

Chez les patients âgés ou fragilisés, une radiothérapie exclusive, protocole court de 25 Gy (5 x 5 Gy) est indiquée, suivie d'une chirurgie dans la semaine qui suit ou 6 à 8 semaines plutard (Erlandsson et al., 2017) . Des études ont démontré que la radiothérapie de courte durée offrait un meilleur contrôle local par rapport à l'excision totale seule du mésorectum (Cedermark et al., 1997; Zhan et al., 2013).

2. 2. La chimioradiothérapie préopératoire.

La chimioradiothérapie concomitante est meilleure par rapport à la radiothérapie préopératoire longue, car elle augmente le taux de réponse histologique et diminue de moitié le taux de récidives locales de moitié à 5 ans (8% vs 16%) comme il a été décrit par les essais multicentriques de phase III (Gérard ; 2006), mais avec une toxicité non négligeable.

Elle est indiquée comme traitement néoadjuvant pour tous les patients atteints d'un cancer du rectum localement avancé, afin d'augmenter le taux de résécabilité.

Ce protocole utilise une radiothérapie d'une dose de 45 à 54 Gy, repartit en 1.8 à 2 Gy par séance, avec une fréquence de 5 séances par semaine, en concomitance avec une chimiothérapie à base de 5-Fluoro-uracile, un délai de 6 à 8 semaines est recommandé entre la fin de la radiothérapie et la chirurgie quel que soit le schéma de radiothérapie utilisé (Rouanet, 2017). Son indication est standard pour les tumeurs de stades cT3, cT4 ou N+ discutées en réunion de concertation pluridisciplinaire (Gérard et al., 2010).

Un autre schéma « CAP 50 » est utilisé, en associant 25 fractions de radiothérapie (2 Gy par fraction) étalées sur 5 semaines, avec le capécitabine de 800 mg/m2 matin et soir pendant les jours de la radiothérapie.

L'ajout de l'oxaliplatine aux deux protocoles précités (5FU et Capécitabine) comme une option, n'améliore ni la stérilisation de la tumeur ni les contrôles locales, par contre elle augmente la toxicité locale de grade 3 ou plus. Son ajout est discutable en cas de situation métastatique. Ce schéma de traitement provoque une altération de la fonction sexuelle et digestive, et présente un facteur significatif de morbidité selon des études comparatives réalisées entre un groupe de patients irradié et un autre groupe qui n'a pas reçu d'irradiation (Bregendahl et al., 2013; Qin et al., 2017).

2.3 La radiochimiothérapie comparée à la chirurgie seule

2.3.1 Efficacité sur la survie globale (SG)

Aucun bénéfice en terme de survie globale n'a été observé dans les différentes études qui ont comparés l'efficacité de la RT et CRT préopératoire à la chirurgie seule (Ma, 2017).

2.3.2 Efficacité sur la survie sans Récidive (SSR)

Un bénéfice significatif sur la SSR a été démontré avec la radiothérapie seule avec une dose biologique efficace (DBE) supérieure à 35 Gy (Ma, 2017), par contre aucun bénéfice n'a été observé pour la CRT par rapport à la chirurgie seule.

2.3.3 Efficacité par rapport à la récidive locale (SRL)

Une forte amélioration en terme de survie sans récidive locale est associée à la RT et CRT comparé à ma chirurgie seule (Ma, 2017).

2.3.4 Efficacité sur la survie sans récidive métastatique(SRM)

La RT et CRT n'ont aucun bénéfice sur la SRM comparativement à la chirurgie seule (Ma, 2017).

4. chimiothérapie adjuvante

La chimiothérapie adjuvante est indiquée dans les situations suivantes (Fig. 27) :

- présence de résidu tumorale
- ypT4 avec des ganglions envahis
- Résection R1

- Présence d'Embole vasculaires ou engainement périnerveux (discuté avec experts)
- Absence d'exérèse totale du mésorectum
- Absence de Chimiothérapie (CMT) associé à la radiothérapie (RT) préopératoire.

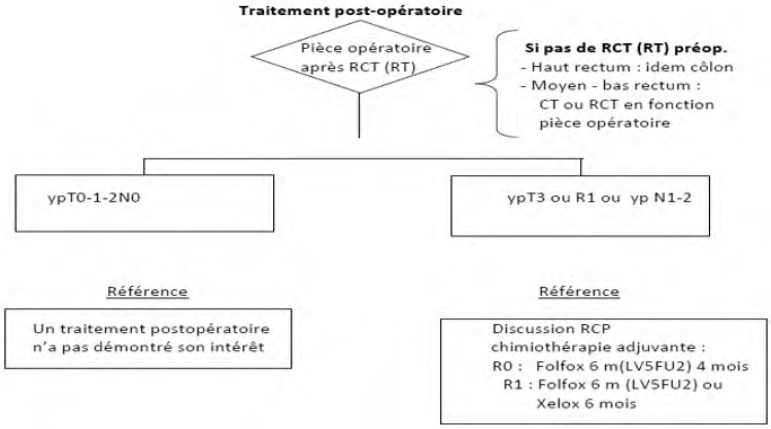
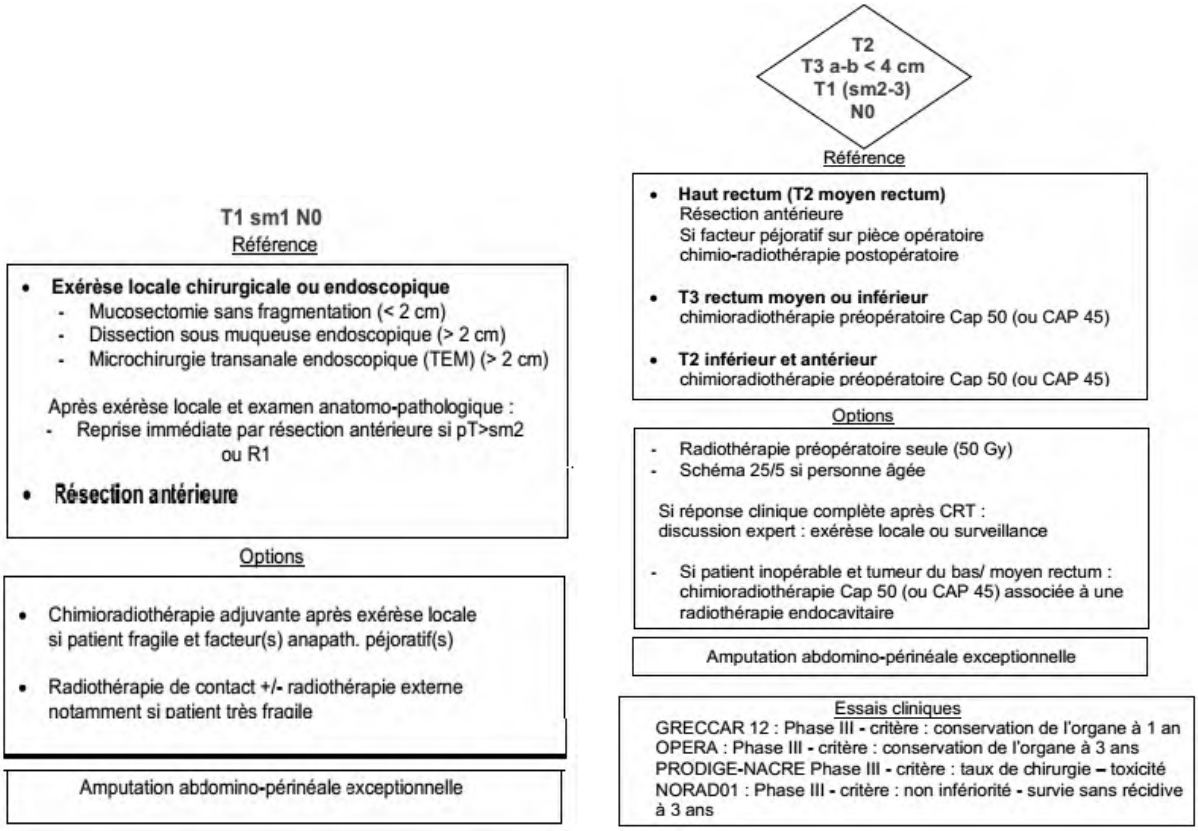


Figure 27 : Arbre décisionnel du traitement adjuvant dans le cancer du rectum

B. Arbres décisionnels



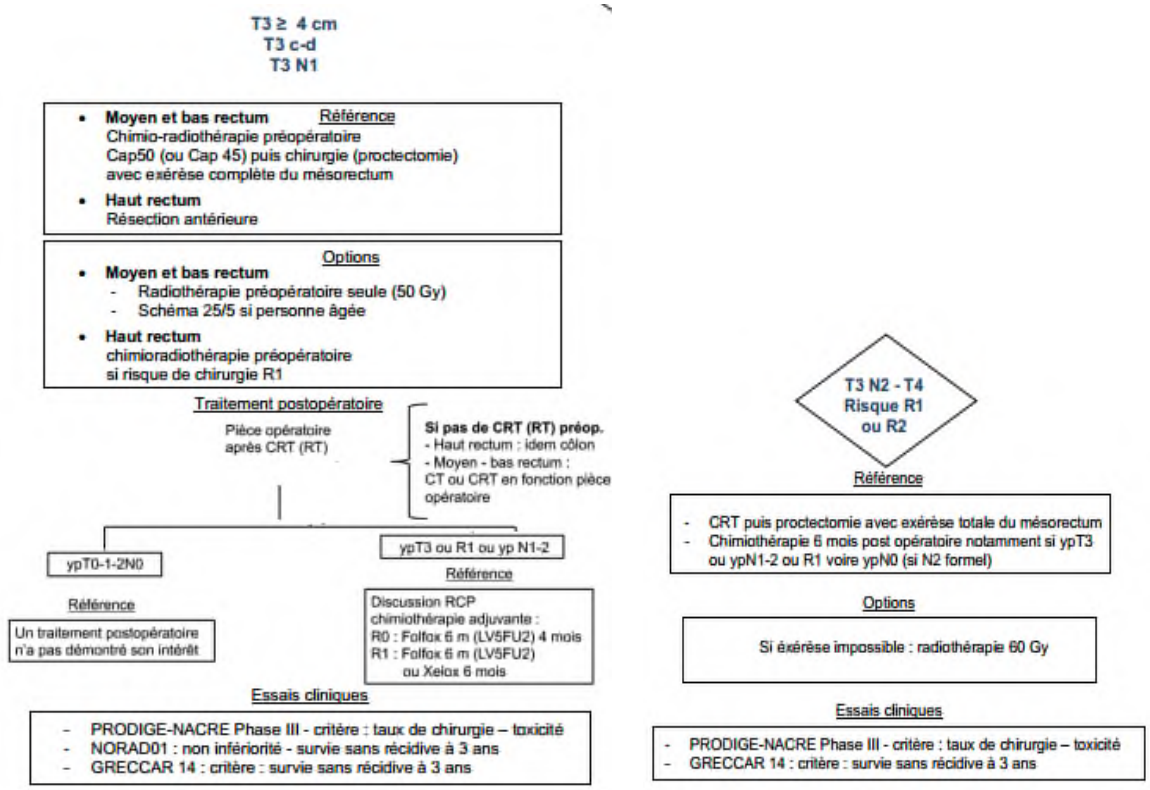


Figure 28 : Arbres décisionnel dans le traitement du cancer du rectum

C. place de la chimiothérapie néoadjuvante dans les tumeurs rectales non résécables ou métastatiques.

Une chimiothérapie première à base des protocoles FOLFOX ou XELOX ou FOLFORINOX peut être proposé pour les tumeurs non résécables ou métastatiques afin d'obtenir une réponse objective et permettre la résecabilité de la tumeur ou des métastases.

L'ajout des thérapies ciblées : les anti-EGFR et les anti-angiogéniques s'avèrent important dans ces situations.

1. Les Thérapeutiques anticancéreuses visant à inhiber la voie RAS/MAPK

Des cibles privilégiées pour le traitement des cancers et au développement d'une personnalisation ciblée de thérapie visant à inhiber cette voie ont été identifiés suite à une connaissance précise des différents mécanismes de la voie RAS/MAPK et de leurs altérations oncogéniques. Dont les trois principales sont :

- **les molécules ciblant l'interaction ligand/EGFR** : le cetuximab (Erbitux®)qui est un anticorp chimérique murin, et le panitumumab (Vectibix®) qui est totalement humain, sont

des anticorps monoclonaux dirigés contre l'EGFR, dont l'efficacité est bien connue dans le traitement du cancer colorectal métastatique avec un gène KRAS sauvage (Au et al., 2008; JONKER et al., 2007; VAN CUTSEM et al., 2009). Leur administration se fait par voie intraveineuse.

- **les molécules ciblant des effecteurs intracellulaires de la voie RAS/MAPK :** ce sont des inhibiteurs de la RAS farnésyl transférase (enzyme responsable d'ancrage de RAS dans la membrane cellulaire). Sont en cours d'évaluation et n'ont pas montré une signification dans le traitement
- **les molécules ciblant le domaine tyrosinekinase de l'EGFR de façon sélective** : l'erlotinib (Tarceva®) et le gefitinib (Iressa®) sont indiqués dans les cancers pulmonaires non à petites cellules avancés. Par contre, ces molécules n'ont, à ce jour, montré aucune efficacité dans les cancers colorectaux
- **les anti-angiogénéniques** : bevacizumab (avastin) peut être utilisé en cas de RAS muté en absence d'une contre-indication.

VII. La surveillance : post-thérapeutique

Une surveillance standard appropriée est exigée à la suite d'une résection chirurgicale, pour permettre de détecter tôt une rechute locale ou à un stade précoce. La plupart des récidives apparaissent dans un délai de 5 ans après résection tumorale (R0)(Goldberg, 2006). Les modalités de surveillance employées préconisent de réaliser les examens suivants (Cotte E, et al, 2019) :

1. surveillance dans les 5 premières années

- **L'examen clinique :** Réaliser tous les 3 mois pendant 3 ans, puis tous les 6 mois pendant 2 ans. Le toucher pelvien et la rectoscopie rigide sont recommandés dans le cas de la conservation du rectum dans le cadre du suivi des patients (Fig. 29).
- Echographie abdominale et radiographie de thorax en alternance avec un scanner thoraco-abdomino-pelvien : réaliser chaque 3 mois durant 3 ans à la recherche des métastases localisées au fois et aux poumons (Goldberg, 2006), puis réaliser tous les 6 mois un scanner thoraco-abdomino-pelvien pendant 2 ans.

- Coloscopie : Est l'examen de choix recommandé dans le suivi du cancer du rectum 3 ans après la résection tumorale, puis la surveillance est en fonction de la découverte ou non d'adénomes. Elle permet de confirmer les résultats obtenus par les autres tests

Il est aussi recommandé de faire le dosage de l'antigène carcino-embryonnaire (ACE), car sa mesure représente un test de routine recommandé dans tous les guides de pratique clinique, son dosage doit être réalisé tous les 6 mois durant les 5 ans qui suivent la résection tumorale (Lopes et al., 2019; Meyerhardt et al., 2013). Une corrélation entre une augmentation de la valeur du CEA et l'avancement de la maladie a été signalée, ainsi que de son intérêt comme facteur de pronostic (ARNAUD, 1980). Le scanner thoraco-abdomino-pelvien peut remplacer la radiographie et l'échographie de thorax en cas de patients obese.

2. Surveillance après 5ans

Un faible risque de récidive entre 5 ans et 10 ans survient chez les patients traités pour un cancer du rectum (7.6 %). Il n'y a pas de références qui recommandent des tests particuliers, par contre un examen clinique, une échographie, une radio de poumon, et une coloscopie peuvent être proposés avec des fréquences qui dépendent de la découverte d'adénomes.

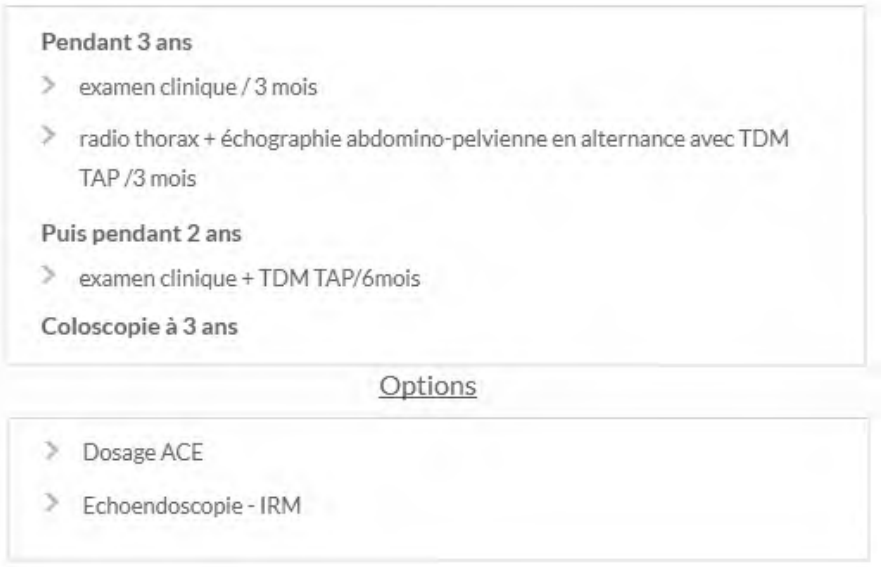


Figure 29 : Arbre décisionnelle pour la surveillance post traitement du cancer du rectum (Cotte E, et al, 2019)

Matériels et méthodes

I. Description de l'étude

C'est une étude transversale, rétrospective, prospective, descriptive et analytique, réalisée au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique et de pathologie moléculaire du CHU Hassan II de Fès pendant une durée de 3 ans allant de septembre 2015 au mois de septembre 2018. Les patients diagnostiqués d'un cancer du rectum depuis janvier 2011 jusqu'au mois d'Aout 2015 on été inclut dans le cadre de l'étude rétrospective, et ceux diagnostiqués a partir du mois de septembre 2015 jusqu'au mois de septembre 2018 ont fait l'objet de l'étude prospective.

1. La taille de l'échantillon

250 patients atteints d'un cancer du rectum, colligés au sein du laboratoire d'anatomie pathologique et de pathologie moléculaire du CHU HASSAN II de Fès ont été recrutés dans notre étude durant la période d'étude. Tous les patients des deux sexes sans distinction d'âge ou de niveau socio-économique sont concernés.

2. Calcul de la taille d'échantillon

L'estimation du nombre des sujets nécessaires pouvant être inclus dans notre étude a été calculée selon une formule utilisée dans le calcul d'effectif pour les études transversales descriptives.
Le cancer du rectum représente 16.9 % des cancers digestifs au Maroc (El hairech and A.Achour, 2013), ce pourcentage sera considéré comme une variable qualitative pour le calcul de la taille de l'échantillon.
La précision désirée était de 5% (i=0.05), avec une proportion $P_0 \cong 17\%$ (la variable inconnue) et $q_0 = 1 - P_0$

Z = 1.96 pour un niveau de confiance de 95 % et un risque de première espèce.
N= la taille de l'échantillon

$$N = ((Z_{\alpha/2})^2 P_0 q_0)/i^2$$

Au risque α=5%, on a **N=216 patients**

3. Critères d'inclusion et d'exclusion

3.1. Critères d'inclusion

Ont été inclus dans notre étude tous les patients (biopsies et pièces opératoires) adressés au laboratoire d'anatomie pathologique et de pathologie moléculaire du CHU HASSAN II de Fès, porteurs d'un cancer du rectum situé à moins de 15 cm de la marge anale et ayant accepté de signer un consentement pour participer à l'étude (Fig.30).

3.2. Critères d'exclusion

Ont été exclus de ce cadre tous les patients ayant un cancer de l'anus ou un dossier incomplet, les patients pour lesquels la radiothérapie et la chimiothérapie sont contre indiquées, ainsi que les malades n'ayant pas signé de consentement (Fig.30).

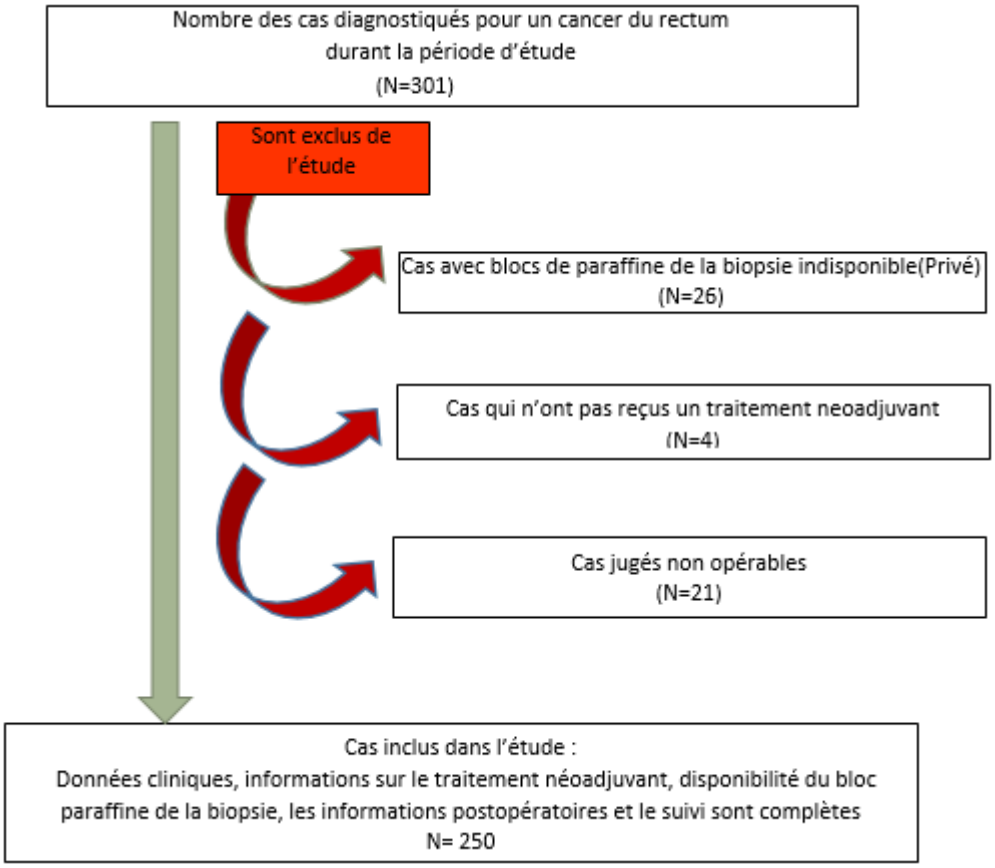


Figure 30 : Diagramme d'illustration des critères de sélection des patients

4. Considérations éthiques

Le comité d'éthique hospitalo-universitaire de Fès, de la faculté de médecine de Fès et du Centre hospitalier universitaire HASSAN II de Fès, a approuvé cette étude sous le numéro 20/17.

5. Recueil des données cliniques

L'étape initiale de cette étude consistait à recueillir toutes les données cliniques et pathologiques nécessaires de chaque patient. Ce recueil est constitué principalement par les données de consultation du dossier clinique du patient (résultats des examens, des consultations dans différents services) à l'aide de l'application HOSIX et par consultation des comptes rendus archivés au niveau du laboratoire d'anatomie pathologique (Annexe 2).

II. Etude Anatomo-pathologique

L'observation histologique des cellules des tissus vivants est une étape primordiale, ce mode d'observation microscopique présente de nombreuses difficultés généralement liées à la conservation, à l'épaisseur, et au manque du contraste du matériel vivant. Un ensemble d'opérations sont nécessaires afin de garantir une meilleure analyse histologique. Cette étude intéresse aussi bien les biopsies que les pièces opératoires.

1. Examen macroscopique à l'état frais

L'examen macroscopique est l'étude à l'œil nu des pièces opératoires, c'est une étape qui doit être réalisée au maximum dans les 20 minutes qui suivent l'acte chirurgicale sur une pièce fraiche non fixée et non ouverte pour pouvoir faire une congélation si tumeur résiduelle.

Il permet d'évaluer la qualité de l'exérèse du mésorectum qui est un bon témoin de la qualité de la chirurgie et un facteur lié au risque de récidive locale. Pour ce fait un encrage de la surface du mésorectum est recommandé. Une mesure de la marge distale entre le pole inférieur de la tumeur et la recoupe distale du rectum a été réalisée pour tous nos patients, avec ouverture de la pièce sur sa face antérieur jusqu'à 1 cm de part et d'autre de la tumeur (Fig. 31) (Jass et al., 2007). Les biopsies sont incluses en totalité après mesure de leurs tailles.

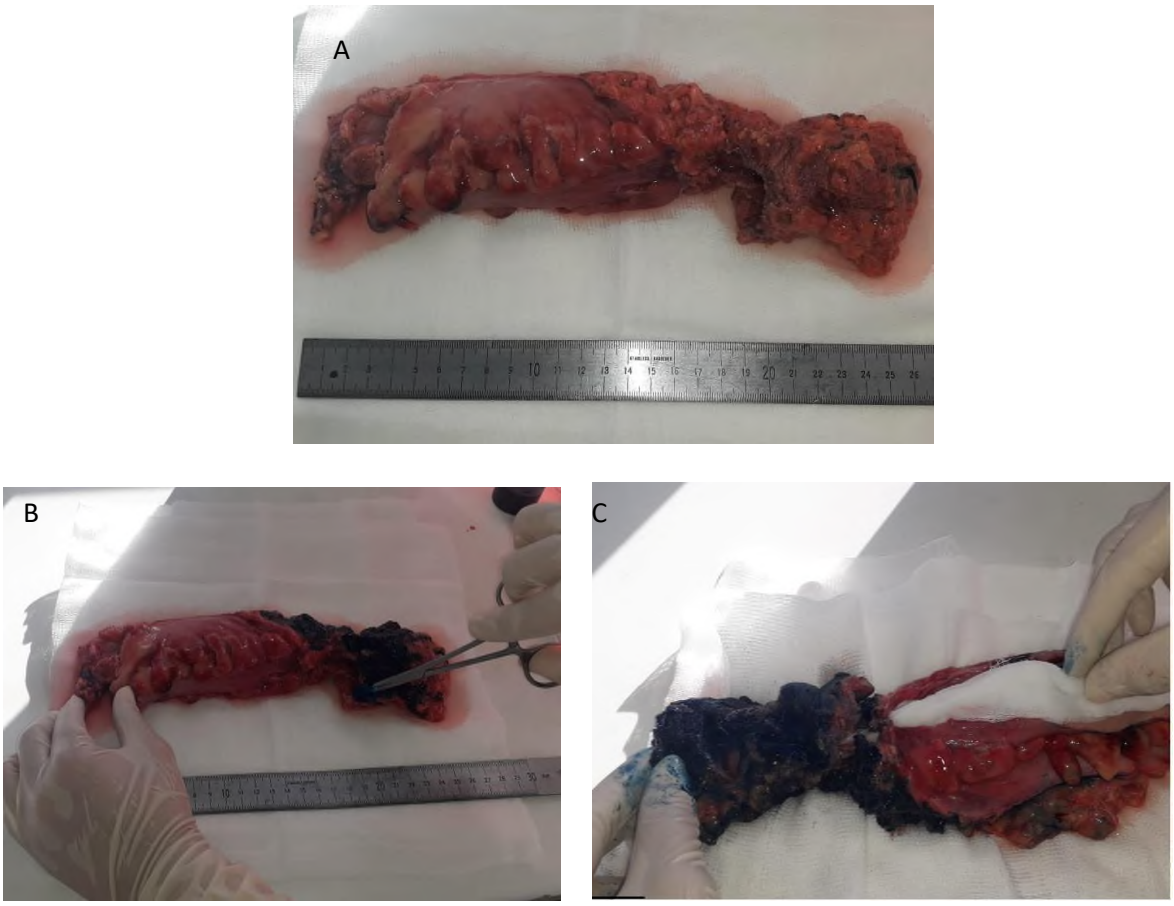


Figure 31 : Examen macroscopique d'une pièce de résection antérieure du rectum à l'état frais. A : mesure de la taille de la pièce B : encrage en bleu de la surface du mésorectum C : insertion d'une compresse sans ouvrir en regard de la tumeur et pour assurer sa fixation (Laboratoire d'anatomie pathologique CHU HASSA II, Fès)

2. Fixation du tissu

Cette étape est fondamentale dans le processus de préparation des tissus pour l'examen anatomopathologique car elle permet la protection des pièces contre l'autolyse tissulaire, la conservation des pièces pour une utilisation permanente et leur durcissement. La durée de fixation dépend de la constitution du tissu et de sa consistance, elle est généralement de 12 h à 24, elle peut être réduite dans le cas des biopsies comme elle peut être allongée pour les pièces les plus volumineuses. Le formol à 10 % tamponné est le fixateur idéalement utilisé avec un volume 10 fois supérieur que celui de la pièce ou de la biopsie à fixer. La mise en contact avec le formol ne dois pas dépasser l'heure qui suit le prélèvement, son utilisation permet d'assurer la

qualité d'éventuelles analyses spéciales, comme l'immunohistochimie et la biologie moléculaire. L'étape de fixation est réalisée à la température ambiante du laboratoire.

3. Examen macroscopique après fixation

Les biopsies sont incluses en totalité après fixation. Concernant la pièce après fixation, des tranches circulaires de 3 à 4 mm d'épaisseur sont disséquées puis étalées. Cela permettra de prélever les échantillons tumoraux dans au moins 5 blocs au niveau de la zone contenant la lésion tumorale avec la surface encrée contenant l'extension pariétale maximale. La totalité de la tumeur si sa taille est inférieur à 3 cm ou de la cicatrice (en cas de régression tumorale complète) est préleveé, ainsi que les limites d'exérèse qui représentent un témoin de la qualité de la chirurgie (Fig. 32) (Nagtegaal et al., 2002).

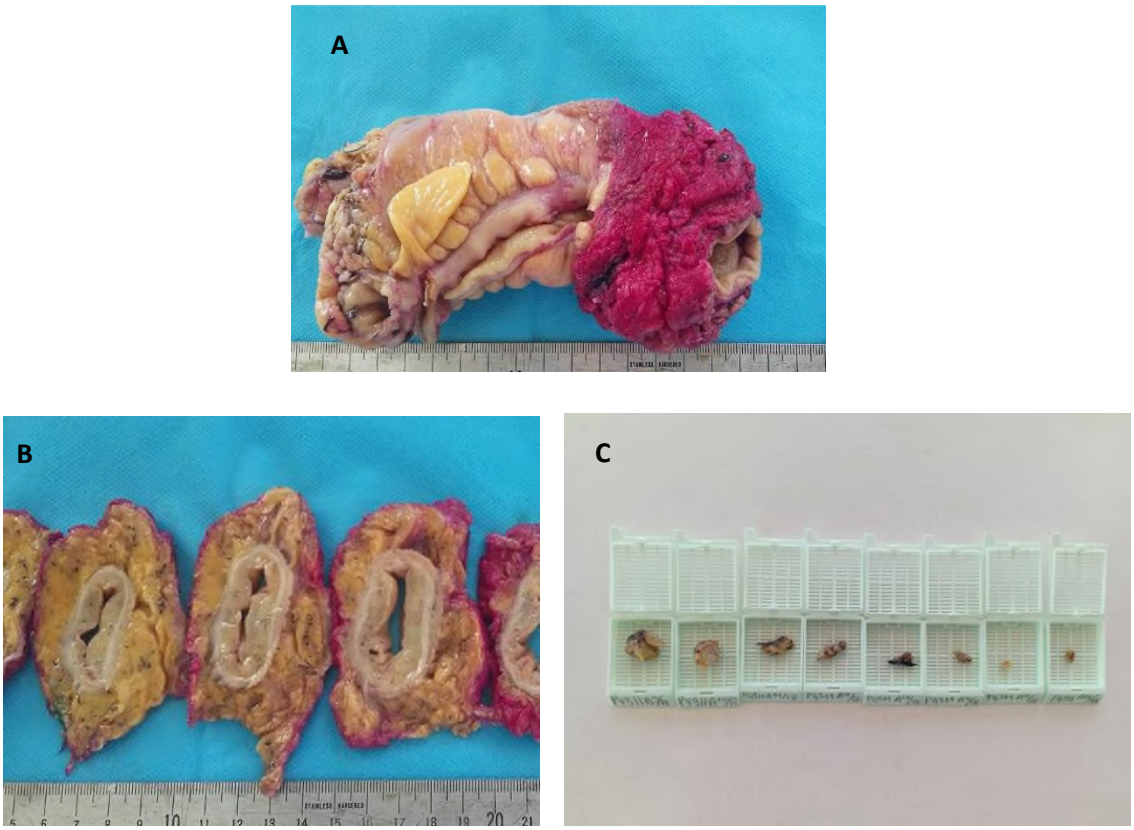


Figure 32: Examen macroscopique après fixation au formol à 10% A. Pièce de résection antérieur du rectum avec encrage du mésorectum, B. Coupes sériées de la pièce opératoire C. curage ganglionnaire (Laboratoire d'anatomie et de pathologie moléculaire, CHU HASSAN II, Fès)

Le curage ganglionnaire est l'étape finale de l'examen macroscopique. Le prélèvement de tous les ganglions et nodules du mésorectum avec une technique de palpation à la main est une étape nécessaire, une moyenne de 12 ganglions est recommandée comme un seuil optimal pour assurer une meilleure classification du statut ypN des ganglions lymphatiques, les coupes sont ensuite placées dans des cassettes (Fig. 32-C) (NAGTEGAAL et al., 2011; Rullier et al., 2008).

4. Imprégnation et inclusion

L'ensemble du processus d'imprégnation et d'inclusion consiste à donner une certaine consistance homogène indispensable pour le maintien des diverses parties du fragment en place et pour faciliter l'étape de la coupe, grâce à l'infiltration de la paraffine dans le tissu. Ce processus est automatisé et passe par 3 étapes : la déshydratation par l'alcool de gradients croissant qui va permettre de chasser l'eau contenue dans les fragments, une deuxième étape consiste à imprégner les fragments par le toluène (Fig.33-A). Finalement une étape d'enrobage est procédée dans des blocs métalliques en orientant convenablement la pièce (Fig. 34) dont la face à couper doit être tournée vers le dessous.

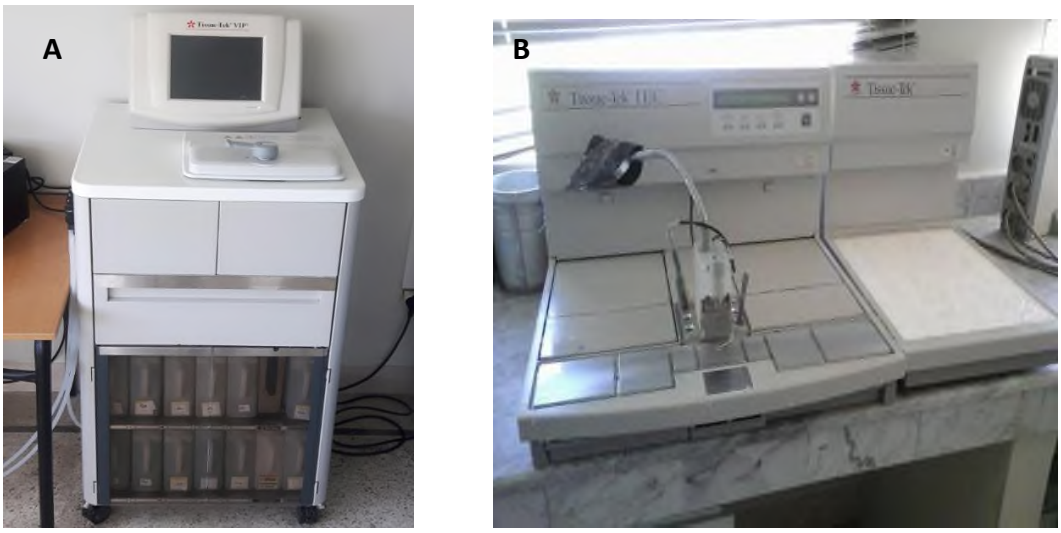


Figure 33 : A. Appareil d'imprégnation par la paraffine (histokinette) B. Appareil d'inclusion dans la paraffine (Laboratoire d'anatomie, CHU HASAN II Fès)

5. Coupe et coloration

Après refroidissement suffisant du bloc, des coupes fines d'une épaisseur de 5 microns sont réalisées à l'aide d'un microtome de haute précision (Fig. 34), les rubans fins obtenus sont ensuite mis en contact avec l'alcool dilué pour permettre un déplissement des coupes, ils sont ensuite étalés sur les lames porte-objets dans un bain d'eau distillée chauffée à 56 °C contenant la gélatine qui est un agent favorisant l'adhésion de la coupe à la lame en verre.

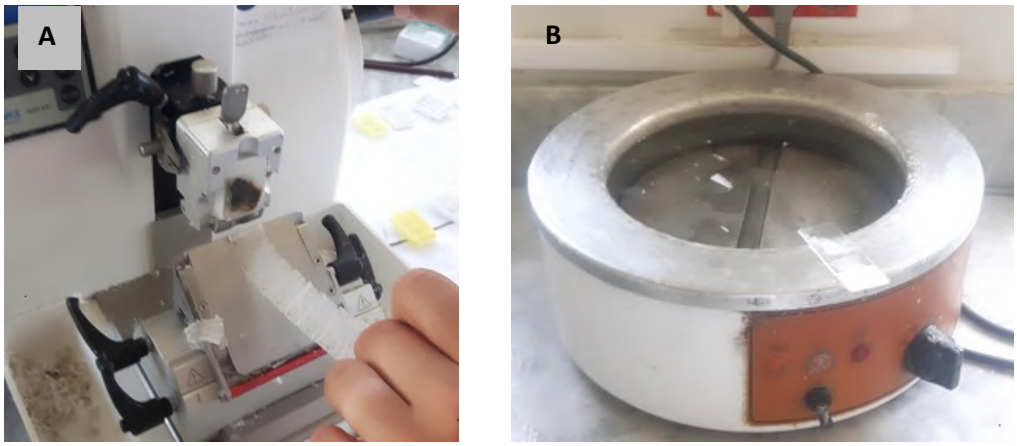


Figure 34 : Technique de microtomie et de montage sur lames A : coupe au microtome avec ruban paraffine, B : Etalement du ruban au bain marie (Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASAN II, Fès)

L'étape de coloration consiste à utiliser des colorants trichromiques qui augmentent le contraste et favorisent l'observation des propriétés spécifiques des cellules. La coloration habituellement utilisée est celle de Hopkins communément désignée HES (Hématoxyline-érythrosine, safran) réalisée à l'aide d'un appareil automatisé (Fig. 35). L'hématoxyline colore les noyaux en violet, l'érythrosine donne une coloration rouge rosée au cytoplasme alors que le safran mélangé à une solution hydroalcoolique colore les fibres conjonctives en jaune.



Figure 35 : Appareil de coloration automatisée (Laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès)

Pour ce faire on doit suivre un procédé d'acheminement inverse de l'inclusion en éliminant la paraffine au début et en plaçant les lames dans une étuve à 56 °C pendant 1 heure, puis en enchaine par un déparaffinage dans deux bains de toluène. Les lames contenant les coupes microscopiques sont immergées ensuite dans l'éthanol avec un gradient croissant (70 %, 80%, 100 %) afin d'éliminer toute trace de toluène résiduel et de déshydrater les coupes. Une hydratation à l'eau courante est assurée pendant 1 minute.

La coloration des noyaux en violet est réalisée à l'aide d'une incubation dans l'hématoxyline pendant 5 mn, l'excès est éliminé après un passage dans de l'eau courante pendant 1 minute, un lavage dans des bains d'alcool chlorhydrique et l'alcool ammoniacal est nécessaire pour décolorer le cytoplasme qui s'est coloré aussi en violet, suivi d'un rinçage à l'eau courante. Le cytoplasme est alors coloré dans cette étape avec l'érythrosine à 2 % pendant 5 mn, un lavage avec des bains d'alcool à gradients croissants est nécessaire pour décolorer les fibres de collagène qui ont pris la couleur rose. L'étape finale consiste en une coloration par le safran pendant 10 minutes suivi d'un passage dans des bains d'éthanol-méthanol pendant 1 minute et finalement dans un dernier bain de toluène.

Afin de garantir une protection mécanique, une conservation indéfinie des colorations, un degré de transparence, et un indice de réfraction avantageux du point de vue optique, une étape de

montage est réalisée à l'aide d'un liquide réfringent (l'eukit) qui va permettre le collage d'une lamelle couvre objet sur la préparation microscopique colorée au préalable (Fig. 36).



Figure 36 : Lames colorées avec la coloration HES
(Laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II Fès)

III. Etude Immunohistochimique (IHC) de l'expression des biomarqueurs

L'expression d'un groupe de protéines de réparation de mésappariement (MMR), p53, HER-2, et du Ki 67 par immunohistochimie a été évaluée chez 57 patients. Les rôles prédictifs potentiels de l'expression de ces biomarqueurs protéiques et du pronostic ont également été évalués.
Le microenvironnement tumoral a été exploré en utilisant les deux marqueurs des lymphocytes T CD3 + et CD8 + des cellules immunitaires adaptatives, ensuite l'immunoscore réalisé a été corrélé avec les caractéristiques clinicopathologiques, la réponse thérapeutique et la survie des malades. Cette analyse a concerné 54 biopsies tumorales pré-thérapeutiques.

1. Principe de la technique

Le principe de cette technique consiste à mettre en évidence et localiser divers antigènes (Ag) cellulaires ou extracellulaires qui peuvent être des Ag membranaires, cytoplasmiques, nucléaires ou des protéines de la matrice extracellulaire, en associant le principe d'immunologie et de l'histochimie. Elle permet d'apporter les informations nécessaires dans le diagnostic des tumeurs et d'autres pathologies non tumorales et d'estimer le pronostic en pathologie tumorale. Elle permet également l'élargissement des connaissances dans le domaine de la recherche par l'exploration des mécanismes physiopathologiques des maladies en pathologies humaines et expérimentales.

L'immunohistochimie a l'avantage de pouvoir être pratiquée sur des prélèvements fixés et inclus en paraffine. Des résultats satisfaisants ont été obtenus dans notre protocole avec une fixation au formol à 10%. Les conditions d'accomplissement de cette technique sont propres à chaque laboratoire nécessitant des mises au point techniques particulièrement dans les étapes du démasquage antigénique (four à micro-ondes, cocotte-minute, ou bain marie), l'optimisation des dilutions des anticorps et les techniques de révélation.

2. Le protocole expérimental de la technique IHC

La technique d'IHC a été réalisée sur des coupes de tissu tumoral fixé au formol à 10%, une épaisseur de 5 micromètres a été idéal pour des résultats satisfaisants. Les lames silanisées porte-objets spécialement commercialisées pour cette technique, sur lesquelles sont fixés les fragments tissulaires ont été incubées dans une étude réglée à 58 °C pendant une nuit. Une seconde étape de déparaffinage a été réalisée en immergeant les lames dans deux bains de toluène pendant 5 minutes chacun suivi de deux autres bains d'éthanol absolu et d'éthanol à 95% successivement, pendant 5 mn chacun. L'étape du démasquage permet la rupture des liaisons faites entre les protéines (épitopes) lors de la fixation pour les rendre accessibles pour la reconnaissance de l'anticorps spécifique. La solution de démasquage utilisée est livrée dans le kit commercialisé, elle est diluée avec de l'eau distillée. Son ph=9 est convenable pour les deux types d'anticorps basiques et acides, cette étape est essentielle pour libérer les sites de fixation des anticorps sur leurs récepteurs antigéniques spécifiques en dénaturant pendant 45 mn dans un bain marie réglé à une température de 97°C les liaisons covalentes et intramoléculaires entre les protéines, les polysaccharides, les glycoprotéines et les acides nucléiques. Un refroidissement des lames à une température ambiante pendant une durée de 20 à 30 minutes dans leurs solutions de démasquage suivie d'une incubation de 5 minutes dans une solution de PBS (Phosphate buffered saline) permettra d'arrêter la réaction de dénaturation. La zone d'intérêt du fragment a été encerclée par un stylo marqueur Dako pen et une chambre humide a été préparée avec du papier imbibé rigoureusement avec de l'eau distillée pour empêcher le séchage des lames qui peut représenter un facteur d'échec de la technique IHC (Fig. 37).



Figure 37 : Les étapes de déparaffinage des lames (laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès)

La peroxydase bloquante a été utilisée ensuite sur les fragments cibles puis lavée dans un bain de PBS pendant 5 mn. L'excès du PBS a été ensuite éliminé et remplacé par l'anticorps primaire spécifique puis incubé à l'obscurité pendant 45 mn. Un deuxième lavage a été réalisé à la fin de la réaction de fixation de l'anticorps sur l'antigène spécifique avec la solution de PBS dans deux bains successifs pendant une durée de 5 mn, cela permettra d'éliminer l'excès d'anticorps non fixé. Les lames ont été mises à nouveau dans la chambre humide puis couvertes par l'anticorps secondaire, la réaction de fixation de l'anticorps secondaire sur l'antigène primaire se fait pendant 30 mn, et encore lavée à la fin par le PBS pendant 5 minutes. La révélation du complexe anticorps-antigène a été réalisée à l'aide d'une solution de révélation préparée extemporanément en mélangeant une goutte de DAB (3,3- diaminobenzidine, Dako) qui est un chromogène qui donne une coloration marron des sites spécifiques avec 1 ml du tampon spécifique livré avec le kit. L'étape de révélation se fait dans 3 à 5 minutes selon l'intensité de la coloration désirée et estimée à l'œil nu. Un bain d'eau distillée a été utilisé pendant 5 mn pour arrêter cette dernière étape, suivie d'un bain d'hématoxyline pendant 3 à 5 minutes qui permettra de colorer les noyaux en bleu. L'excès du colorant a été ensuite éliminé par un lavage à l'eau distillée pour obtenir une coloration homogène et spécifique sans masquer l'immunomarquage spécifique de faible intensité. Une dernière étape consiste à faire passer les lames dans une solution d'alcool ammoniacal puis une déshydratation par un bain d'alcool décroissant et un montage standard avec l'eukit par une lamelle couvre-objet (Fig. 39).

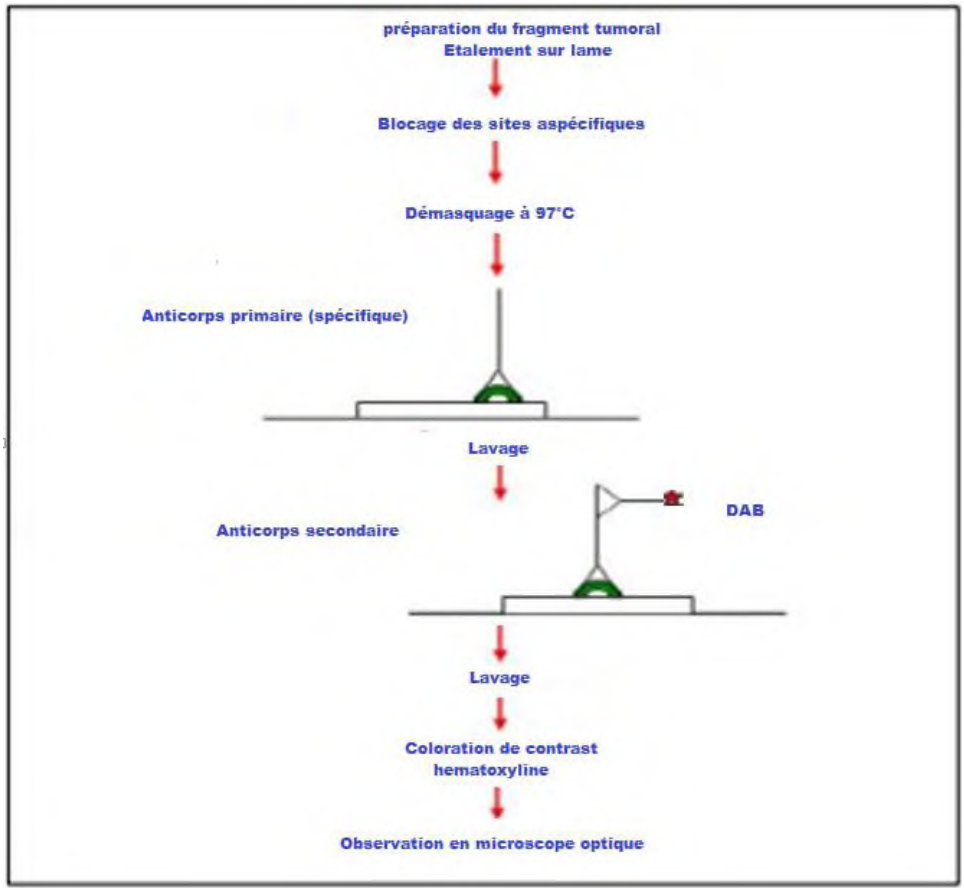


Figure 38 : Le protocole expérimental de la technique d'immunohistochimie indirecte (élaboré selon le protocole expérimental vendu avec le kit))

3. Interprétation du marquage Immunohistochimique

Les résultats obtenus par les techniques d'immunohistochimie dépendent de plusieurs facteurs tels que l'étape de fixation. L'interprétation du résultat dépend du type d'anticorps utilisé.

4. Les anticorps utilisés dans notre étude

Les biomarqueurs choisis dans notre étude interviennent dans les différents mécanismes des voies moléculaires au cours de la progression des cellules malignes (prolifération cellulaire, contrôle cellulaire….), pour cela nous suggérons que la réponse histologique estimée sur pièce de résections rectales après traitement néoadjuvant peut être associée avec le niveau d'expression des biomarqueurs sélectionnés.

Le but cette étude est d'identifier les biomarqueurs moléculaires qui peuvent être prédictifs de la réponse au traitement néoadjuvant, à la progression de la maladie (survie et métastases), ainsi qu'à la survie globale des patients.

L'utilisation des témoins positifs et négatifs comme contrôle externe de la technique a été nécessaire.

4.1. Evaluation de l'expression du Ki-67

Anticorps anti Ki-67 : L'antigène Ki-67 est une protéine nucléaire définie par sa réactivité avec l'anticorps monoclonal du clone Ki-67,il est exprimé préférentiellement durant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, S, G2). et la phase M), mais il est absent dans les cellules au repos (phase G0). Pendant l'interphase, l'antigène peut être détecté exclusivement dans la zone du noyau, alors que dans la mitose, la plus grande partie de la protéine est déplacée à la surface des chromosomes. L'antigène se dégrade rapidement lorsque la cellule entre dans l'état non prolifératif, et il semble n'y avoir aucune expression de Ki-67 pendant les processus de réparation de l'ADN.

L'anticorps de souris monoclonale est fourni à l'état liquide, son clone est le MIB-1 (*ref* :DAKO IR626/lot 20058909), c'est un isotype de l'IgG1, une dilution ½ a été optimale pour avoir un bon marquage immunohistochimique. Un seuil de positivité de la technique a été limité à 1%. L'indice de prolifération cellulaire a été calculé en pourcentage des cellules marquées par rapport à l'ensemble des cellules examinées. Deux groupes de patients ont été répartis. Un premier groupe avec un indice de prolifération cellulaire inférieur à 50% et un deuxième groupe avec un pourcentage supérieur ou égale à 50%. Le marquage attendu est de couleur marron au niveau des noyaux des cellules cancéreuses.

4.2. Evaluation de l'expression des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN (MSI)

L'étude immunohistochimique des protéines de réparation des mésappariements de l'ADN a pour but la mise en évidence d'une perte d'expression protéique, c'est-à-dire une absence de marquage, ce qui nécessite impérativement la présence de témoins positifs de la technique sur la coupe. Cette perte d'expression est somatique, ce qui signifie qu'elle ne s'observe que dans les cellules tumorales. Il est nécessaire de disposer d'un prélèvement fait à cheval sur la tumeur et la muqueuse saine afin de confirmer qu'il existe une perte d'expression d'une protéine en présence d'un témoin interne positif c'est à dire d'un marquage nucléaire des cellules épithéliales

de la muqueuse normale adjacente, des lymphocytes du centre germinatif des follicules lymphoïdes lorsqu'ils sont présents, ou encore des lymphocytes ou des cellules endothéliales du stroma de la tumeur situées entre les éléments tumoraux. Quatre protéines sont actuellement étudiées à l'aide d'anticorps monoclonaux disponibles dans le commerce : MLH1, MSH2, MSH6 et PMS2. On observe ainsi dans la tumeur des pertes d'expression combinées : l'extinction de la protéine MSH2 s'accompagne d'une extinction de la protéine MSH6, et l'extinction de la protéine MLH1 est presque toujours accompagnée d'une extinction de la protéine PMS2. En effet, ces protéines agissent sous forme d'hétérodimères MSH2-MSH6 et MLH1-PMS2, l'inactivation d'une des deux protéines affectant l'expression de la protéine partenaire. En pratique, l'extinction isolée ou combinée de MSH2, l'extinction isolée de MSH6, et l'extinction isolée de PMS2 sont un bon argument en faveur d'une altération constitutionnelle du gène correspondant. En revanche, l'extinction isolée ou combinée de MLH1 peut correspondre à une mutation germinale du gène MLH1 ou à une inactivation par méthylation de son promoteur. La technique d'immunohistochimie pour l'expression des protéines MMR a été réalisée dans notre étude à l'aide d'un appareil automatisé car la réussite de cette technique est délicate (Fig. 39), cela est dû à des particularités liées aux clones commercialisés.



Figure 39 : Automate pour immunohistochimie de la marque VENTANA Benchmark ULTRA (Laboratoire d'anatomie, CHU HASSAN II, Fès)

Un panel de quatre anticorps (VENTANA MMR IHC) a été utilisé ; l'anticorps utilisé pour la reconnaissance du gène MSH-6 est l'anticorps monoclonal de souris anti-MSH6 (Clone-44)

commercialisé (ref :VENTANA 790-5092). L'anticorps monoclonal de souris anti-MLH-1 (Clone-M1) reconnait l'antigène MLH-1(ref : VENTANA 790-5091). L'expression de la protéine MSH 2 a été révélée par l'anticorps anti-MSH2 monoclonal de souris (Clone G219-1129)(ref : VENTANA 790-5093). L'anticorps monoclonal de souris anti-PMS2 (clone A16-4) a été utilisé pour reconnaitre l'antigène PMS2 (ref : 790-5094).

4.3. Evaluation de l'expression de l'HER-2

L'anticorps polyclonal du lapin Anti-Human c-erbB-2 Oncoprteine, reconnaît la région entre Pro1233-Pro1254 de la protéine C-erbB-2 (aussi connue sous l'appellation HER-2/neu) qui est fréquemment surexprimée dans les cancers du sein (ref :DAKO A0485/ lot :20056941).

L'oncoprotéine c-erbB-2 appartenant à la famille des récepteurs du facteur de croissance épidermique (EGFR) est une tyrosine kinase transmembranaire de 185 kDa. Cette famille comprend quatre récepteurs homologues ErbB-1 (EGFR, HER1), ErbB-2 (HER2 / neu), ErbB-3 (HER3) et ErbB-4 (HER4) (1). Le proto-oncogène c-erbB-2 est situé sur le chromosome 17 en q21 (2). L'activation de l'oncoprotéine c-erbB-2, par homo ou hétérodimérisation, déclenche des événements de signalisation intracellulaire qui sont essentiels pour la croissance, la différenciation et la survie des cellules. Une surexpression de l'oncoprotéine c-erbB-2 est souvent le résultat de l'amplification génique. L'analyse de l'expression de la protéine HER-2 est réalisée selon le score utilisé dans le cancer colorectal (Valtorta et al., 2015).

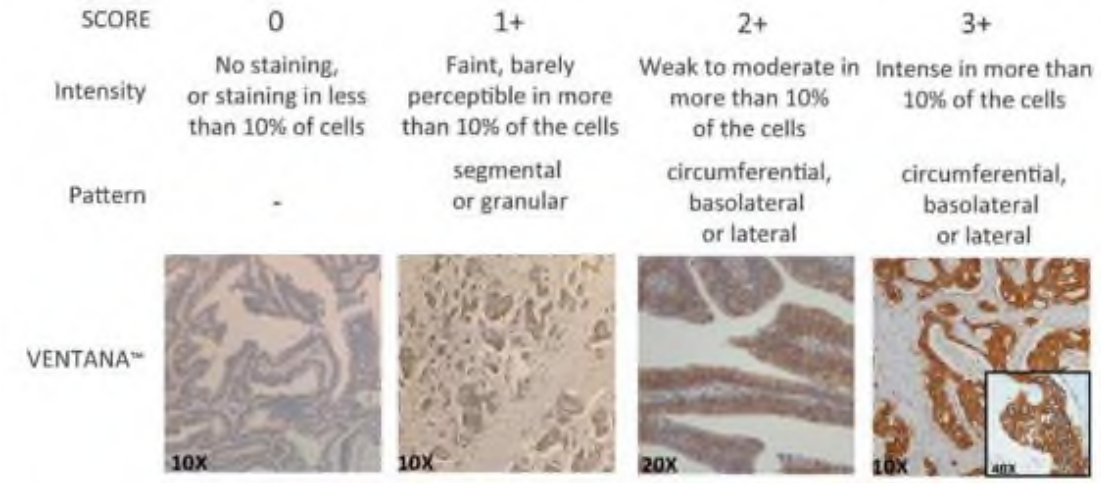


Figure 40 : Evaluatioon de l'expression de HER2 (Valtora et al ; 2015)

4.4. Evaluation de l'expression du P53

La p53 est une phosphoprotéine nucléaire de 53 kDa qui agit comme une protéine suppressive de la tumeur et qui intervient dans l'inhibition de la prolifération cellulaire lorsque l'ADN est endommagé. Le gène P53 intervient dans les étapes avancées de la progression tumorale (séquence adénome-cancer de Volgnstein)

Le clone DO-7 reconnaît un épitope entre les acides aminés 1-45 de toutes les formes connues de la protéine p53 humaine(ref : DAKO IS616/lot : 20064207). L'analyse de l'expression de p53 a été réalisée selon l'intensité du marquage (Faible: < 20% ; moyen : 20-50%, marquage fort : ≥ 50%).

4.5. Conception de la technique immunoscore

4.5.1 Intérêt de l'étude de l'immunoscore

Nous suggérons que la progression de la tumeur est un processus dépendant de la cellule tumorale en elle-même ainsi que de son microenvironnement. Il a été démontré que l'infiltrat immunitaire in situ influence la survie des patients. La nécessité de mettre au point une technique fiable capable d'exploiter les caractères immunitaires comme un facteur prédictif de réponse au traitement néoadjuvant, aussi de le considérer comme un paramètre influençant la prise en charge des patients atteint du cancer du rectum.

Pour cela l'objectif de cette étude et de déterminer si l'infiltrat immunitaire de la tumeur, récemment évalué avec la méthodologie immunoscore, pourrait être un marqueur pronostique utile chez les patients atteints de cancers du rectum, également inciter à l'utilisation de cette méthode comme un test de routine pour la prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant pour le cancer du rectum localement avancé.

La densité totale des lymphocytes T CD3+ et T CD8+ cytotoxiques a été évaluée par immunohistochimie et quantifiée par une analyse simple sur microscope optique pour 55 biopsies tumorales prélevées avant traitement néoadjuvant des patients atteints de cancer du rectum. Les résultats ont été corrélés à la réponse thérapeutique, à l'évolution de la maladie (métastase et récidives), ainsi qu'à la survie des patients.

- **Evaluation de l'expression du CD 3**

Le CD 3 est une glycoprotéine polyclonal du lapin, comporte au moins quatre composants différents (γ, δ, ε, ζ) de 20 à 28 kD.

L'anticorps Flex Monoclonal Rabbit Anti-Human CD3, clone 4B12 a été utilisé pour marquer le récepteur CD3 (ref :DAKO IR503/ lot : 20067774).

- **Evaluation de l'expression du CD8**

La CD8 est une glycoprotéine transmembranaire de 68 kDa. Elle est exprimée sous forme d'un hétérodimère avec un pont disulfure comprenant une chaîne α de 32 à 34 kDa et une chaîne β de 30 à 32 kDa, ou sous forme d'un homodimère comprenant deux chaînes α (ref : DAKO IR623/ lot :20058359). Les CD8α et CD8β ont toutes les deux un domaine semblable à une région variable d'immunoglobuline typique dans une partie extracellulaire N-terminale, ce qui les relies à la superfamille génétique des immunoglobulines. Le CD8 est exprimé principalement comme l'hétérodimère αβ par une majorité de thymocytes et par les lymphocytes T suppresseurs/cytotoxiques matures limités par un complexe majeur d'histocompatibilité de classe l.

L'anticorps FLEX monoclonal de souris Anti-Human CD8 a été utilisé pour marquer les lymphocytes T cytotoxiques/suppresseurs.

4 .5.2. Calcul de la densité des lymphocytes T CD3 et CD8

La densité des lymphocytes T CD3 totaux a été déterminée par comptage simple à l'aide d'un microscope optique. Le nombre de lymphocytes T CD3 a été calculé par rapport à une surface égale à 1 mm ^{2}. Une observation au microscope Leica DM 2500 à l'aide du grossissement x20, et un indice égale à 1/16 a permis de limiter un champ microscopique d'une surface de 1,25 mm^2.

Surface du champ = Grossissement 20 x Indice macroscopique

Surface du champ =20 x (1/16)

Surface du champ = 1.25 mm^2

Le nombre obtenu a été ensuite calculé pour une surface de 1 mm ^{2}.

- ***Détermination de la densité lymphocytaire dans le corps de la tumeur (CT)***

Le nombre des lymphocytes T a été compté dans le corps de la tumeur : zone tumorale la plus riche en cellules lymphocytaires sur les lames marquées par la technique immunohistochimique.

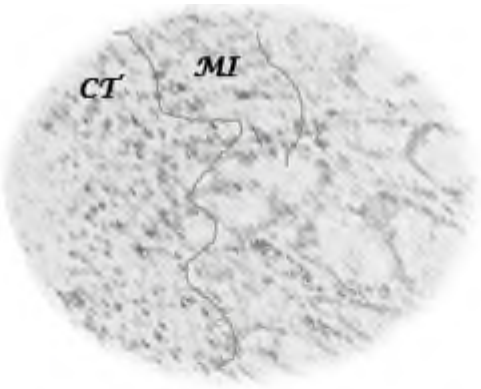
- ***Détermination de la densité lymphocytaire dans la marge d'infiltration de la tumeur (MI)***

  Le nombre des cellules a été compté au niveau de la zone du chevauchement entre la tumeur et le tissu normal.

  La même procédure a été suivie pour le calcul de la densité des CD8 des lymphocytes T

4.5.3 Méthode de calcul de l'immunoscore

Après calcul des densités cellulaires des CD3 dans le corps de tumeur (CD3+CT)(médiane ; 60 cellules/mm^2) et dans la marge d'infiltration (CD3+MI) (médiane ; 50 cellules/$mm^{2)}$ et des CD 8 des lymphocytes T dans le corps de la tumeur (CD8+CT) (médiane ;40 cellules/$mm^{2)}$ ainsi que dans la marge d'infiltration (CD8+MI)(médiane ; 20 cellules/$mm^{2)}$, chaque région analysée a été classée comme forte ou faible selon un seuil prédéterminé (Fig. 41).



Calcule de la densité des CD3 dans le corps de la tumeur (CD3+ CT),

et dans la marge d'infiltration (CD3+MI)

< médiane ≥ médiane

Faible densité Forte densité

(0) (1)

CD3+ CD8+

CT → 0 OU 1 + 0 OU 1 → 0,1, ou 2

+

IM → 0 OU 1 + 0 OU 1 → 0, 1, ou 2

Immunoscore= I0, I1, I2, I3, I4

Exemple de calcul

CD3+		CD8+		Score
CD3+CT	CD3+IM	CD8+CT	CD8+IM	
1	1	1	1	I4
1	1	1	0	I3
1	1	0	0	I2
1	0	0	0	I1
0	0	0	0	I0

Figure 41 : Schéma illustratif de la méthode de conception de l'immunoscore

(Anitei et al., 2014)

Ensuite 5 groupes d'immunoscore (I) allant d'I0 à I4 ont été déterminés. Chaque région tumorale a été caractérisée par un marquage faible pour (0) ou fort pour (1), par exemple un score I4 correspond à une tumeur avec une forte densité dans les deux régions CT et IM du CD3+ et celles du CD8+ (Fig.41).

Un deuxième classement a été réalisé pour déterminer 3 groupes selon l'immunoscore ; un groupe d'immunoscore faible constitué de l'immunoscore I0 et I1, un groupe d'immunoscore modéré constitué de l'immunoscore I2 et un 3ème groupe d'immunoscore fort qui regroupe l'immunoscore I3 et I4 (Fig. 42).

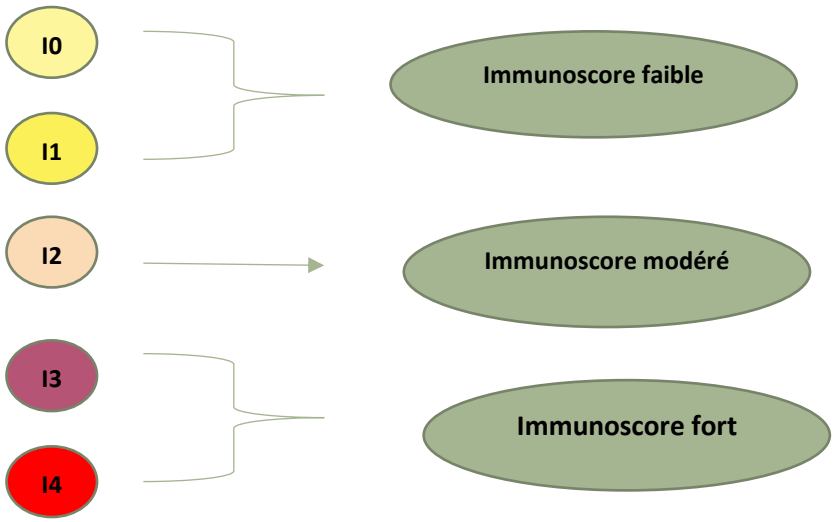


Figure 42 : Schéma illustratif pour le classement de l'immunoscore en 3 groupes

III . Biologie Moléculaire

L'objectif de cette partie est d'étudier le statut mutationnel des gènes KRAS, NRAS et BRAF dans 57 tumeurs par PCR suivi du séquençage classique et du pyroséquençage. Les rôles prédictifs potentiels de l'expression des biomarqueurs génétiques et du pronostic ont également été évalués.

1. Méthodes de Biologie moléculaire

1.1. Etape pré-analytique : préparation des lames et détermination du pourcentage des cellules tumorales

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des prélèvements biopsiques n'ayant reçu aucun traitement néoadjuvant. Après la réalisation des coupes de 3 à 4 micromètres d'épaisseur et coloration par HES, le pourcentage des cellules tumorales de la coupe a été déterminé par observation de la lame au microscope optique (Grossissement x10) par le pathologiste (Fig. 43). Un seuil minimal de 30% a été respecté afin de réussir une amplification de l'ADN.



Figure 43 : Détermination de la zone tumorale et du pourcentage des cellules tumorales sur la lame colorée avec la coloration HES et bloc correspondant de la biopsie (Laboratoire d'Anatomie, CHU HASSAN II, Fès)

1.2. Extraction des ADN à partir du tissu fixé

L'ADN contenu dans les cellules des fragments tumoraux fixés et inclus en paraffine est isolé à l'aide du Kit d'extraction (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific). Le principe de purification

d'ADN depuis les tissus repose sur les propriétés des liaisons sélectives des composés sur une membrane à base de silice tapissant la colonne d'extraction. En effet, dans les conditions chimiques qui caractérisent la composition des différents tampons, l'ADN se lie à la membrane de silice alors que les contaminants passent à travers. Plusieurs étapes sont nécessaires pour réaliser cette extraction (Fig.44).

1.2.1. Déparaffinage

Des coupes de 7 à 8 micromètres sont ajoutées à 1 ml de toluène dans un tube Eppendorf de 1.5 ml. Le toluène permet d'éliminer la paraffine des fragments biopsiques, une deuxième étape de déparaffinage est réalisée à une température de 45 °C pendant 3 mn afin de s'assurer que le fragment n'en contient plus. Les traces du toluène restantes dans le tube contenant l'échantillon sont ensuite enlevées par l'ajout de 1 ml d'éthanol absolu dans deux étapes successives. Entre chacune des étapes de déparaffinage des centrifugations à une forte vitesse de 8000 tr/mn sont réalisées. Une évaporation de l'éthanol à 56 °C pendant 20 mn sous agitation lente est ensuite assurée, car la présence des traces d'éthanol constitue un inhibiteur de la réaction du PCR.

1.2.2. Lyse des protéines tissulaires

Une lyse enzymatique est réalisée grâce à l'ajout de la protéinase K d'une concentration de 20 mg/mL (ref :25530-015, lot : G1186A0816) et de 200 microlitres du tampon de digestion, la quantité d'enzyme de digestion à ajouter dépend de la taille de l'échantillon à extraire. Généralement le volume à ajouter varie de 2 à 4 microlitres. La digestion est alors réalisée dans un four muni d'un agitateur à une température de 56°C pendant une nuit. Le lendemain il est préférable d'ajouter 1 à 2 microlitres et d'incuber pendant quelques heures afin d'assurer une digestion complète des protéines.

1.2.3. Lavage après précipitation de l'ADN

Un mélange de 550 microlitres d'une solution d'éthanol absolu et de 240 microlitres d'Isolation additif est préparé extemporanément, il permettra la précipitation de l'ADN qui sera fixé à la membrane de silice après transfert du mélange dans la colonne d'extraction. Après une centrifugation à 8000 tr/mn pendant 1 mn, un lavage est réalisé avec 700 microlitres de la solution Wash 1 suivi d'un deuxième et d'un troisième lavage avec 500 microlitres de solution wash 2. Les lavages permettent d'éliminer les protéines puis les sels à travers la membrane. Une

centrifugation à vide à une vitesse de 10000 tr/ mn pendant 1 minute est préconisée pour éliminer toute trace de solutions de lavage et pour sécher la membrane de silice (Fig. 44).

1.2.4. Elution de l'ADN

Une solution aqueuse d'élution d'ADN est préalablement chauffée dans un bain marie à une température de 95°C permettra de décrocher l'ADN de la membrane de silice en ajoutant 60 microlitres à la surface de la membrane, laissée à température ambiante pendant 1 mn puis centrifugée à une vitesse de 100000 tr/mn pendant 1 mn. L'ADN est finalement récupéré dans le tube eppendorf est prêt pour la quantification.

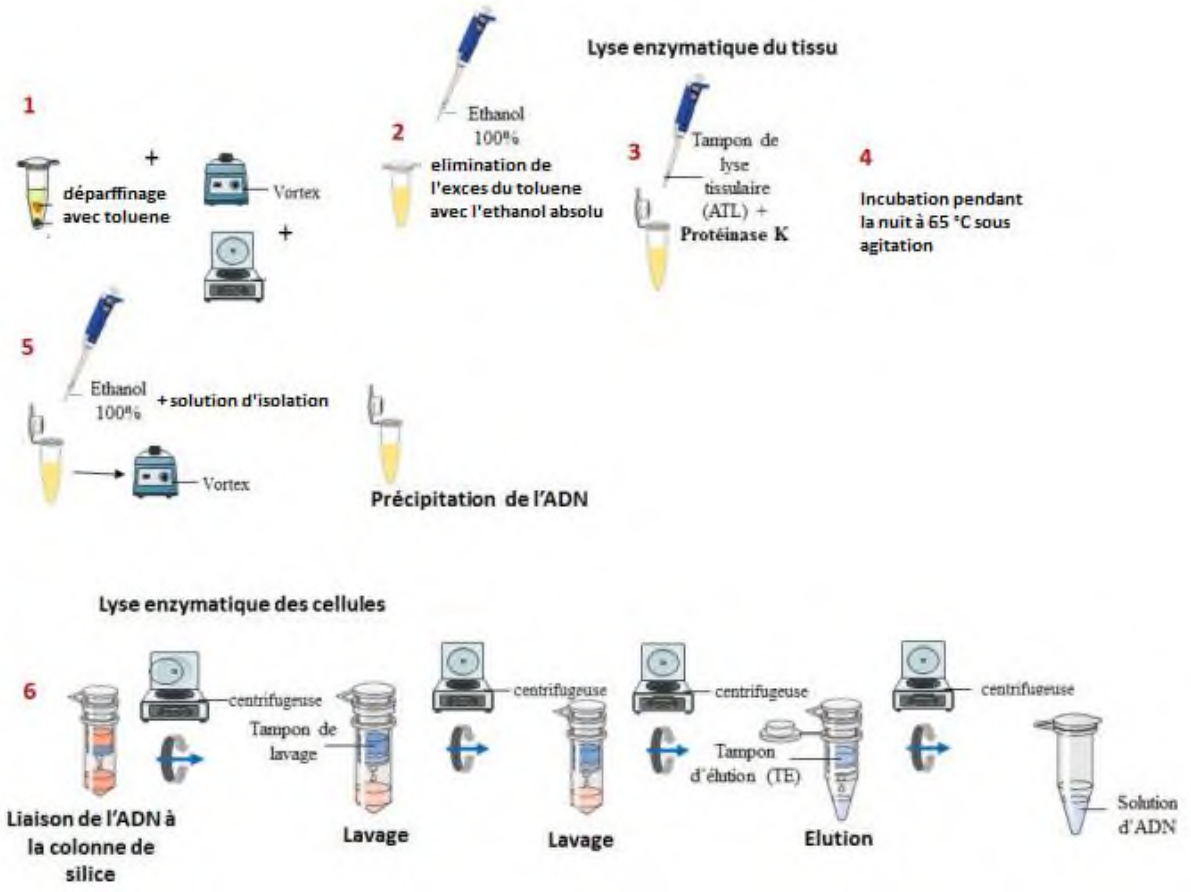


Figure 44 : Etapes d'extraction d'ADN à partir d'un tissu à l'aide du kit d'extraction Invitrogen (Schéma élaboré selon le protocole d'extraction vendu avec le kit).

1.3.5. Dosage de l'ADN extrait

a. Dosage par Nanovue TM

Pour vérifier la qualité de l'extraction et calculer la concentration d'ADN, un dosage de la solution obtenue précédemment est effectué à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanovue TM) (Fig. 45) cet appareil permet de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 260 nm, dans un volume de 2 microlitres d'échantillons.

La pureté de l'échantillon est traduite par le rapport d'absorbance A260/A280 nm. Ce rapport doit être compris entre 1.8 et 2 pour une qualité meilleure.



Figure 45 : Photo du NanovuePlus TM

Cet appareil est un spectrophotomètre permettant de mesurer la concentration des 2 µl d'échantillon déposés et d'en mesurer la concentration grâce à la loi de beer-lambert

b. Dosage par Qubit 3.0

Un autre dosage est réalisé par un fluorimetre (Qubit 3.0) (Fig. 46) par mesure de la DO à 260 nm. La pureté de l'ADN évaluée par mesure à 230 nm. Le principe du Qubit repose sur l'utilisation des amorces spécifiques à la reconnaissance des ADN. Le protocole de dosage de la concentration de l'ADN se fait comme suit :

La préparation d'un standard pour la calibration de l'appareil est une étape importante, 1 µl du réactif Qubit DNA est ajouté à 199 µl de tampon Qubit DNA. Le même mélange réactionnel est préparé pour le test d'echantillon. Les tubes à essai sont préparés selon le tableau suivant (Tableau 5).

Tableau 5 : ***Préparation du mélange réactionnel pour dosage de la concentration d'ADN***

	Standards (µl)	Echantillon (µl)
Solution de travail (préparée précédemment)	190	198
Standards (1 et 2)	10	10
ADN Volume total	---	2
Volume total	200	200

Une fois l'ADN est extrait et dosé il est conservé à -80°C pour une utilisation ultérieure



Figure 46 : ***Photo d'un Fluorométre (Qubit 3.0)***

1.3. L'amplification de l'ADN tumorale par PCR

1.3.1. Choix des Amorces

Les séquences d'amorces utilisées pour le séquençage des gènes NRAS, KRAS et BRAF ont été définies grâce au logiciel BLAST Primer qui est un logiciel accessible en ligne, vérifiées par alignement avec le programme BLAST (Tableau 6). Pour la mise au point de la réaction de PCR le choix des amorces est une étape cruciale, elles permettent d'assurer un double rôle ; en s'hybridant à l'ADN matrice, elles délimitent la région d'ADN à amplifier et avec leur extrémité 3' OH libre, elles servent d'amorce pour l'ADN polymérase. Pour favoriser une amplification il est indispensable de déterminer des températures d'hybridations comparables qui permettront l'hybridation des amorces F/R sur la matrice, de vérifier que les deux couples d'amorces ne soient pas complémentaires entre elles, sinon il y'aura une formation d'un dimère entre les deux

couples d'amorces, également la présence des séquences répétées inversées est à éviter dans le choix des amorces pour empêcher le repliement intramoléculaire.

1.3.2. Principe de la technique de PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction) permet d'amplifier *in vitro,* grâce à un appareil Thermocycleur (Fig. 47), une région spécifique d'un acide nucléique donné afin d'en obtenir une quantité suffisante pour le détecter et l'étudier. L'utilisation de la Taq polymérase, purifiée à partir de Thermus aquaticus, a simplifié les protocoles. Pour se faire, une série de réactions permettant la réplication d'une matrice d'ADN double brin est répétée en boucle. Ainsi, au cours de la réaction PCR, les produits obtenus à la fin de chaque cycle servent de matrice pour le cycle suivant, l'amplification est donc exponentielle. Cette amplification nécessite la présence de deux amorces d'orientation opposée et complémentaires de la séquence adjacente à la région cible. Pour avoir une réplication d'un ADN double brin, il faut agir en trois étapes. (1) dénaturation de l'ADN pour obtenir des matrices simple brin ; (2) hybridation des amorces spécifiques ; (3) réaliser la réaction de polymérisation du brin complémentaire par l'enzyme polymérase. A la fin de chaque cycle, les produits sont sous forme d'ADN double brin.



Figure 47 : Thermocycleur utilisé dans l'amplification de l'ADN tumorale extrait

Tableau 6 : Caractéristiques des amorces des gènes KRAS, NRAS, et BRAF

Gène (Annexe 3)	Amorce séquence F/R : (5'>3')	Taille de L'amorce (pb)
	KRAS	
Exon 2	***F:*** 5'-GGTGGAGTATTTGATAGTGTA-3'	21
	R:5'GGTCCTGCACCAGTAATATGCA-3'	22
Exon 3	***F :*** *5'-AGTAAAAGGTGCACTGTAATA-3'*	21
	R *: 5'-CTCCTTAATGTCAGCTTATTAT-3'*	21
Exon 4	***F****: 5'-CTCTGAAGATGTACCTATGGTC-3'*	22
	R*: 5'-CAGTGTTACTTACCTGTCTTGT-3'*	22
	NRAS	
Exon 2	***F*** *: 5'-ATTTGCCATAAATAAAGGC-3'*	21
	R *: 5'*-TAAATAAATTTGCCATA-3'	22
Exon 3	***F****: 5'-ACCCTCCACACCCCCAGGATT-3'*	21
	R *: 5'-CTGTAGAGGTTAATATCCGCA-3'*	21
Exon 4	***F****: 5'-CCCGTTTTTAGGGAGCAGATTA-3'*	22
	R*: 5'-CCAGAGTTAATCAACTGATGC-3'*	21
	BRAF	
Exon 15	***F****: 5'-TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG-3'*	22
	R*: 5'-GTAACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'*	22

F *: Forward (Amorce sens) ;* ***R*** *Reverse (Amorce anti-sens) ;* ***pb*** *: paire de bas*

1 .3.3. Protocole de la technique

Tous les éléments nécessaires à la réaction sont regroupés dans un tube eppendorf qui sera soumis aux différentes températures (Tableau 7, 8). Ces cycles de température sont réalisés automatiquement dans un thérmocycleur. L'amplification est effectuée en 30 cycles qui sont précédés par une étape de dénaturation de 6 mn à 94°C. Chaque cycle est constitué par les étapes suivantes : 45 secondes de dénaturation à 94°C, 30 secondes d'hybridation à une température spécifique et 30 secondes d'extension à 72°C. Les températures d'hybridation déterminées diffèrent pour chaque couple d'amorces. Les 30 cycles d'amplification sont suivis d'une étape

d'élongation de 10 min à 72°C qui permet à la Taq polymérase de terminer la synthèse des brins qu'elle n'a pas eu le temps de finir pendant les cycles précédents (Fig. 48) (Tableau 8). La PCR est réalisée automatiquement dans un thérmocycleur Applied Biosystem 2700.

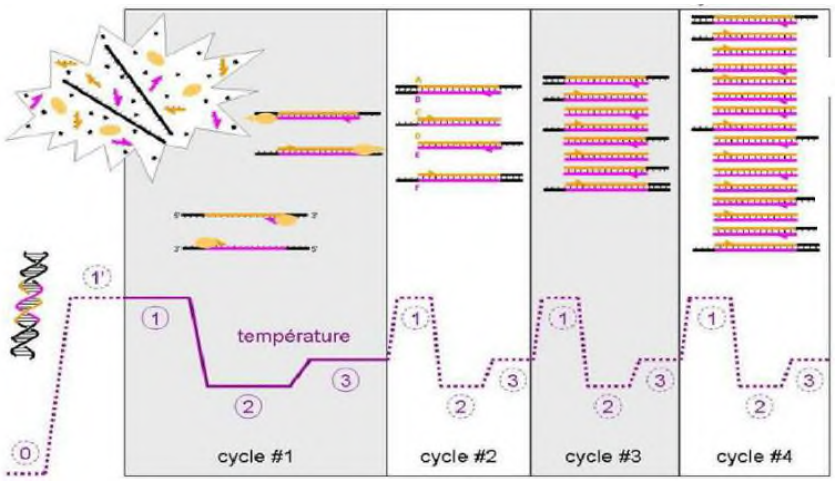


Figure 48 : Principe de la technique PCR standard (Lamoril et al., 2008)

Tableau 7 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification de l'ADN, en utilisant le Mix platinum pour l'amplification de l'exon 2 du gène KRAS et NRAS et de l'exon 15 du gène BRAF

	Concentration initiale	volume nécessaire pour une réaction (ul)
Mélange réactionnel		
Mix platinium	25ng/ul	21
Amorce F	12ng/ul	0.25
Amorce R	12ng/ul	0.25
MgCl2	20 ng/ul	1
ADN	11ng/ul	2.5

Tableau 8 : Composition du milieu réactionnel pour l'amplification de l'ADN, on utilisant le Kit green Taq polymérase pour l'amplification de l'exon 3,4 des gènes NRAS et KRAS.

	Concentration initiale	Volume nécessaire pour une réaction (µl)
Mélange réactionnel		
Mix green taq	1X	5
dNTP	(20mM)	1
Amorce F	12.5	0.5
Amorce R	12.5	0.5
Green Taq	5X	0.3
MgCl2	20 ng	2
H20	-	25
ADN	11ng/ul	2.5

Les conditions et programmes de la réaction de PCR ont été mis au point après plusieurs modifications au niveau des concentrations de l'ADN et du MgCl2 et de la température d'hybridation

Tableau 9 : Programme de la réaction de PCR pour les gènes KRAS, NRAS et BRAF

Etape	T(°C)	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	94	6 mn	1
Dénaturation	94	45 s	30
Hybridation	53*	30 s	
	60**		
Elongation	72	30 s	
Elongation Finale	72	10 mn	1

(*) : la température d'hybridation utilisée pour l'amplification de l'exon 2 du gène Kras

(**) : la température d'hybridation utilisée pour l'amplification de l'exon 3, 4 du gène Kras, et de l'exon 2,3 et 4 du gène NRAS et BRAF

1 3.4. Visualisation des produits PCR

a . Principe

Le contrôle des produits amplifiés se fait par électrophorèse sur gel d'agarose. Les ADN sont des macromolécules chargées négativement, de ce fait, l'ADN peut migrer dans un champ électrique de la cathode (-) vers l'anode (+) dans un tampon de migration (TAE ou TBE). Les échantillons sont mélangés au bleu de bromophénol, colorant qui possède une masse moléculaire faible et qui permet de détecter le front de migration. Lors de la préparation du gel d'agarose, on ajoute le BET (Bromure d'éthidium), agent intercalant qui se fixe entre les bases nucléiques à l'intérieur de la double hélice. Cette molécule est fluorescente sous UV et permet de détecter les fragments d'ADN.

b. Réactifs nécessaires

Dans un premier temps, un gel d'agarose de 2% est préparé. Pour cela, on met dans un récipient 1 g de poudre d'agarose et 50 ml de TAE 1X, on porte à ébullition puis on ajoute 2 µl de BET. Le gel est coulé dans un moule, on y installe un peigne qui sera retiré après refroidissement du gel en laissant à sa place des puits où sera déposé l'ADN.

- Poudre d'agarose
- TAE 1X
- BET à 10 mg/ml
- Solution de charge

1.4. Séquençage de l'ADN

Prenant part à la structure de l'ADN, le séquençage de l'ADN constitue une méthode dont le but est de déterminer la succession linéaire des bases A, C, G et T. l'information biologique est déterminée après la lecture de cette séquence. Le diagnostic, les études génétiques, la compréhension des mécanismes physiopathologiques, l'étude de paternité, la criminologie, la synthèse de médicaments et les enquêtes épidémiologiques représentent les champs d'application de l'analyse de la séquence d'ADN grâce à sa spécificité et son unicité.

Dans notre étude deux méthodes de séquençages ont été utilisées : le séquençage classique et le pyroséquencage. Pour les biopsies contenant un pourcentage de cellules tumorales inférieur à 30

%, ainsi que les échantillons avec des concentrations faibles d'ADN, le pyroséquencage a été utilisé comme une technique de référence grâce à sa grande spécificité et rapidité. Pour le reste des cas le séquenceur classique a été utilisé.

1.4.1. Intérêt général du séquençage

Six milliards de bases constituent le patrimoine du génome humain, en plus du petit génome localisé au niveau de la mitochondrie (16500 bases). La connaissance du génome humain a modifié considérablement les avancées dans les domaines de la recherche biologiques et biomédicales et en donnant un large accès dans le domaine de la médecine (diagnostic, thérapeutique, prédiction, pronostic, prévention.). Le séquençage constitue un remarquable instrument nécessaire à la compréhension, l'amélioration de la santé humaine et à l'équilibre écologique de la planète. Les techniques de séquençage évoluent de manière spectaculaire et révolutionnaire et leurs applications s'élargissent.

1 .4.2. Le séquençage classique de Sanger

Décrite en 1977 par Sanger, cette technique a révolutionné le monde de la biologie moléculaire grâce au décryptage du génome humain en 2006 et du génome bactérien. Bien que l'évolution d'autres techniques de séquençage ait conquis le marché, la méthode de Sanger continue d'être la méthode la plus employée dans le monde à l'heure actuelle.

Le séquençage des produits PCR a été réalisé à l'aide d'un séquenceur 3500 DX (Fig. 49), commercialisé par la société Applied Biosystems permettant l'analyse des séquences en plaques de 96 puits par électrophorèse capillaire (analyse multicapillaire en parallèle). Ce séquenceur contient huit capillaires et il permet le séquençage de 8 puits en 54 minutes.



*Figure 49 : **Le séquenceur 3500 DX utilisé pour le séquençage de l'ADN***

(laboratoire de pathologie moléculaire, CHU hASSAN II Fès)

a. Principe de la technique de Sanger

La réaction de séquence, tout comme la PCR, permet d'amplifier l'ADN cible par PCR dans un premier temps puis de le dénaturer afin d'obtenir un ADN simple brin. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), identique de celle utilisée pour la PCR, la synthèse de l'ADN complémentaire à partir de cette amorce est effectuée par une ADN polymérase. De l'extrémité 5 vers l'extrémité 3, cette enzyme ajoute d'une manière aléatoire inconstante les didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) et les désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) complémentaires, par exemple un ddGTP sera parfois ajouté à la place d'un dGTP. La réaction se faisant dans un seul tube, les ddNTP (ddATP, ddGTP, ddCTP et ddTTP) sont marqués à l'aide de fluorophores spécifiques à chaque ddNTP (fluorophores « quatre couleurs »). Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'enzyme ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête (en effet, le didéoxynucléotide ne possède pas de groupe 3-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme). Les fragments d'ADN synthétisés portant le fluorophore terminal sont appelés terminateurs d'élongation ou "BigDye Terminators". Au moins une fois, un ddNTP complémentaire sera incorporé à la place d'un dNTP, ce qui va permettre d'obtenir des fragments de tailles différentes. Une migration est ensuite effectuée par

électrophorèse capillaire, chaque fragment avec un ddNTP à son extrémité sera excité par un laser et le signal obtenu est analysé par un logiciel spécifique (Fig. 50).

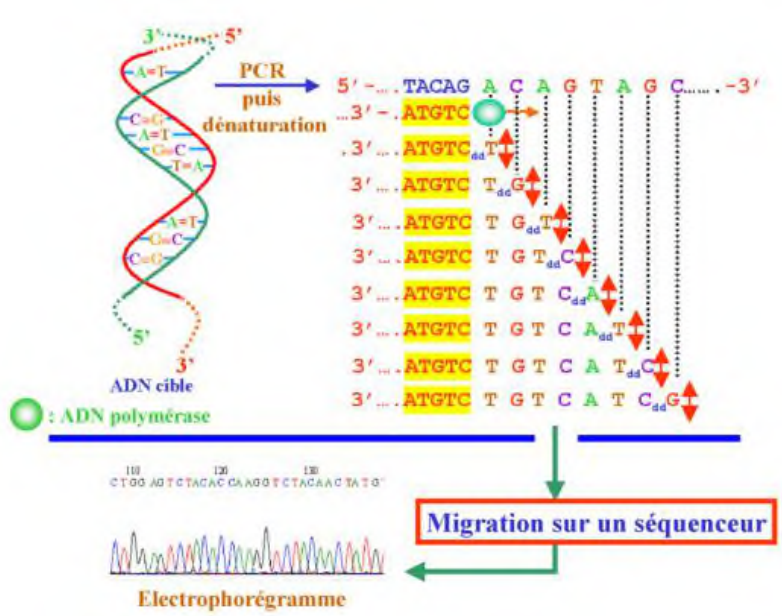


Figure 50 : ***Principe du séquençage selon la technique de Sanger*** *(Lamoril et al., 2008)*

La technologie Big Dye Terminator (BDT) utilise un système de transfert d'énergie par résonance (FRET) entre deux fluorochromes fixés sur le même ddNTP et reliés entre eux par un linker. Un premier fluorochrome donneur est une fluorescéine (6 carboxyfluoréscéine) commune aux quatre ddNTP. Le deuxième est un fluorochrome accepteur, qui est un dichlororhodamine (dRhodamine) différent pour chaque type de ddNTP. Le fluorochrome donneur est excité par un rayon laser à argon émettant à 488nm et 514,5nm. Son énergie de fluorescence émise (515-520nm) est captée intégralement par le fluorochrome accepteur qui est excité à son tour (**Fig. 51**).

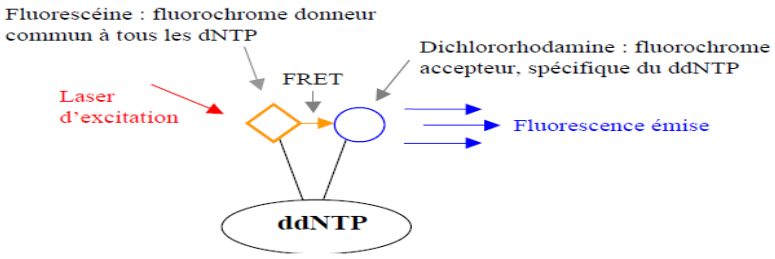


Figure 51 : Principe de la fluorescence par la technique du transfert d'énergie pas résonance

b. Protocole du séquençage Sanger

➢ La purification du produit de PCR

La purification du produit PCR consiste à éliminer les amorces et les dNTP, cela permettra de garder uniquement l'ADN à séquencer. Dans un tube eppendorf de 0.2 ml, 2.5 ul de la solution ExoSap est mise en présence de 5.5 du produit de PCR, le mélange réactionnel est ensuite déposé dans le thermocycleur selon un programme de purification qui dure 1h 30 au totale (Tableau 10).

Tableau 10 : Programme de purification du produit de la PCR

stade	Température (°C)	Temps
1	37	30
2	80	15

➢ La réaction de séquence

La réaction de séquence est identique à celle de la PCR, elle permet l'élongation de chaque produit monobrin et se termine par l'incorporation d'un ddNTP spécifique (Tableau 11).

Tableau 11 : Programme de la réaction de séquence

	Température	Temps	cycles
1	**96°C**	**1 min**	**1**
2	**96°C**	**10 s**	**25**
	50°C	**5s**	
	60°C	**4 min**	
3	**10°C**	∞	**1**

La réaction de séquençage est réalisée à l'aide d'un Kit « ABI®BigDye® Terminator V1.1 cycle sequencing », un mix constitué du BigDye (Taq polymérase, dNTP, ddNTP, ddNTPmarqués, tampon, MgCl2), de l'amorce sens ou antisens qui correspond à la séquence en question, de l'eau

purifiée stérile (Tableau 12) et du produit PCR purifié préparé dans un tube eppendeorf puis incubé dans le thermocycleur suivant le programme illustré dans le tableau 13.

Tableau 12 : Volumes des réactifs du mix pour la réaction de séquence

Mélange réactionnel	BigDye (µl)	Amorces 10mM (µl)	Pr. PCR purifié (µl)	Eau stérile (µl)	Volume finale (µl)
Tube 1 F (contenant les amorces F)	**1.5**	**1**	**5.5**	**3**	**11**
Tube 1 R (contenant les amorces R)	**1.5**	**1**	**5.5**	**3**	**11**

Tableau 13 : Programme de la réaction de séquence

Nombre de cycles	**Température (°C)**	**Temps**	**Cycles**
1	**96**	**1**	**1**
2	**96**	**10 s**	**25**
	50	**5 s**	
	60	**4 min**	
3	**10**		**1**

- **Purification de la réaction de séquence**

Le principe de la purification consiste à éliminer l'excès des réactifs de la réaction de séquençage pour ne pas gêner le séquençage. La purification de la réaction de séquence est réalisée à l'aide d'un Kit **«** BigDye® XTerminator™ purification Kit » constitué du SAM™Solution (tampon), et du BigDye®XTerminator™Solution (résines). 45 ul du SAM, 10 ul du BigDye et 5 µl du produit de la réaction de séquence sont mélangés dans un tube eppendorf de 0.2 ul. Le mélange est ensuite mis sous agitation forte pendant 30 mn puis centrifugé 2 mn à 13 000 tr/mn. Dans une plaque de séquençage 13 ul du surnageant sont déposés puis le programme est lancé sur le séquenceur 3500 DX.

c. Analyse des séquences

Une analyse informatique des signaux est nécessaire, elle permet d'obtenir la séquence étudiée représentée sous forme d'un électrophorégramme. Le logiciel d'analyse des séquences utilisé est le « séquencing analysis ». L'analyse d'un fragment d'ADN après PCR se fait toujours à l'aide d'une amorce sens et anti-sens afin de confirmer la séquence et une éventuelle anomalie de séquence. En général, cette technique permet d'obtenir des séquences de longueur comprise entre 400 et 850 pb.

1.4.3. Le pyroséquencage

Décrit la première fois en 1985, le pyroséquençage est une nouvelle technologie permettant l'analyse en temps réel de la synthèse d'ADN (Ronaghi et al., 1998). Cette méthode totalement automatisée et performante permet de séquencer des courts fragments d'ADN, c'est pour cela qu'elle a eu une indication limitée dans le séquençage. Le pyroséquenceur Pyromark therascreen KRAS a été utilisé pour le séquençage de l'ADN tumoral dans notre étude pour certains cas (Fig. 52). Il a une sensibilité supérieure en cas de faible pourcentage de cellules tumorales.



Figure 52 : Le pyroséquenceur utilisé au laboratoire de pathologie moléculaire du CHU HASSAN II, Fès

a. Principe du pyroséquencage

Il s'agit d'une hybridation d'une amorce à l'ADN cible amplifié auparavant par PCR (Fig.53), suivie de l'ajout dans l'ordre et séquentiellement d'une base à partir de l'extrémité 3' de l'amorce

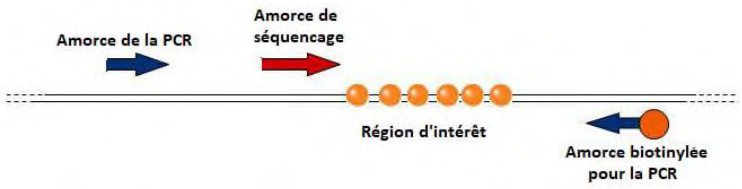


Figure 53 : Utilisation d'une sonde biotinylée pour la réalisation d'un Pyroséquençage (Lamoril et al., 2008)

Un fluorophore spécifique permet de marquer chaque base, l'incorporation d'une base complémentaire de la cible conduit à l'émission d'un signal mesuré par bioluminescence. L'ordre d'incorporation des nucléotides sur l'ADN complémentaire de la cible néosynthétisée détermine la séquence en question (Fig. 54).

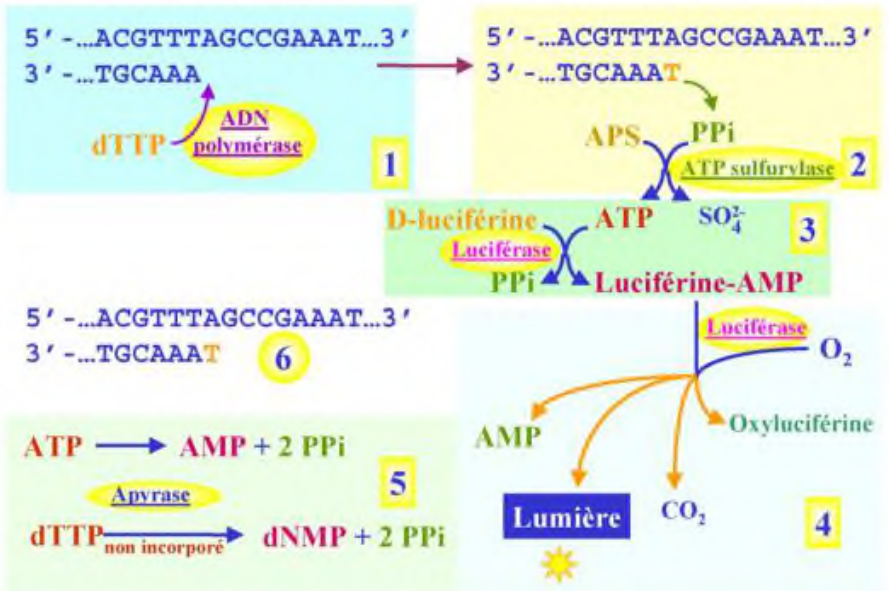


Figure 54 : Principe de la technique du pyroséquencage de l'ADN (Lamoril et al., 2008)

b. Protocole du pyroséquençage

La procédure therascreen KRAS Pyro se déroule en plusieurs étapes, la configuration du test, et du fichier d'analyse est l'étape initiale de cette technique. L'utilisation de contrôle non méthylé en tant qu'un témoin positif pour les réactions de PCR et de séquençage est nécessaire pour l'interprétation correcte des résultats et la détection des mutations avec un faible niveau. En plus

l'utilisation d'un témoin négatif est également primordiale pour au moins un test, durant chaque configuration. Le séquençage de l'ADN extrait est réalisé par le kit therascreen KRAS Pyro selon les étapes suivantes :

- PCR : amplification de la région contenant les codons d'intérêt. Un mélange réactionnel contenant tous les composants nécessaires à la PCR est ensuite préparé (Tableau 14).

Tableau 14 : Préparation du mélange réactionnel pour le mélange d'amorce PCR.

Mix de la réaction de PCR	Volume/réaction (µl)
Master Mix PCR PyroMark, 2x	12.5
Coralload concentré 10x	2.5
Amorce PCR (KRAS,NRAS)	1
Eau	4
Volume total	20

Un volume de 5 µl d'ADN matrice est ensuite ajouté aux tubes contenant le mélange réactionnel. La réaction de PCR est réalisée à l'aide d'un thermocycleur selon les conditions décrites dans le tableau 15.

L'étape de dénaturation consiste à activer la polymérase HotStarTaq ADN à une température de 95°C pendant 15 mn (Tableau 15).

Tableau 15 : Protocole de cycle optimisé de la PCR

	Durée	température	
Etape d'activation initiale	15 mn	95°C	La HotStarTaq ADN polymérase est activée par cette étape de réchauffement
Cycle d'amplification			
Dénaturation	20 secondes	95°C	42 cycles
Hybridation	30 secondes	53°C	
Extension	20 secondes	72°C	
Extension finale	5 minutes	72°C	

- Immobilisation des produits PCR: Après amplification de l'ADN matrice, une immobilisation du produit PCR biotinylé sur les billes de sépharose recouverte de streptavidine est ensuite réalisée. Le mélange d'immobilisation de l'ADN est préparé conformément au tableau 16.

Tableau 16 : Mélange d'immobilisation de l'ADN.

Composant	Volume/échantillon (**µl**)
Sépharose streptavidine haute performance	2
Tampon de liaison PyroMark	40
Eau	28
Volume total	70

Dans les puits d'une barrette de PCR on ajoute 70 µl du mélange d'immobilisation préparé et 10 µl de produit PCR. La plaque est ensuite bien scellée puis passée à une agitation pendant 5 à 10 mn à 1400 tr/mn.

- Préparation et purification des échantillons dans la station de travail : Cette étape permet la préparation et le lavage de l'ADN simple brin. En effet, les deux brins d'ADN sont séparés grâce à la solution du NaOH suivi d'un lavage avec l'alcool à 70 °, puis avec un tampon de lavage commercialisé (Wash) afin de neutraliser les monobrins d'ADN immobilisés. La dernière étape consiste à un largage des produits lavés dans les puits de la plaque pyroMark Q24 Adv, cette dernière contient dans chaque puit une seule amorce spécifique à la séquence d'intérêt. La plaque est ensuite placée à une température de 80°C pendant 2 mn ensuite un refroidissement progressif à température ambiante ne dépassant pas 5 mn permettra l'hybridation des amorces (Fig. 55)

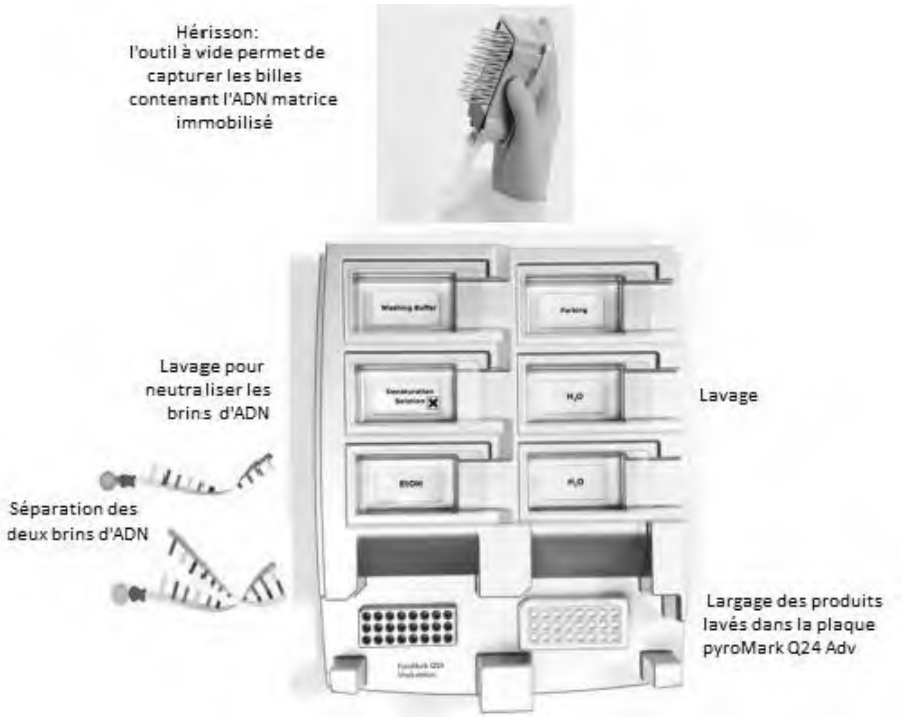


Figure 55 : Illustration d'une station de travail pour la préparation de l'ADN et sa purification

- Séquençage : Un remplissage de la cartouche PyroMark Q24, placée à une température ambiante, par des volumes appropriés en nucléotides (A, T, C, G) calculés par le logiciel selon le nombre des échantillons à séquencer, une enzyme (E) et un substrat (S) est réalisé (Fig. 56). La cartouche est ensuite insérée dans le séquenceur pyroMark Q24 ainsi que la plaque pyroMark Q24 Adv contenant les produits PCR à séquencer.

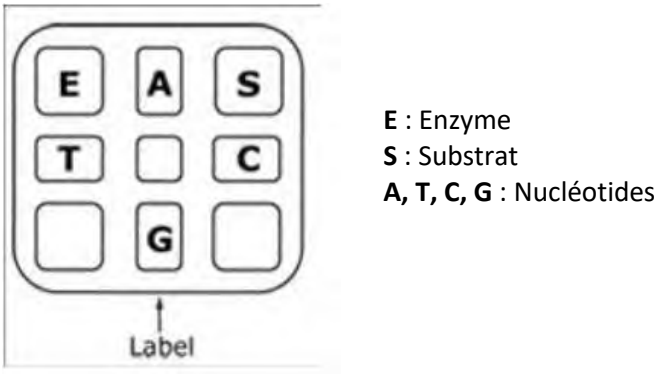


Figure 56 : Illustration de la cartouche PyroMark Q24 (Vue de dessus)

(Ronaghi et al., 1998)

- Analyse d'un résultat avec PyroMark Q24

Les puits sont analysés pour détecter les mutations. Les résultats préliminaires sont présentés dans un rapport complet avec un tableau qui récapitule toute l'analyse (Tableau 17).

Tableau 17 : exemple d'un tableau récapulatif des résultats

Well	Sample ID	Result	Frequency [% units]	Nucleotide Substitution	Amino Acid Substitution	Info
A1	106506B1	Mutation	28.8	GGT>AGT	G12S	
A2	1090814B	Wildtype				
A3	110456B2	Potential low level mutation	2.3	GGT>AGT	G12S	⚠
A4	110457B2	Wildtype				
A5	110462A2	Wildtype				
A6	110486A2	Mutation	24.9	GGT>GCT	G12A	
A7	111207A2	Mutation	31.6	GGT>GTT	G12V	
A8	111555A2	Mutation	39.7	GGT>GAT	G12D	
B1	111565A2	Mutation	37.5	GGT>GAT	G12D	
B2	111667A2	Mutation	26.7	GGT>GTT	G12V	
B3	111670A2	Wildtype				

.

Les échantillons sont analysés par rapport à une limite de détéction (LoD) :

-Type sauvage : si la fréquence des mutations est inférieure à la LoD.

-Type muté avec un faible niveau : si la fréquence des mutations est supérieure au LoD et inférieure à une valeur égale à la somme du LoD + 3unités. Dans ce cas on refait l'analyse depuis le début.

-Mutation d'un niveau fort : si la fréquence de la mutation est supérieure à la LoD+ 3 unités.

IV. Etude des caractéristiques des ganglions lymphatiques

Le statut des ganglions lymphatiques(GL) dans les adénocarcinomes localement avancés du rectum est considéré comme un facteur pronostique critique dans sa gestion actuelle (Mechera et al., 2017). En outre, le statut métastatique des ganglions lymphatiques constitue un facteur prédictif des résultats de survie des patients atteints d'un cancer rectal et est largement utilisé pour la stratification pronostique (Gunderson et al., 2010; Paraf and Sabourin, 2000).

Selon le Comité Américain sur le Cancer (8ème édition de l'AJCC), un nombre de 12 Ganglions doivent être disséqués, afin d'éviter une sous-estimation de la stadification et un résultat faussement négatif de l'atteinte des ganglions lymphatiques en raison d'un échantillonnage insuffisant (Edge and Compton, 2010; Tong et al., 2018; Vather et al., 2011). Le nombre des ganglions lymphatiques disséqués est également impliqué dans la décision post-thérapeutique du cancer du rectum.

Dans cette partie nous allons étudier les caractéristiques morphologiques, histologiques et réactionnelles des ganglions lymphatiques de 149 cas de cancers rectaux. Les caractéristiques du nombre, de la taille, des centres germinatifs, de l'effraction capsulaire en cas de ganglion métastatique, l'effet thérapeutique dans les ganglions lymphatiques ont été analysés sur pièce opératoire.

Deux groupes de patients ont été déterminés ; un groupe de bon répondeur qui a une réponse thérapeutique sur pièce opératoire classée Dvorak 3, et 4, et un deuxième groupe de non répondeurs qui a une réponse thérapeutique classée Dvorak 1, 2, et 3.

1. Détermination du nombre des ganglions lymphatiques

Les pièces de résection rectales adressées au laboratoire d'anatomie pathologique ont été traitées selon les recommandations de la 8e édition du système de classification TNM. L'examen des ganglions lymphatiques a été réalisé par une simple palpation de la graisse du mésorectum pour s'assurer de prélever le maximum possible de ganglions qui peuvent être présents.

Un deuxième groupe de 21 patients pour lesquels une chirurgie seule a été réalisée comme traitement curatif a été traité avec la même procédure pour analyser l'effet du traitement néoadjuvant sur la taille et le nombre des ganglions lymphatiques. Ce groupe a été considéré comme un groupe contrôle de l'étude.

Les patients de l'étude ont été répartis en 2 groupes selon le nombre des ganglions inférieur à 12 et supérieur ou égal à 12 puis comparer aux différentes caractéristiques clinicopathologiques.
Le ratio des ganglions lymphatiques a été défini comme le rapport entre le nombre des ganglions métastatiques et le nombre de tous les ganglions disséqués.

2. Détermination de la taille des ganglions lymphatiques

La taille des ganglions lymphatiques correspond à la mesure du grand diamètre des ganglions lymphatiques coupés finement sur lames colorées à l'HES. Les deux groupes d'étude et de contrôle ont été traités de la même manière.

3. Centres germinatifs dans les ganglions lymphatiques.

Les centres germinatifs constituent des sites intenses de prolifération, de sélection, de maturation et de mort cellulaire. Ils apparaissent dans les ganglions lymphatiques après stimulation par un antigène témoignant d'une réponse immunitaire. Dans notre contexte, nous avons analysé les ganglions lymphatiques par rapport à la présence ou l'absence des centres germinatifs ainsi que le nombre des ganglions lymphatiques exprimant des centres germinatifs clairs.

4. L'invasion extra-capsulaire (IEC) dans les ganglions lymphatiques.

L'invasion extra-capsulaire, ou l'effraction (rupture) capsulaire est définie comme une extension des cellules tumorales au-delà de la capsule des ganglions lymphatiques pour se retrouver dans le tissu péri-ganglionnaire. Dans notre étude nous avons essayé d'analyser la présence ou l'absence de l'IEC sur les ganglions métastatiques.

5. L'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques

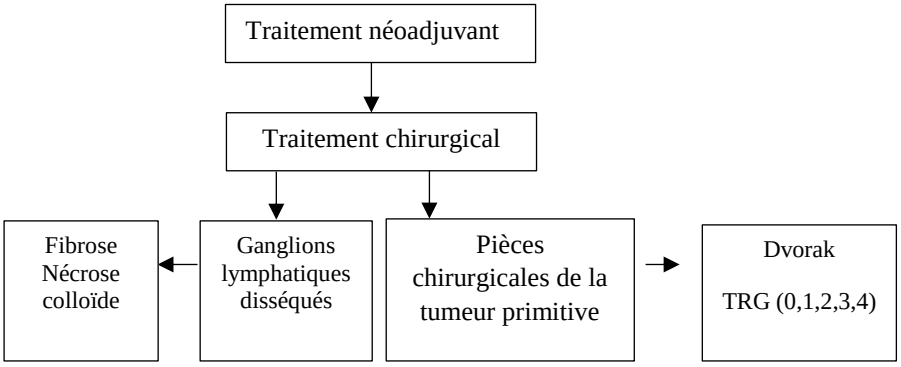
La présence de colloïde, fibrose, et de nécrose ont été déterminés comme des éléments définissants la présence ou l'absence d'effet thérapeutique après traitement néoadjuvant dans les ganglions lymphatiques.

L'examen histologique de l'effet thérapeutique a été réalisé par une analyse au microscope optique sur des lames de ganglions lymphatiques colorés avec la coloration HES. Une détermination de la régression tumorale sur les ganglions lymphatiques a été estimée d'une manière qualitative. Pour cela nous avons répartis cette réponse en six groupes suivant : la figure 57 :

- Groupe F+ : Correspondant à la présence d'un effet thérapeutique sous forme de fibrose seule non associée à un autre effet thérapeutique.
- Groupe N+ : Correspondant à la présence d'un effet thérapeutique sous forme de nécrose seule sans association à un autre type de réponse histologique.
- Groupe C+ : Correspondant à la présence d'une réponse thérapeutique sous forme de colloïde sans association à un autre type de réponse thérapeutique.
- Groupe 2+ : Correspondant à la présence de deux effets thérapeutique dans le même ganglion lymphatique
- Groupe 3+ : Correspondant à la présence de trois effets thérapeutiques dans le même ganglion lymphatique.
- Groupe 0ET : Définissant un groupe qui ne présente aucune réaction thérapeutique après traitement.

Ensuite, un second regroupement a été réalisé en associant les groupes 2+ et 3+ dans un seul groupe à effet mixte. Puis la recherche d'une association entre l'effet thérapeutique selon les différents groupes et la survie globale ainsi que la survie sans rechute a été analysée.

a



b

Approche de la régression tumorale sur les ganglions lymphatiques selon les catégories				Régression Tumorale répartit en 5 groupes
Fibrose	Colloïde	Nécrose	RT sur ganglions lymphatique	
+	-	-	F+	F+
-	+	-	C+	C+
-	-	+	N+	N
+	+	+	3+	EM
-	+	+	2+	
+	+	-	2+	
+	-	+	2+	
-	-	-	0ET	0ET

Figure 57 : (a) Schéma générale décrivant la procédure d'analyse de l'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques. (b) Evaluation de l'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques selon les différentes catégories

ET: *Effet thérapeutique.* ***0ET:*** *Absence d'effet thérapeutique.* ***2+:*** *Présence d'une combinaison entre les deux effets thérapeutiques .* ***3+:*** *Présence d'une combinaison entre les trois effets thérapeutiques.* ***F+:*** *Présence d'une fibrose seule.* ***C+:*** *Présence de colloïde seule.* ***N+****: Présence d'une nécrose seule.* ***ME****: Un effet mixte.* ***N*** *: n'est pas retrouvé isolé.*

V. Analyse statistique des données

1. Méthodes statistiques

Les variables quantitatives sont décrites avec la moyenne, l'écart-type. Les variables qualitatives sont décrites par la fréquence et le pourcentage.
L'association entre les caractéristiques clinico-pathologiques et les critères histopathologiques de la pièce de résection rectale et des ganglions lymphatiques a été analysée par le test de Chi^2 ou le test exact de Fisher. La corrélation entre le nombre des ganglions positifs et le nombre total du curage ganglionnaire a été calculée par le test de spearman.

Le calcul du nombre des sujets nécessaires dans cette étude épidémiologique descriptive transversale a été réalisé selon une formule proposée dans le cas d'une variable qualitative (pourcentage).

2. La survie globale (SG)

La survie globale a été définie par la durée en mois entre le début du diagnostic et la date de décès (toutes causes) ou la date de censure qu'il soit perdu de vu ou vivant à la fin du traitement initial et la première rechute de la maladie.

3. La survie sans rechute (SSR)

La survie sans rechute est la durée en mois calculée entre la date du diagnostic du cancer rectal et la date d'apparition de récidive locale et/ou à distance (métastases) ou la date de censure correspondant à la date où il a été vu pour la dernière fois (perdu de vu) ou la dernière date de consultation.

Les courbes de SSR et SG en fonction des caractéristiques clinicopthologiques, histopathologiques et moléculaires ont été établies en utilisant une régression logistique à l'aide des courbes de Kaplen-Meier. Les résultats sont décrits en fréquence cumulative et l'intervalle de confiance de 95%. Toutes les analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le logiciel SPSS version 21. Le niveau de signification a été fixé à 0,05.

VI. Réponse thérapeutique

La réponse thérapeutique a été analysée selon plusieurs méthodes afin d'obtenir des résultats comparatifs avec ceux publiés dans la littérature. Dans une première classification nous avons réparti nos patients en deux groupes de réponse thérapeutique : un premier groupe de répondeurs correspondant à une régression complète et presque complète (Dworak 3 et 4) et un deuxième groupe de non répondeurs correspondant à des tumeurs présentant une régression modérée, minimale et celles ne présentant aucune régression (Dworak 0, 1 et 2). Ensuite, l'analyse a été également réalisée par comparaison à deux groupes de réponse thérapeutique, selon qu'elle soit complète (Dworak 4) ou incomplète (Dworak, 0, 1, 2, 3). Nous avons aussi identifié deux groupes selon le pourcentage de cellules résiduelles : un groupe de répondeurs avec un pourcentage de régression tumorale supérieur à 50 %, et un groupe de non répondeurs avec un pourcentage de régression tumorale inférieur à 50 %.

Résultats

Partie I. Caractéristiques démographiques et tumorales de la population étudiée.

1. Caractéristiques démographiques

Ce travail, intitulé « Biomarqueurs pronostiques et prédictifs de réponse au traitement néoadjuvant dans les cancers rectaux localement avancés », s'intègre dans les projets de recherche translationnelle de l'Unité d'Anatomie Pathologique et de Pathologie Moléculaire au Centre Hospitalier Universitaire de Fès et du laboratoire de Recherche Biomédicale et Translationnelle à la Faculté de Médecine et de Pharmacie de Fès.

250 patients atteints de cancers rectaux, suivies au CHU HASSAN II, de Fès entre 2011 et 2018, ont été sélectionnés pour cette étude rétro-prospective transversale.

1.1. Répartition des patients en fonction de l'année du diagnostic du cancer du rectum

La figure 58 illustre le nombre de cas recrutés dans notre série d'étude en fonction des années. La majorité des cas était diagnostiquées entre 2015 et 2018

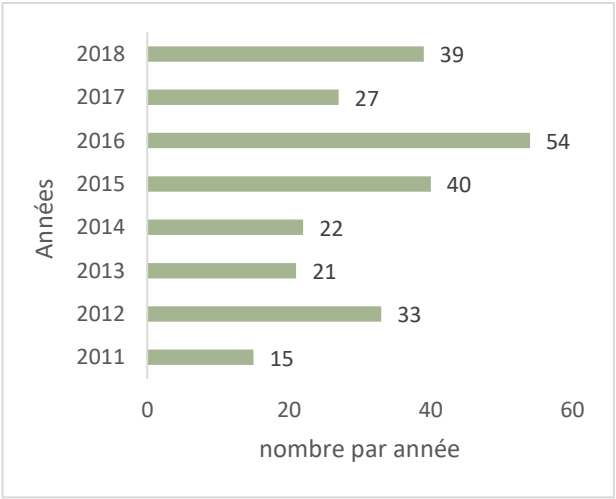


Figure 58 : Répartition des patients en fonction de l'année du diagnostic du cancer du rectum

1.2. Répartition des cas selon leur provenance

La ville de Fès est la 2ème plus grande ville du Maroc, située à 180 km à l'est de Rabat, entre le massif du Rif et le Moyen Atlas avec une population de 1 112 072 habitants selon le recensement de 2014. Les patients recrutés dans notre étude et ayant été suivis au niveau du CHU HASSAN II, de Fès sont originaires et habitant dans 6 régions du Maroc représentées dans notre étude par 22 villes Marocaines. 199 patients inclus dans notre étude (79.6%) sont des habitants de la ville de Fès (Fig. 59)

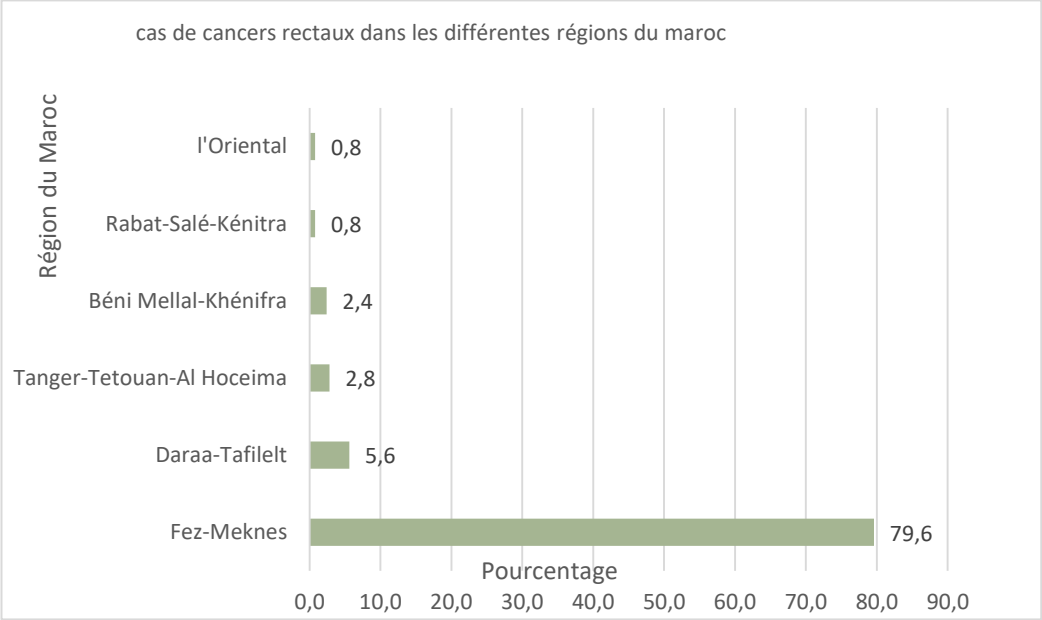


Figure 59 : Répartition des patients selon leur provenance

1.3. Répartition des cas selon l'âge

L'âge moyen au diagnostic des patients recrutés dans notre étude était de 56 ans (ET : 14.54). L'âge moyen des hommes était de 58 ans et 54 ans pour les femmes. 184 patients(65.6%) étaient âgés de plus de 50 ans. La figure 53 montre que les tranches d'âge les plus touchées par ce type de cancer sont situées entre 40 et 70 ans et plus de 25 % ont moins de 50 ans (Fig. 60).

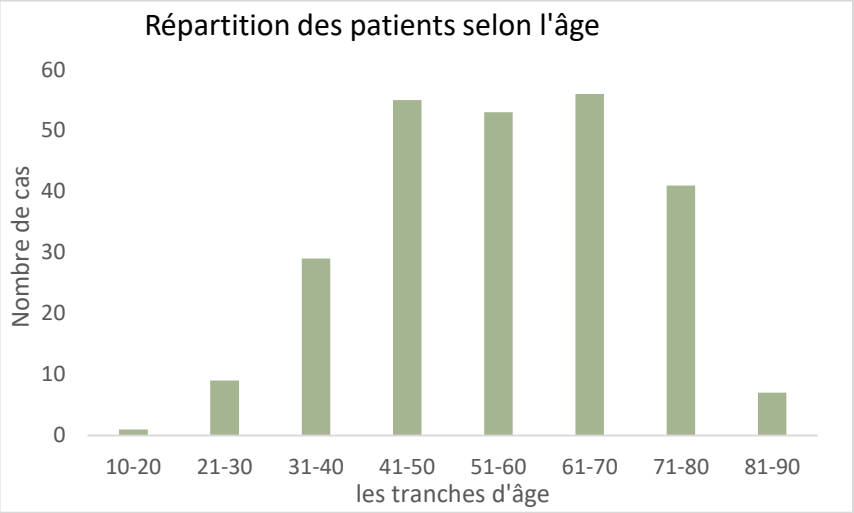


Figure 60 : Répartition des patients selon les tranches d'âges

1.4. Répartition des cas selon le sexe

L'analyse statistique de nos résultats révèle une légère prédominance féminine à 50.8 %, soit 127 cas avec un sex-ratio de 1.3. 123 patients (49.2%) étaient des hommes. La figure 61 montre une prédominance masculine dans la tranche d'âge au-delà de 51 ans.

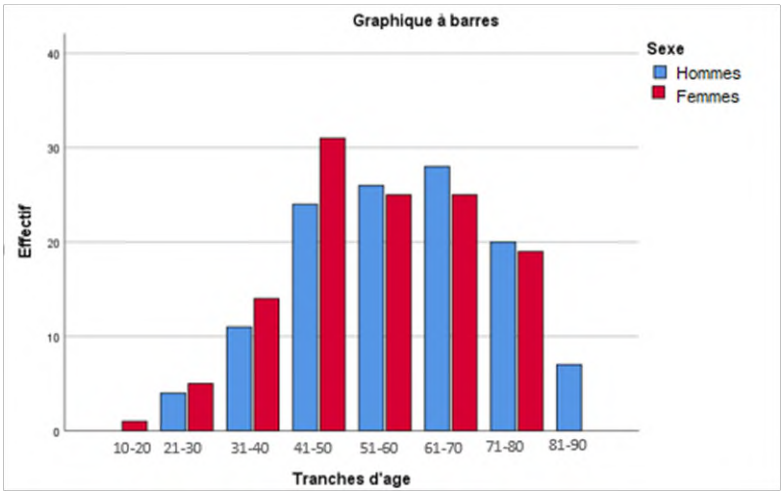


Figure 61 : Répartition des patients selon les tranches d'âge et le sexe

1.5. Localisation de la tumeur

La localisation la plus fréquente dans cette étude était le bas rectum retrouvée chez 120 cas, suivie par le moyen et haut rectum dans 108 et 22 cas respectivement. La moyenne de l'étendu tumorale dans les pièces de résection post thérapeutiques était de 2.88 cm (0-10 cm ; médiane, 3cm).

1.6. Répartition des patients selon les signes évocateurs

Les cancers rectaux se développent souvent en silence sans provoquer de symptôme particulier. Ils peuvent rester longtemps imperceptibles. Dans notre étude, sur le plan clinique les rectorragies étaient présentent dans 75.9% des cas, suivies par le syndrome rectal retrouvé dans 50%. La diarrhée avec ou sans constipation a occupé 15.5 % de tous les signes (Fig. 62). Les douleurs abdominales et les hémorroïdes n'étaient que rarement révélatrices, avec des proportions de 6.3% et de 4.36%, respectivement.

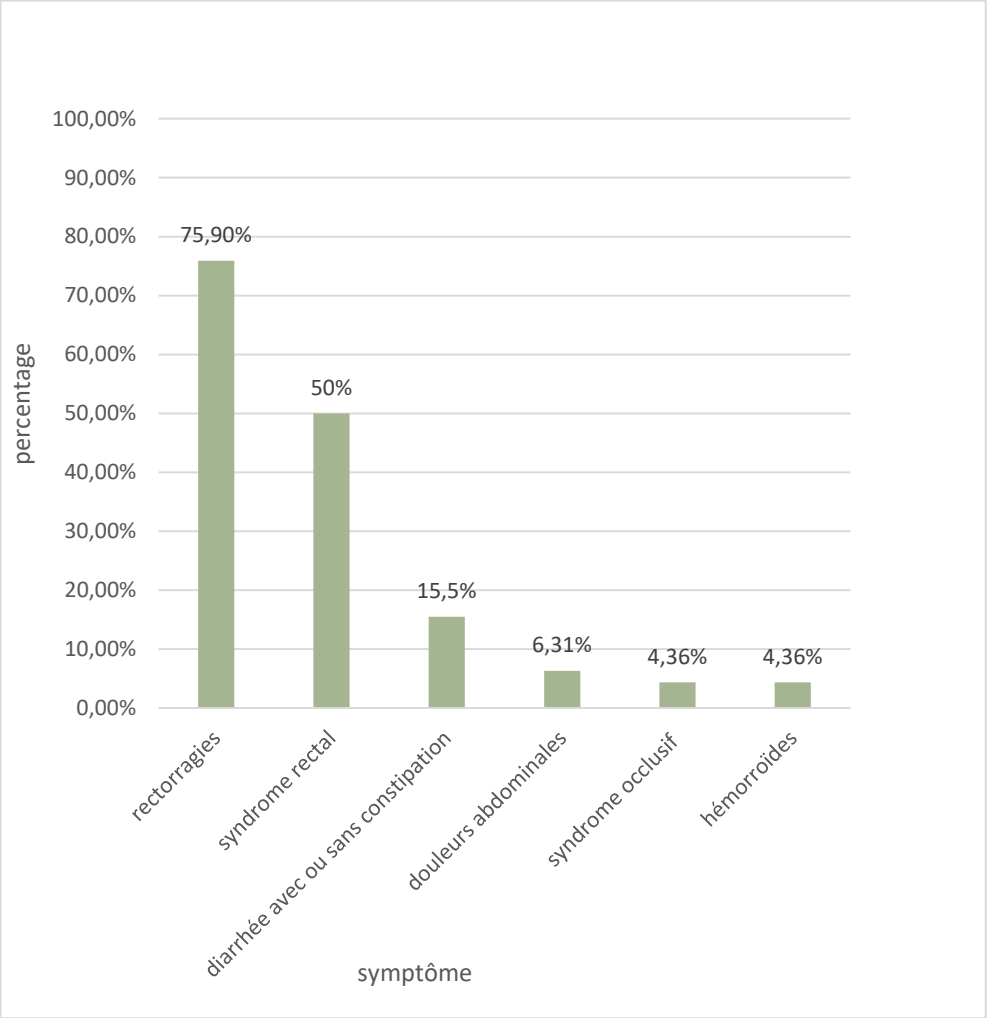


Figure 62 : Les signes cliniques évocateurs du cancer rectal dans notre population

1.7. La durée moyenne du diagnostic

La durée moyenne du diagnostic du cancer du rectum dans notre série était de 7.35 mois. Le délai moyen entre la fin du traitement néoadjuvant et la chirurgie était de 10.93 semaines avec une médiane de 8.5 semaines.

14.8 % (n=37) des patients sont décédés, la présence de métastases a été rapportée chez 75 patients (32%). Un taux de récidive de 7.6%(n=18) a été enregistré dans notre population.

1.8. Type de chirurgie réalisée

Parmi les 250 patients, 198 (79.28%) ont été opérés pour une résection antérieur du rectum et 52 (20.8%) ont été opérés pour une résection abdominopérinéale.

1.9. Traitement néoadjuvant

Un protocole long de chimioradiothérapie (RCC) a été administré chez 182 patients (72.2%), alors qu'une radiothérapie exclusive a été pratiquée dans 27.2% (n= 68) des cas.

1.10. La survie des patients

La période moyenne de suivi était de 32 mois allant de 0 à 100 mois au cours de laquelle 18 patients qui ont récidivé (7,6%), 37 sont décédés (14,8%) et 75 patients ont présenté des métastases (32%) au cours de l'évolution.

La durée moyenne de survie sans rechute (SSR) a été de 70 mois avec un intervalle de 64,1 à 65,9 mois. La médiane était de 83,6 mois allant de 78,8 à 88,4 mois.

Les taux de survie à 5 ans de la SSR et de la survie globale (SG) étaient respectivement de 87% et 94,3% **(**Fig. 63**).**

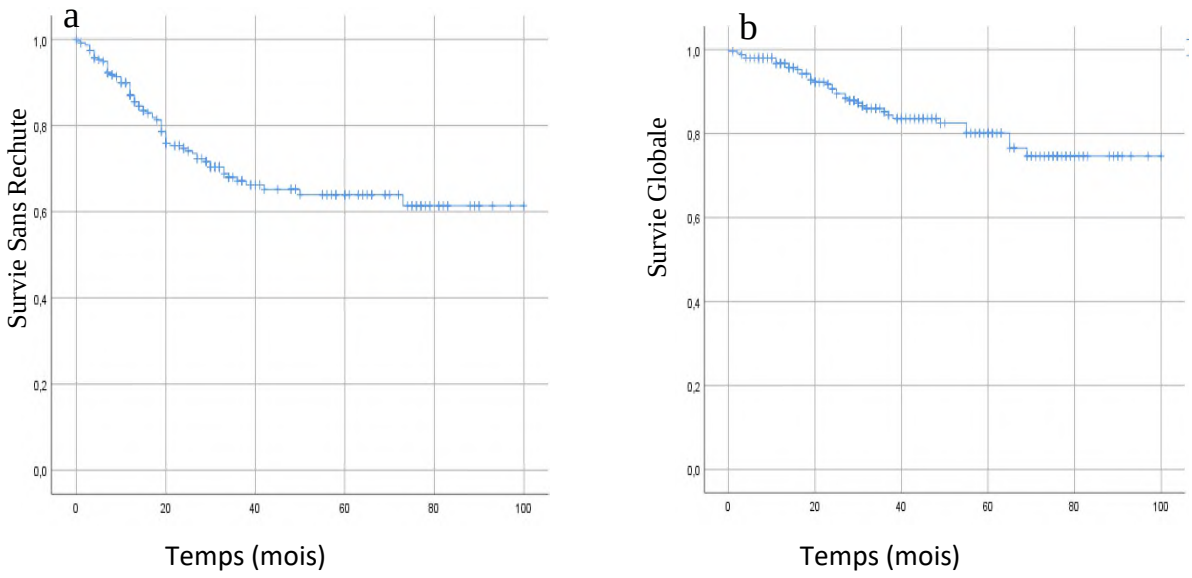


Figure 63 : Courbes de Kaplan Meier (a). La survie sans rechute, (b). la survie globale

2. Caractéristiques anatomopathologique de la tumeur

2.1. Sur biopsie

L'adénocarcinome rectal est le type histologique le plus dominant dans notre série observé dans 235 tumeurs (94%), suivi du carcinome mucineux et du carcinome à cellules indépendantes en bague à chaton dans 15 cas (6%) (Tableau 18).

123 des adénocarcinomes (49.2%) étaient bien différenciés, 110 étaient moyennement différenciés et seulement 9 et 8 étaient respectivement indifférenciés et peu différenciés respectivement.

2.2. Sur pièce opératoire

Selon la classification de Dvorak, l'absence des cellules tumorales viables caractérisant une stérilisation complète de la tumeur a été retrouvée chez43 cas (17.2%) (Dvorak 4). Une régression tumorale incomplète a été retrouvée chez 8 cas (3.6%), 42 cas (16,6%), 78 cas (31,2%), 79 cas (31,4%), et ont été classés Dworak 0. 1, 2, 3 respectivement (Tableau 18).

Après traitement néoadjuvant la classification ypTNM (5e édition AJCC 2018) des tumeurs de notre série a permis de classer 43 cas en ypT0, 9 cas en ypT1, 71 cas en ypT2, 118 cas en ypT3, et 9 patients en ypT4. Le statut ganglionnaire a été réparti en deux groupes ; le groupe ypN0 incluant 175 cas et le groupe ypN positif incluant 75 cas.

39 des tumeurs (15,6%) étaient classées dans le stade 0, 57 (22,8%) dans le stade I, 69 (28,4%) dans le stade II, 67 dans le stade III (26,8%) et 16 étaient classés dans le stade IV (6%).

Une invasion vasculaire a été retrouvée dans 19 cas (7.6%), et 29 cas (11.6%) ont présenté un engainement périnerveux.

Tableau 18 : Caractéristiques démographiques et clinicopathologiques des patients

Caractéristiques clinicopathologiques	Totale	n	Patients (%)
Caractéristiques des patients			
Age (moyenne, Ecart Type)	250	56 (14.54)	
Médiane		57	
extrêmes		17-88	
Age moyen homme		58.35	
Age moyen femme		53.37	
Age	250		
≤50		86	34.4
>50		164	65.6
Sexe	250		
Homme		123	49.2
Femme		127	50.8
Caractéristiques de la tumeur			
Localisation de la tumeur	250		
haut		22	8.8
moyen		108	43.2
bas		120	48
Type histologique	250		
Adenocarcinome		235	94
Carcinome Mucineux/cellules en bague à chaton		15	6
Degrés de différenciation	250		
bien		123	49.2
moyen		110	44
peu		8	3.2
indifférencié		9	3.6
Regression tumorale selon Dvorak	250		
0		8	3.2
1		42	16.8
2		78	31.2
3		79	31.6
4		43	17.2
Invasion perinerveuse	248		
absence		219	88.3
presence		29	11.7
Invasion vasculaire	248		
absence		229	92.3
presence		19	7.7
Caractéristiques du traitement			
Traitement néoadjuvant	250		
Chimioradiothérapie (long)		182	72.8
Radiothérapie exclusive (RT)		68	27.2
Traitement adjuvant	228		
oui		118	51.75
non		110	48.25

Type de chirurgie	250		
Résection antérieure		198	79.2
Résection abdominopérinéale		52	20.8
Limite circonférentielle	243		
Negative ≥2mm		203	83.5
Positive < 2mm		40	16.5
Statut de la limite de résection	247		
Negative (R0)		231	93.5
Positive (R+)		16	6.5
Stade ypUICC	250		
0		39	15.6
I		58	23.2
II		72	28.8
III		69	27.6
IV		12	4.8
ypT	250		
0		43	17.2
1		9	3.6
2		71	28.4
3		118	47.2
4		9	3.6
ypN	250		
N0		175	70
N1		49	19.6
N2		26	10.4
Nombre de ganglions lymphatiques disséqués	245		
moyenne		12.08	
Médiane		11	
extrêmes		1-40	
Ecart type		6.09	
Délai entre le diagnostic et la dernière consultation(mois)	250		
moyenne		38	
Médiane		32	
extrêmes		0-100	
Ecart Type		24	
Délai entre apparition des symptômes et le diagnostic	235		
moyenne		7.35	
Médiane		4	
extrêmes		1-127	
ET		11.99	
Décès	250		
décédés		37	14.8
vivant/perdu de vue		213	85.2
Métastases	229		
oui		75	32
non		154	68
Récidives	236		
oui		18	7.6
non		218	87.2

3. Etude analytique

3.1. Corrélation entre la réponse thérapeutique et les différents paramètres clinicopathologiques

Deux groupes ont été répartis selon la méthode de Dvoark : Parmi les 250 tumeurs analysées, 128 (51.2%) étaient définit comme groupe de non répondeurs contre 122 (48.8%) de répondeurs (Tableau 19).

L'analyse de l'association entre la réponse thérapeutique après traitement néoadjuvant et les critères clinicopathologiques a montré que dans le groupe des patients ayant recu la RCT comme traitement néoadjuvant 78.7 % ont été des répondeurs contre 67.2% de non répondeurs ***(p=0.041)***.

Une résection antérieure du rectum a été réalisée chez 72.7 % des patients répondeurs par rapport à 86 % des non répondeurs ***(p= 0.031).***

La résection était complète (R0) chez 97,5% des répondeurs et 89,6% chez les non-répondeurs (***p = 0,018***). De même, l'invasion périnerveuse était absente chez 95% des répondeurs et 81,9% chez les non-répondeurs (***p = 0,001***). Les tumeurs sans invasion vasculaire ont été observées chez 96,7% des répondeurs et chez 88,2% des non-répondeurs (***p = 0,016***).

Parmi les répondeurs, 35.2 % étaient au stade pathologique ypT0 (***p <0,0001***). En outre, il y avait une différence au stade ypT pathologique entre les deux groupes, ypT1 était obsérvé chez 7.4 % des cas du groupe de répondeurs et chez 1.6 % des cas du groupe de non-répondeurs, et 29,5% de ypT3 chez les répondeurs contre 64,1% chez les non-répondeurs. (***p <0,0001***).

Aussi, les répondeurs avaient un ypN0 de 77,9%, contre 62,5% dans le groupe de non-répondeurs (***p = 0,008***).

Tableau 19 : Association entre les critères clinicopathologiques et la réponse thérapeutique

Caractéristiques clinicopathologiques	Groupe de non répondeurs N=128	Groupe de répondeur N=122	P value
Age (moyenne; ET)	57 (128; 14.2)	54 (122;14.8)	0.217
Age			
≤50	40 (31.3)	46 (37.7)	0.173
>50	88 (68.8)	76 (62.3)	
Sexe			
Homme	63 (49.2)	60 (49.2)	0.548
Femme	65 (50.8)	62 (50.8)	
			49,8
Type histologique			
Adenocarcinome	122 (95.3)	113 (92.6)	0.265
Carcinome Mucineux/cellules en bague à chaton	6 (4.7)	9 (7.4)	
Degrés de différenciation			
bien	59 (46.1)	64 (52.5)	0.266
moyen	62 (48.4)	48 (39.3)	
peu	2 (1.6)	6 (4.9)	
indifférencié	5 (3.9)	4 (3.3)	
Localisation			
haut	58 (45.3)	62 (50.8)	0.591
moyen	57 (44.5)	51 (41.8)	
bas	13 (10.2)	9 (7.4)	
Traitement néoadjuvant			
Chimioradiothérapie (long)	86 (67.2)	96 (78.7)	**0.041**
Radiothérapie exclusive (RT)	42 (32.8)	26 (21.3)	
Type de chirurgie			
Résection antérieure	93 (72.7)	105 (86.1)	**0.031**
Résection abdominopérinéale	35 (27,3)	17 (13.9)	
Limite circonférentielle			
Negative ≥2mm	90 (74,4)	113 (92.6)	**<0.001**
Positive <2mm	31 (25,6)	9 (7.4)	
Statut de la limite de résection			
Negative (R0)	112 (89,6)	119 (97.5)	**0.018**
Positive (R+)	13 (10,4)	3 (2.5)	
Invasion perinerveuse			
absence	23 (18.1)	6 (5)	**0.001**
presence	104 (81.9)	115 (95)	
Invasion vasculaire			
absence	15 (11.8)	4 (3.3)	**0.016**
presence	112 (88.2)	117 (96.7)	
Stade ypUICC			
0	0 (0)	37 (30.3)	**<0.001**
I	27(20.9)	33 (27)	
II	51 (39.8)	21 (17.2)	
III	46 (35.9)	23 (18.9)	
IV	4 (3.1)	8 (6.6)	

ypT			
0	0(0)	43 (35.2)	**<0.001**
1	2(1.6)	9 (7.4)	
2	38 (29.7)	33 (27)	
3	82 (64.1)	34 (27.9)	
4	6 (4.7)	3 (2.5)	
ypT			
0-2	40 (31.3)	83 (68)	**<0.001**
3-4	88 (68.8)	39 (32)	
ypN			
N0	80 (62.5)	95 (77.9)	**0.008**
N1	28 (21.9)	21 (17.2)	
N2	20 (15.6)	6 (4.9)	
Taille de la tumeur après traitement néoadjuvant (moyenne en cm)			
(N;ecart type)	3.30 (106; 1.54)	2.48 (108;1.82)	**<0.001**
Nombre de ganglions lymphatiques disséqués			0.103
moyenne (N;SD)	12.71 (128; 6.69)	11.41 (122; 5.83)	
Ratio des ganglions lymphatiques positifs			**0.002**
moyenne (N;SD)	0.341 (48; 0.221)	0.228 (29; 0.218)	
Nombre de ganglions lymphatiques			
<12	59 (46.1)	70 (57.4)	0.078
≥12	69 (53.9)	52 (42.6)	
Déces			
Cas décédés	26 (20.3)	11 (9)	**0.013**
Censurés	102 (79.7)	111 (91)	
Métastases			
oui	42 (35.9)	33 (29.5)	0.326
non	75 (64.1)	79 (70.5)	
Récidives			
oui	13 (10.8)	5 (4.3)	0.059
Non	107 (89.2)	111 (47)	

Dans l'analyse multivariée la marge de résection circonférentielle (HR: 3,154; IC 95%: 1,265-7,861; p = 0,014), le type de résection (HR: 0,190; IC 95%: 0,042-0,849; p = 0,030), le ratio du nombre des ganglions lymphatiques positifs (HR: 0,030; IC à 95%: 0,002-0,391; p = 0,007) et les stades ypUICC (II: HR: 0,142; IC à 95%: 0,021-0,974; p = 0,047, III: HR: 0,050; IC 95%: 0,007-0,329; p = 0,002, IV: HR: 0,172; IC 95%: 0,030-0,969; p = 0,046) étaient les paramètres clinico-pathologiques indépendamment associés à la réponse histologique au traitement néoadjuvant (tableau 20).

Tableau 20 : L'analyse multivariée des résultats significatifs dans l'analyse univariée

Variables significatives	HR	95% CI	P value
La limite circonférentielle	3.154	1.265-7.861	0.014
Le statut de la résection	0.190	0.042-0.849	0.030
Le ratio du nombre ganglions positifs	0.030	0.002-0.391	0.007
ypUICC stage			
0	reference	-	-
I	4.729	0.314-71.196	0.261
II	0.142	0.021-0.974	0.047
III	0.050	0.007-0.329	0.002
IV	0.172	0.030-0.969	0.046

L'estimation globale de la SSR chez les répondeurs était supérieure à celle des non- répondeurs (74,3% contre 65,5%).

Pour la survie globale, le groupe de répondeurs présentait des taux plus élevés (89,2%) par rapport aux non-répondeurs (78%). À 5 ans, la SSR du groupe des répondeurs était meilleure que celle des non-répondeurs (75,3% contre 68,7%). La différence n'était pas statistiquement significative (***p = 0,35***). De même, la SG dans les deux groupes montrait des tendances similaires (p = 0,088) (Fig.64).

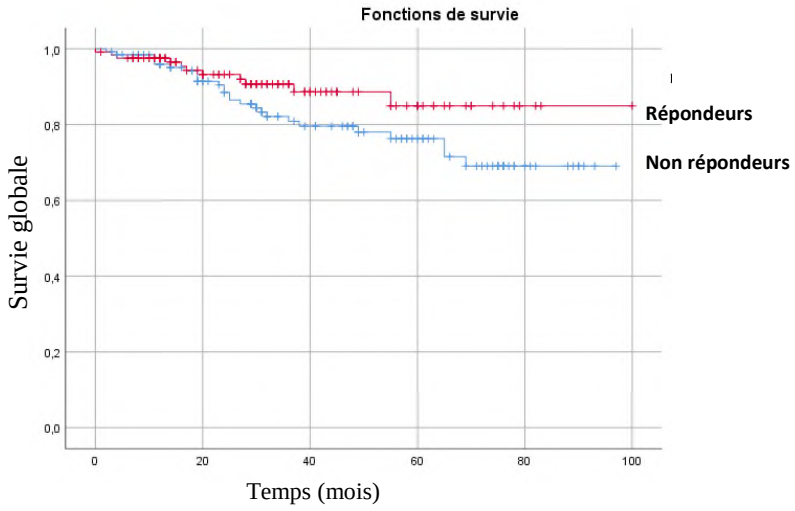


Figure 64 : Courbes de Kaplan Meier de la survie globale en fonction de la réponse thérapeutique

Partie II. Caractéristiques des ganglions lymphatiques

1. Etude descriptive

1.1. Nombre des ganglions lymphatiques

149 patients ont été inclus dans cette analyse. Le tableau 21 représente les caractéristiques clinicopathologiques de notre population.

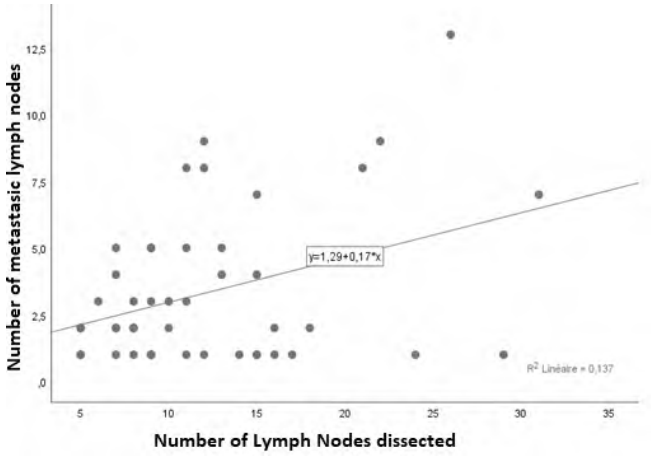
Un nombre totale de 1889 ganglions lymphatiques (GL) ont été disséqués (moyenne 12.68 ; intervalle, 1à 40, médiane 12), un nombre totale de ganglions métastatiques égale à 156 GL positifs (moyenne, 1,05; intervalle, 0-13; médiane, 0,01) a été disséqué chez 47 patients.

Tableau 21 : .Caractéristiques clinicopathologiques des deux groupes

	Groupe d'étude N=149(%)	Groupe contrôle N=21(%)
Caractéristiques clinicopathologiques des patients		
Age (Moyenne,ET)	**56.38 (14.69)**	**63.57-(15.95)**
médiane	**57**	**64**
extrêmes	**22-88**	**30-84**
Age		
≤50	**55(36.9)**	**4(19)**
>50	**94(63.1)**	**17(81)**
Sexe		
Homme	**70(47)**	**12(57)**
Femmes	**79(53)**	**9(42.9)**
Type histologique		
Adénocarcinome	**145(97.3)**	**21(100)**
Carcinome mucineus/cellules en bague à chaton	**4(2.7)**	**0**
Degrés de différenciation		
Bien/moyen	**141(94.6)**	**21(100)**
Peu/indifférencié	**8(5.4)**	**0**
localisation		
haut	**11 (7.4)**	**20(95.3)**
moyen	**65 (43.6)**	**1(4.7)**
bas	**73 (49)**	**0**
Traitement néoadjuvant		
Chimioradiothérapie	**47 (31.5)**	-
Radiothérapie exclusive (RT)	**102 (68.5)**	-
Type de chirurgie		
Amputation abdominopérinéale	**33 (22.1)**	-
Résection antérieure du rectum	**116 (77.9)**	**7(33)**
Résection colique	-	**14(67)**
Limite circonférentielle		
Negative≥2mm	**22(14.8)**	**0**
Positive< 2mm	**127(85.2)**	**21(100)**
Statut de la résection		
Negative (R0)	**141(94.6)**	**20(95.2)**
Positive (R+)	**8(5.4)**	**1(4.8)**

Regression Tumorale selon le grading (Dvorak)		
0	**5(3.4)**	-
1	**17(11.4)**	-
2	**44(29.5)**	-
3	**58(38.9)**	-
4	**25(16.8)**	-
Invasion périnerveuse		
présence	**19(12.8)**	**2(9.5)**
absence	**130(87.2)**	**19(90.5)**
Invasion vasculaire		
Présence	**8(5.4)**	**3(14.3)**
absence	**141(94.6)**	**18(85.7)**
Stade ypUICC		
0	**22(14.8)**	**0**
I	**36(24.2)**	**3(14.3)**
II	**40(26.8)**	**12(57.1)**
III	**42(28.2)**	**5(23.8)**
IV	**9(6)**	**1(4.8)**
YpT /pT		
0	**24(16.1)**	**0**
1	**5(3.4)**	**0**
2	**46(30.9)**	**4(19)**
3	**72(48.3)**	**15(71.4)**
4	**2(1.3)**	**2(9.5)**
ypN		
N0	**102(68.5)**	**16(76.2)**
N1	**32(21.5)**	**3(14.3)**
N2	**15(10.1)**	**2(9.5)**
Les caractéristiques des ganglions lymphatiques		
Nombre de ganglions lymphatiques		
< 12	**72(48.3)**	**1(5)**
⩾12	**77(51.7)**	**20(95)**
Ganglions lymphatiques		
Moyenne (SD)	**12.68 ± 6.69**	**16.57 ± 15.95**
Médiane	**12**	**16**
Extrêmes	**1-40**	**2-29**
Ratio du nombre des ganglions positifs		
moyenne(SD)	**0.49 ± 0.32**	**Non évalué**
Médiane	**0.46**	**Non évalué**

L'analyse de la corrélation entre le nombre de ganglion totale et le nombre de ganglions positifs, avec le test de corrélation de Spearman a montré que le nombre des GL métastatiques était significativement corrélé avec le nombre total de GL disséqués (***P = 0.001***) (Fig. 65).



	Nombre de ganglions métastatiques		
	r	**Moyenne**	**P**
Nombre de ganglions disséqués	**0.37**	**3.34±2.83**	**0.001**

Figure 65 : Corrélation entre le nombre des ganglions métastatiques et le nombre totale des ganglions disséqués

1.2. Taille des Ganglions lymphatiques

La taille moyenne de tous les GLs non métastatiques et métastatiques disséqués était de 3,3 mm (intervalle, 2-20; médiane, 3,2 mm). Le nombre de 12 GLs a été atteint chez 79 patients (53%) versus 70 patients (47%) qui ont moins de 12 GLs disséqués (Tableau 22).

Tableau 22 : Taille des ganglions lymphatiques dans les deux groupes

Taille des ganglions lymphatiques	Groupe d'étude N=149(%)	Groupe contrôle N=21(%)
Taille de tous les ganglions lymphatiques		
Moyenne(ET)	**3.30 ± 1.10**	**4.22 ± 1.18**
Médiane	**3.2**	**4**
Extrêmes	**1.75-11**	**2.7-6.8**
La taille des ganglions lymphatiques positifs		
Moyenne (ET)	**4.01 ± 2.07**	**5.7±2.14**
Médiane	**3.6**	**5**
intervalle	**1-14**	**4-9.5**

2. Etude analytique

2.1. Comparaison des caractéristiques ganglionnaires entre le groupe d'étude et le groupe contrôle

Parmi les 149 patients du groupe d'étude ayant reçu un traitement néoadjuvant et 21 patients du groupe témoin ayant eu une chirurgie d'emblée sans traitement néoadjuvant, l'âge moyen dans le groupe d'étude et le groupe témoin était de 56,38 ans et 63,57 ans respectivement. Le nombre d'adénocarcinomes diagnostiqués dans le groupe d'étude était de 145 (97%) versus 21 (100%) dans le groupe témoin.72 cas étaient bien différenciés dans le groupe d'étude et 9 dans le groupe contrôle.

Selon la classification de la AJCC 2018, 29 patients (19,5%) avaient un stade 0 / I dans le groupe d'étude et aucun patient n'avait ce stade dans le groupe contrôle, 72 patients (48,3 %) du groupe d'étude avaient un stade III versus 15 (71%) patients du groupe d'étude (***p = 0,016***)((Tableau 23).). le nombre moyen des GLs examinés étaient respectivement de 12,68 et 16,29 dans le groupe d'étude et le groupe contrôle avec une différence statistiquement significative (***p = 0,012***).

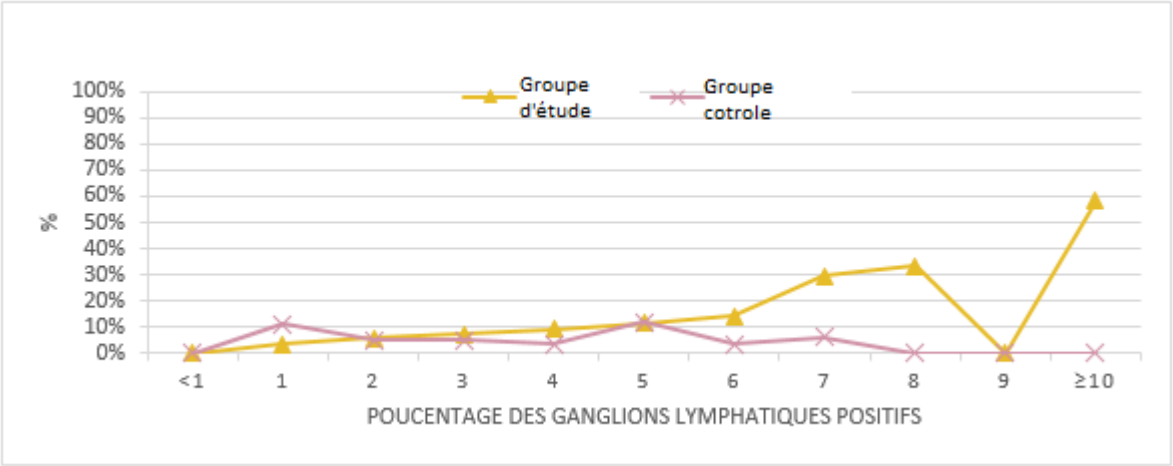
La taille moyenne des GLs était de 3,30 mm dans le groupe d'étude contre 4,22 mm dans le groupe contrôle (***p = 0,000***). Au totale, 77 patients (51,7%) du groupe d'étude et 20 patients (95,2%) du groupe contrôle avaient un nombre de ganglions lymphatique ⩾12 LN (***p = 0,000***).

Tableau 23 : Comparaison entre le groupe d'étude et le groupe contrôle

	Groupe d'étude N=149(%)	Groupe contrôle N=21(%)	P value
Age ,moyenne (ET)	**56.38 (14.69)**	**63.57 (15.95)**	**0.062**
Age			
≤50	**55(36.9%)**	**4(19%)**	**0.143**
>50	**94(63.1%)**	**17(81%)**	
Sexe			**0.488**
homme	**71(47%)**	**12(57.1)**	
femme	**8(52.3%)**	**9(42.9)**	
Type histologique			
Adenocarcinome	**145(97)**	**21(100)**	**0.749**
Carcinome Mucineux/cellules en bague à chaton	**4(2.6)**	**0(0)**	
Degrés de différenciation			**0.428**
bien	**72(48)**	**9(42.9)**	
moyen	**69(46.3)**	**12(57.1)**	
peu/indifférencié	**8(5.4)**	**0(0)**	

Statut des limites de résection			**0.90**
Négatif (R0)	**141(94.6%)**	**20(95.2)**	
Positif (R+)	**8(5.4)%**	**1(4.8)**	
Invasion perinerveuse			
absence	**19(12.8)**	**2(9.5)**	**1**
présence	**130(87.2)**	**19(90.5)**	
Invasion vasculaire			
absence	**8(5.4)**	**3(14.3)**	**0.140**
présence	**141(94.6)**	**18(85.7)**	
YpT stade /pT stade			
0	**24(16.1)**	**0**	**0.016**
1	**5(3.4)**	**0**	
2	**46(30.9)**	**4(19)**	
3	**72(48.3)**	**15(71.4)**	
4	**2(1.3)**	**2(9.5)**	
ypN statut			**0.73**
N0	**102(68.5)**	**16(76.2)**	
N1	**33(22.1)**	**3(14.3)**	
N2	**14(9.4)**	**2(9.5)**	
Nombre de ganglions lymphatiques disséqués moyenne(ET)	**12.68 (6.69)**	**16.29 (5.61)**	**0.012**
Taille des ganglions lymphatiques disséqués moyenne(ET)	**3.30 (1.10)**	**4.22 (1.18)**	**0.000**
Nombre des ganglions lymphatiques	**72 (48.3)**	**1 (4.8)**	**0.000**
< 12	**77 (51.7)**	**20 (95.2)**	
⩾12			
Taille des ganglions métastatiques (moyenne**)**	**4.01 ± 2.07**	**5.7 ± 2.14**	**0.15**

La variation du nombre des GL métastatiques en fonction de la taille de GL chez les patients du groupe d'étude et le groupe contrôle est illustré dans la figure 64. Le nombre des ganglions métastatique était le même pour les ganglions mesurant entre 2 et 5 mm et dans les deux groupes, alors que le pourcentage de métastases était de 33,3% chez GL mesurant 8 mm dans le groupe d'étude versus 0% pour la même taille de groupe contrôle. Les courbes sont presque identiques pour les tailles inférieures à 5 mm, alors qu'elles sont différentes au-delà de 5 mm.



Taille (mm)		<1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	≥10
Groupe d'étude n=1889	N° Total des GLs. n=1889	17	228	510	476	340	175	78	34	15	4	12
	N° Total des GL métastatiques n=156	0	8	29	35	31	20	11	10	5	0	7
	Pourcentage des métastases (%)	0	3,5	5,68	7,35	9,11	11,4	14,1	29,4	33,3	0	58,3
Groupe contrôle n=330	N° Total des GLs n=330	16	186	399	375	269	134	55	21	10	4	16
	N° des GLs métastatiques n=20	0	5	18	18	24	13	9	11	5	1	7
	Pourcentage des métastases (%)	0	11,1	5,26	5,17	3,64	12,0	3,57	6,25	0	0	0

Figure 66 : Pourcentage de métastases en fonction de la taille des ganglions lymphatiques dans les deux groupes

2.2. Le ratio des ganglions positifs

47 patients ont été classés dans le stade III (tous ypT, N+), le ratio moyen des GL (RGL) est de 0.29 ± 0.20 (intervalle = 0.03-0.75; médian = 0.25). La détermination de la valeur seuil prédictive d'apparition des métastases (récidives à distance) et récidives locales (rechute) a été égale à RGL= 0.13, avec 86% de sensibilité, et 47% de spécificité. La zone sous la courbe (AUC) a été estimé à 60 % (CI à 95%, 0.41 to 0.76 %, p=0.08).

Deux groupes ont été distingués selon la valeur seuil du ratio des GL ; un premier groupe qui ont une valeur RGL< 0.13, et un deuxième groupe qui ont une valeur RGL LNR2 ≥ 0.13 (Fig. 67).

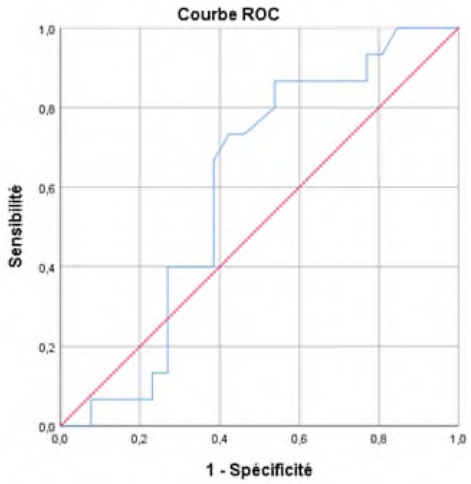


Figure 67 : Caractéristiques (ROC) de comparaison du ratio des GL positifs et l'apparition de rechute (valeur seuil 0.13), AUC, 60%, sensibilité : 86 %, spécificité : 47 %)

L'analyse de la survie en fonction des deux groupes déterminé selon le ratio des ganglions lymphatiques positif a montré que la probabilité de survie sans rechute est égale à 57% ((HR, 5.24, CI, 95%, 47.65-68.2%) pour le groupe 1, et de 49 % pour le groupe 2 (HR, 6.82, CI, 95%, 35.69-62.43%), (***p=0.089***).

2.3. Comparaison des centres germinatifs avec les caractéristiques clinicopathologiques

L'analyse a concerné dans cette partie 141 patients. Le nombre de centres germinatifs (CG) a été calculé par une simple lecture microscopique sur les coupes histologiques des ganglions lymphatiques colorés au HES (Fig. 68) et disséqués sur les pièces de résection rectale après traitement néoadjuvant.

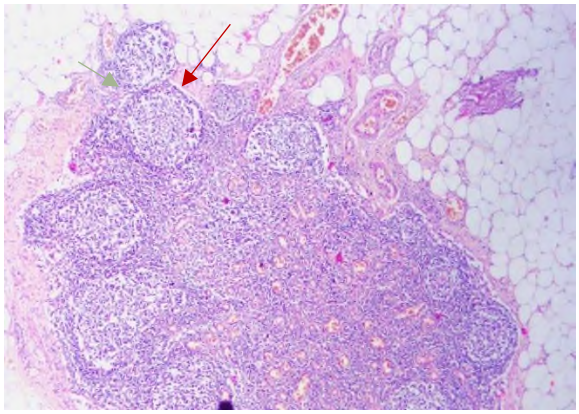


Figure 66. *Coupe histologique d'un ganglion lymphatique avec des centres germinatifs (Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)*

Le Tableau 24 présente la moyenne du nombre de centres germinatifs selon chaque paramètre clinicopathologique. Le nombre moyen des ganglions lymphatiques avec CG a été de 7.54 ± 6.20 chez les patients qui ont un âge inférieur à 50 ans, contre seulement 5.43± 5.13 pour ceux qui ont un âge supérieur à 50 ans (p=0.046). En plus les patients qui ont des tumeurs sans invasion vasculaire ont présenté un nombre de ganglions lymphatique avec CG supérieur à ceux qui ont des tumeurs avec invasion vasculaire (6.35±5.65 versus 2.75±2.86, *p=0.009*).

Une association significative a été retrouvée entre l'absence de métastases ganglionnaires et le nombre de CG dans les ganglions lymphatiques, 6.76±6.05 chez les ganglions négatifs versus 4.84±4.20 chez les ganglions positifs (p=0.032).

Aucune association n'a été trouvée entre le nombre des centres germinatifs et les autres paramètres.

Tableau 24 : Associations entre le nombre des centres germinatifs et les différentes caractéristiques clinicopathologiques

Caractéristiques clinicopathologiques	Nombre de CG moyenne ± Ecart type	p value
Age		
≤50	7.54 ± 6.20	**0.046**
>50	5.43 ±5.13	
Sexe		
homme	6.40 ± 5.39	**0.622**
Femme	5.93 ± 5.78	
Degrés de différentiation		
bien/Moyen	6.04±5.56	**0.398**
Peu/indifférencié	8.00±6.04	
Type de chirurgie		
Amputation abdominopérinéale	6.88±7.06	**0.480**
Résection antérieur du rectum	6.04±5.23	
Invasion périnerveuse		
Oui	5.74±4.24	**0.670**
Non	6.21±5.78	
Invasion Vasculaire		
OUI	2.75±2.86	**0.009**
Non	6.35±5.65	
Statut ypN		
N0	6.76±6.05	**0.032**
N+	4.84±4.20	
ypT		
T1-T2	5.88±5.42	**0.588**
T3-T4	6.39±5.76	
Métastases		
OUI	5.00±4.17	**0.044**
NON	6.83±6.23	
Récidives		
Oui	5.92±3.94	**0.841**
Non	6.17±5.73	
Traitement néoadjuvant		
Rcc	4.79 ± 3.7	**0.001**
RT	8.87 ± 7.46	
Réponse thérapeutique		
Répondeurs	6.54±5.76	**0.396**
Non répondeurs	5.74±5.41	

2.4. Analyse de la survie en fonction de l'effraction capsulaire et du nombre global des ganglions lymphatiques et du ratio des ganglions positifs.

La moyenne de la survie globale a été de 70.49 mois allant de 66.30 à 74.68 mois. La survie globale à 5ans a été de 80% dans notre série. La moyenne de la survie sans rechute a été de 60.57 mois allant de 54.79 à 66.34 mois.

La survie globale en fonction du nombre de ganglions lymphatiques (< 12 et ⩾ 12) a été de 69.79 mois chez les patients avec un nombre < 12, et de 69.4 mois chez les patients avec un nombre ⩾ 12 (Fig. 68).

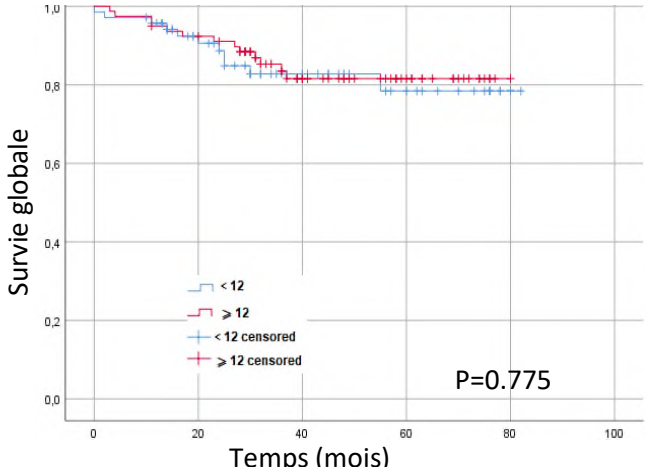


Figure 68 : Les courbes de survie globale en fonction du nombre des ganglions lymphatiques

La moyenne de survie sans rechute calculée en fonction de l'effraction capsulaire (ECLNI) a été de 44.58 (25 -63) mois chez les patients présentant une effraction capsulaire, et de 61.27 (48-73) chez les patients sans effraction capsulaire (Fig. 69).

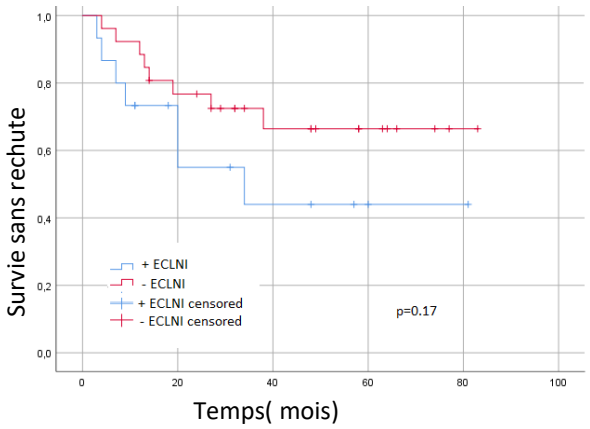


Figure 69 : Les courbes de survie sans rechute selon la présence ou l'absence de l'effraction capsulaire

La survie globale (SG) dans les deux groupes est de 48.2 % (HR; 4.3, CI; 95%; 49.76-66.63%) pour le groupe 1, et de 61.08% (HR, 5.4, CI, 95%, 50.38-71.77%) (***p=0.27***) pour le groupe 2 (Fig.70).

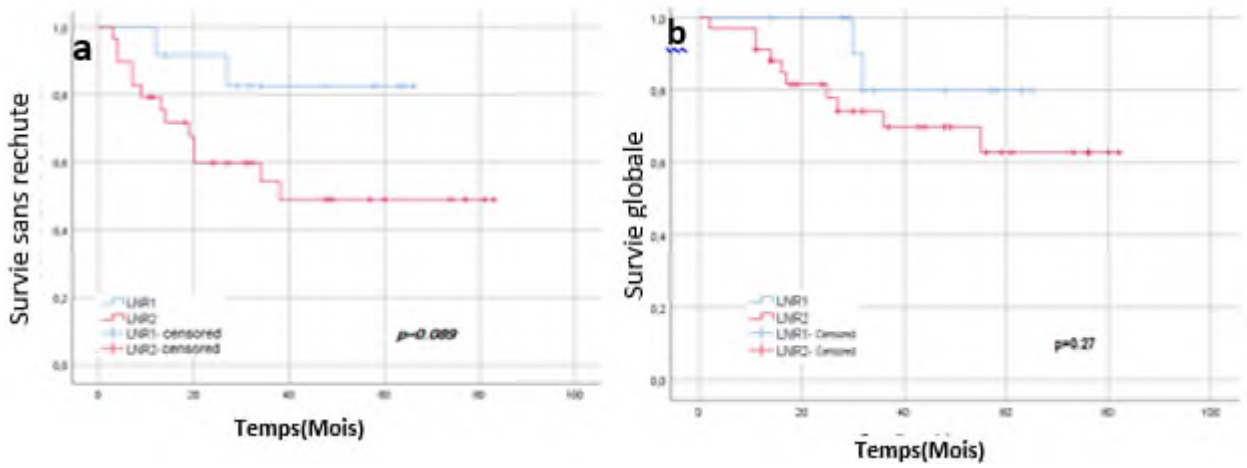


Figure 70 : Les fonctions de survie a. la survie sans rechute en fonction du ratio des GLs b. la survie globale en fonction du ratio des GLs

2.5. Comparaison de l'effet thérapeutique dans les ganglions lymphatiques avec les paramètres clinicopathologiques et la survie.

L'effet du traitement (ET) néoadjuvant sur les ganglions lymphatiques a été défini à travers 149 cas (tableau 25), par la présence de la fibrose, de la nécrose, ou de le colloïde. Un effet thérapeutique sous forme de fibrose a été retrouvé chez 133 cas (91.3 %) qu'elle soit associée ou non à un autre type de réponse thérapeutique.

La colloïde seule ou associée a été observée chez 66% des cas (Fig. 71), tandis que la nécrose a été retrouvée dans tous les cas en association avec les autres types avec une proportion de 60.7 %.

Tableau 25 : Description des caractéristiques des patients et des ganglions lymphatiques

		Nombre de patients (%)
Age	65 65-75 75-85 85	102(68) 28(18.7) 17(11.3) 2(1.3)
Sexe	Homme femme	70(46.7) 79(52.7)
Type histologique	Adenocarcinome Carcinome mucineux/cellules en bague à chatton	145(96.7) 4(2.7)
Degrés de différenciation	bien moyen peu	72(48) 69(46) 8(5)
La réponse thérapeutique sur les pièces de chirurgie	Réponse complète Réponse incomplète	25(16.8) 124(83.2)
L'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques	Présence Absence	137(91.3) 12(8)
ET de type fibrose dans les GLs	Présence Absence	133(88.7) 16(10.7)
ET de type Colloïde dans les GLs	Présence Absence	99(66) 50(33.3)
ET de type nécrose dans les GLs	Présence Absence	91(60.7) 58(38.7)
Régression tumorale réparti en 5 groups	0TE 2+ 3+ F+ C+	12(8) 8(5.3) 89(59.3) 36(24) 4(2.7)
Régression tumorale réparti en 4 groups	0TE F+ C+ ME+	12(8) 36(24) 4(2.7) 97(64.7)

La médiane du temps de suivi des malades est de 40.67 mois (des extrêmes de 0-83mois, écart type de 21.1).

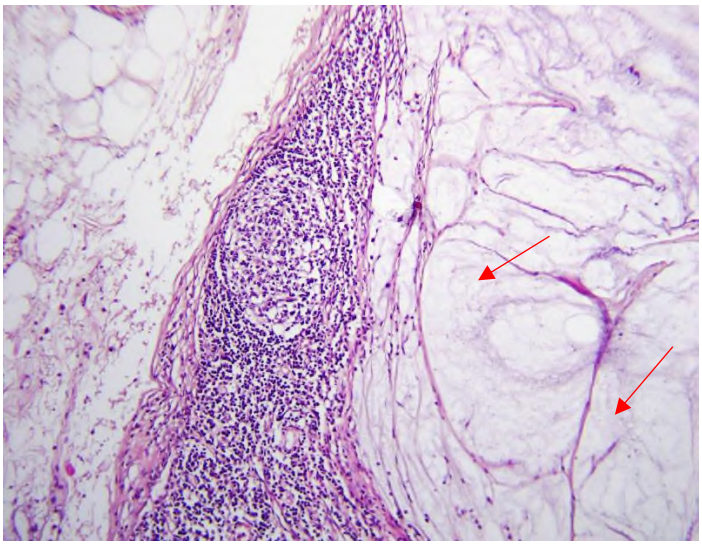


Figure 71 : Coloration HES x 250 avec la présence d'un effet thérapeutique de type colloïde au niveau du ganglion (Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN, Fès).

L'effet thérapeutique de type fibrose, colloide et nécrose, a été associé avec une survie globale prolongée des patients (Fig .72) (p=0.03 ; p=0.01, p=0.009).

Lorsqu'on a réparti les patients en 4 groupes, la survie globale a été statistiquement signigficative avec une survie globale elevée qui atteint 86% dans le groupe présentant un effet thérapeutique mixe versus un poucentage de survie de 57 % chez les patients qui n'ont montré aucun effet thérapeutique (Tableau 23).

La survie globale a été statistiquement significative en fonction de l'âge des patients (Fig. 73). 79% des patients ont un âge inférieur à 65 ans par rapport aux patients qui ont un âge supérieur à 85 ans (p<0.001) (Tableau 23).

Tableau 26 : Analyse univariée de la survie globale et de la survie sans rechute selon les différentes caractéristiques

caractéristiques	Survie globale			Survie sans rechute		
	SG %	95%CI	p	SRS %	95% CI	p
Age						0.427
<65	70.64	65.74-75.55	0.000	NA	-	
65-75	72.46	64.43-80.49		NA	-	
75-85	69.19	57.80-80.58		NA	-	
>85	36.50	0.00-15.32		NA	-	
Sexe						
	69.75	63.49-76.01	0.6	59.46	50.99-67.92	0.684
	69.53	64.10-74.96		60.18	52.54-67-81	
Type histologique						
	70.71	66.50-74.91	0.6	NA	-	
	57.00	24.74-89.25		NA	-	
L'effet thérapeutique sur les ganglions lymphatiques	47.31	33.53-61.09	0.04	36.21	18.53-53.89	0.098
	71.69	67.52-75.85		61.74	55.82-67.88	
ET de type fibrose dans les GLs	58.84	42.45-75.23	0.03	49.57	27.70-71.44	0.300
	70.27	66.23-74.31		60.06	54.25-65.87	
ET de type Colloïde dans les GLs	61.69	53.27-70.10	0.001	54.66	44.23-65.10	0.279
	74.15	69.79-78.51		62.74	55.98-69.50	
ET de type nécrose dans les GLs	63.62	55.74-71.50	0.009	58.42	48.67-68.17	0.549
	73.26	69.07-77.44		60.30	53.33-67.26	
Régression tumorale répartie en 5 groups						0.427
0TE	47.31	33.53-61.09	0.05	NA	-	
2+	71.80	64.43-79.16		NA	-	
3+	73.11	68.84-77.38		NA	-	
C+	60.00	24.79-95.20		NA	-	
F+	62.81	53.19-72.43				
Regression tumorale répartie en 4 groups						0.331
0TE	47.31	33.53-61.09	0.028	NA	-	
C+	60.00	24.79-95.20		NA	-	
F+	62.81	53.19-72.43		NA	-	
ME+	72.98	68.86-77.09		NA	-	

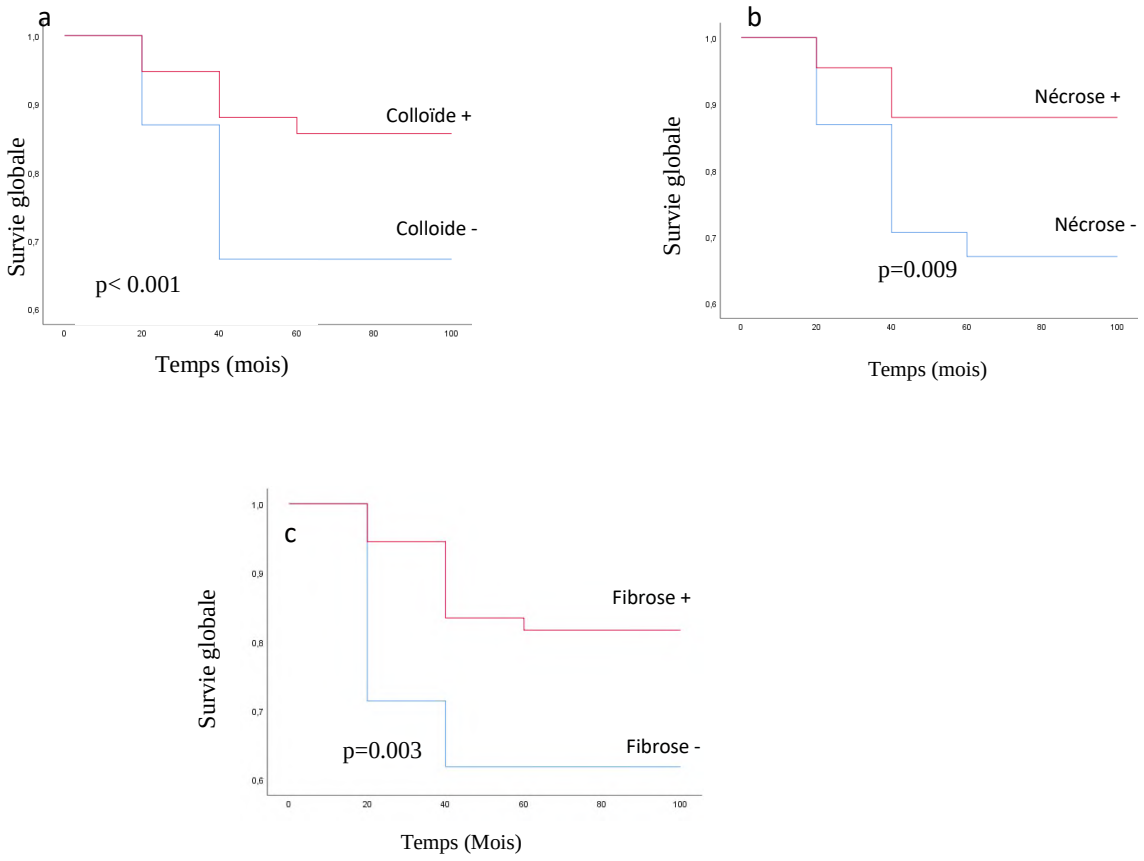


Figure 72 : (a) courbes de Kaplan-Meier pour la durée de survie globale en fonction de la présence de colloïde (b) courbes de survie globale selon la présence de l'effet thérapeutique de type nécrose (c) courbes de survie globale en fonction de l'effet thérapeutique de type fibrose.

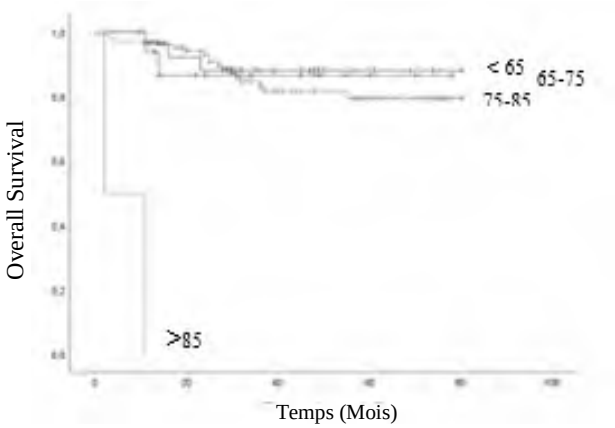


Figure 73 : Courbes de kaplan-meier pour la durée de survie en mois selon L'âge des patients

Partie III. Etude des biomarquueurs
A. Marqueurs protéiques

1. Etude descriptive

1.1. Evaluation de l'expression du Ki -67

L'expression du facteur de prolifération cellulaire Ki-67 a été évaluée après marquage immunohistochimique sur 57 cas. L'index de prolifération cellulaire a été calculé à partir du nombre des cellules exprimant un marquage nucléaire (marron) correspondant à l'expression de la protéine Ki-67 sur le nombre de toutes les cellules présentes (Fig. 74).

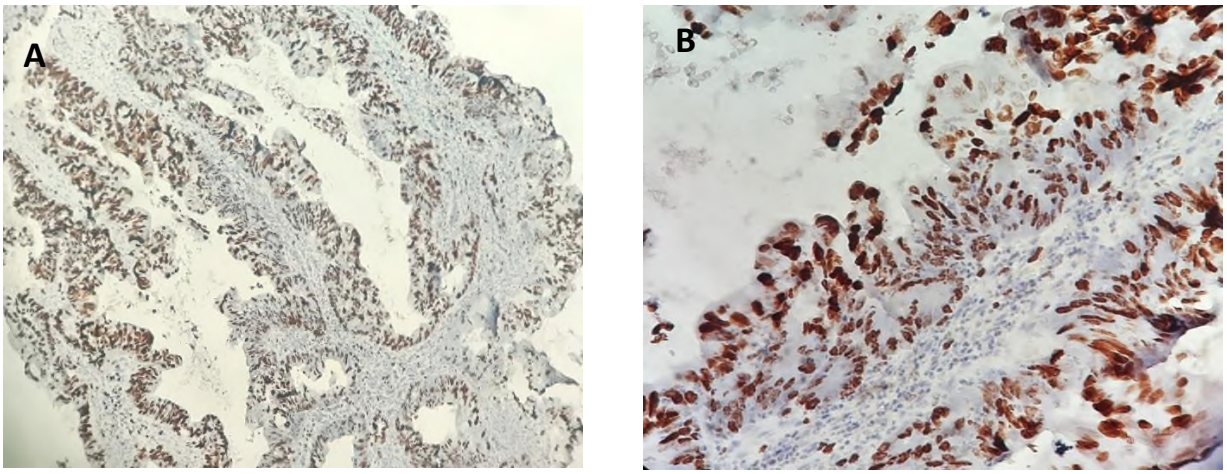


Figure 74 : Marquage nucléaire marron avec l'anticorps Ki-67 par immunohistocimie, montrant une expression dans 90 % des cellules tumorales A. grossissement x100 B. grossissement x 400.

la répartition des patients en fonction du pourcentage d'expression, on trouve que 31.6 % (n=18) des patients ont un Ki-67 inférieur à 50 %, et 68.4 % (n= 39) ont un pourcentage supérieur à 50 % (Tableau 27).

1. 2. Evaluation de l'expression des protéines MMR (N=57)

Dans notre étude l'instabilité microsatellitaire a été retrouvée chez 11 patients (19.3 %) (Fig. 75), et 46 patients étaient stables (80.7 %) (Tableau 27).

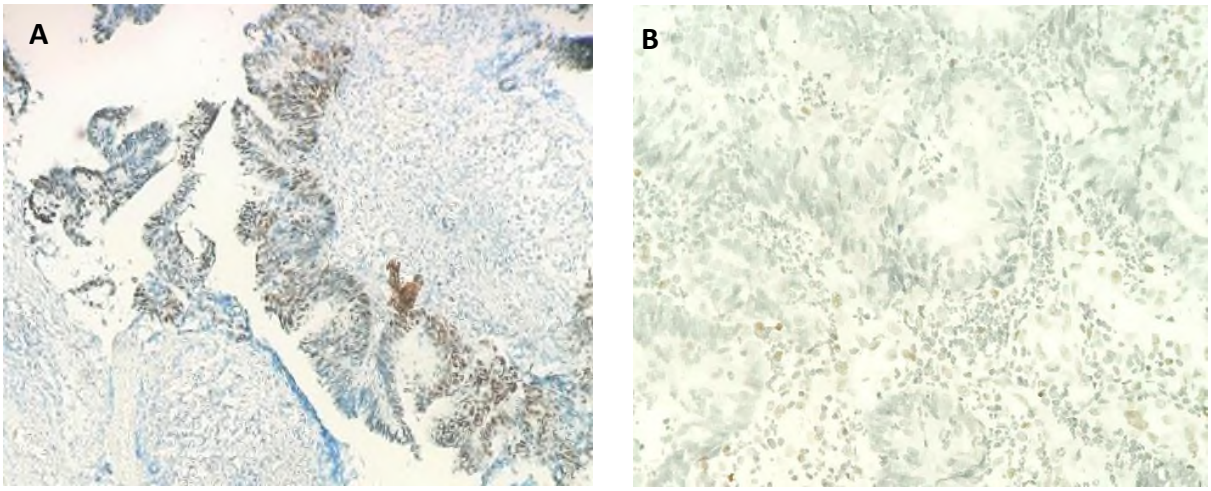


Figure 75 : Immunohistochimie avec l'anticorps anti-MSH 6 . A. image montrat un stabilité microsatellitaire du MSH 6 (x 100), B. image montrant une instabilité microsatelittaire MSH 6 instable(x200)(Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

1. 3. Evaluation de l'expression de l'HER-2

La détermination de l'expression de la protéine l'HER-2 a été réalisée selon le score utilisé dans le cancer du tractus gastro-intestinal. Le résultat (tableau 27) a montré que : 75.4% des patients (n=43) avaient un score 0, 14 % des patients (n=8) avaient un score 1+, et 5.3 % (n=3) avaient un score 2+, et 3 patients (5.3 %) avaient un stade 3+ (Fig. 76).

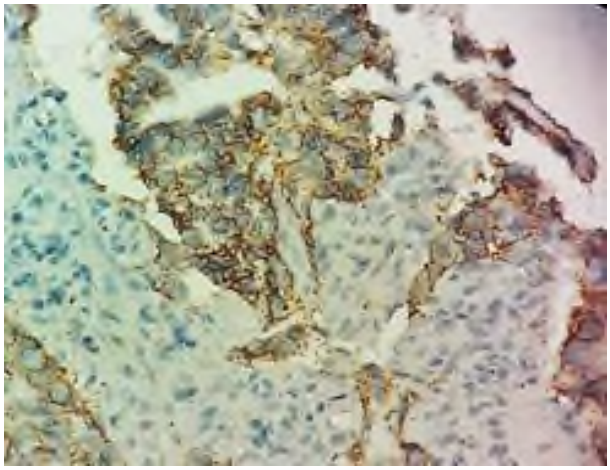


Figure 76 : Immunomarquage avec l'anticorps anti-erbB1, score 3+ (x400)
(Laboratoire d'anatomie pathologique, CHU HASSAN II, Fès)

1. 4. Evaluation de l'expression du p53

La répartition de l'expression du p53 selon les 3 groupes ; <20 % d'expression (faible expression), 20% - 50%(modérée), et ≥ 50% (forte expression) a montré que 43 patients (75.4 %) avaient une forte expression (Fig 77) ,8 (14%) avaient une expression modérée contre seulement 6 patients (10.5%) qui avaient une expression faible.

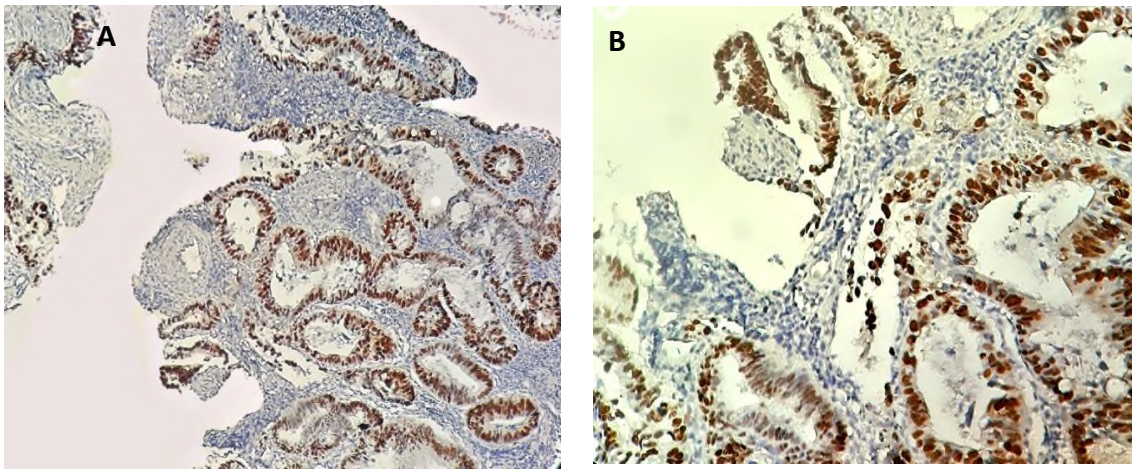


Figure 77 : Marquage du p53 par immunohistochimie au niveau nucléaire A. Grossissement x 100
B. Grossissement x 200

Tableau 27 : Les caractéristiques clinicipathologiques et moléculaires

	N= 57(%)
Médiane d'âge (extrêmes)	56 (28-81)
sexe	
femme	25(43.9)
homme	32(56.1)
Age	
< 50	23(40.4)
≥50	34(59.6)
Type histologique	
Adenocarcinome	54(94.7)
Carcinome munineux/carcinome en bague à chaton	3(5.3)
Degrés de différenciation	
bien	29(50.9)
Moyen	25(43.9)
Peu/indifférencié	3(5.3)
Réponse thérapeutique	
<50%	21(36.8)
≥50%	36(63.2)
Réponse thérapeutique	
Réponse complète	7(12.3)
Réponse incomplète	50(87.7)
Dvorak	
0	0(0)
1	8(14)
2	20(35.1)
3	22(38.6)
4	7(12.3)
Ki 67	
< 50	18(31.6)
≥ 50	39(68.4)
MSI	
Stable	46(80.7))
Instable	11(19.3)
BRAF exon 15 (V600E)	
Non muté	47(100)
Muté	0(0)
KRAS 2	
Non muté	41(71.9)
Muté	16(28.1)
Score HER 2 en 4 groupes	
0	43(75.4)
1	8(14)
2	3(5.3)
3	3(5.3)
Score HER 2 en 3 groupes	
0/1	51(89.5)
2/3	6(10.5)
P53	
<20	6(10.5)
20-50	8(14)
>50	43(75.4)
P53	
< 50	14(24.6)
≥ 50	43(75.4)

survie		
	décès	5(8.8)
	vivant/perdu de vus	52(91.2)
rechute		
	Non	36(63.2)
	Oui	21(36.8)
Invasion périnerveuse		
	Oui	7(12.3)
	Non	50(87.7)
Invasion vasculaire		
	Oui	5(8.8)
	Non	52(91.2)
ypN		
	N0	38(66.7)
	N+	19(33.3)
ypT		
	T0	7(12.3)
	T1	3(5.3)
	T2	21(36.8)
	T3	25(43.9)
	T4	1(1.8)

2. Etude analytique

L'analyse de l'association entre l'expression du Ki-67 et la réponse thérapeutique sur pièce opératoire après traitement néoadjuvant, montre que dans le groupe de la réponse complète 12.8 % (n=5) avaient un pourcentage d'expression supérieur à 50 % du Ki-67, et 11.1 % (n=2) avaient une expression inférieure à 50 % ***(p=0.62),*** cette association est statistiquement non significative (Tableau. 28).

5 patients (10.9 %) des cas stables ont été retrouvés dans le groupe de la réponse thérapeutique complète contre 2 (18.2%) qui sont instables dans le même groupe de la réponse complète. Ce résultat est statistiquement non significatif ***(p=0.22).***

L'analyse de l'association entre la réponse thérapeutique sur pièce de résection après traitement neoadjuvant et les différents scores exprimés sur les biopsies a montré que les 3 patients qui ont un score 3 ont été des non répondeurs, ce résultat n'a pas montré une signification statistique (***p=0.81***).

Une relation significative a été trouvée entre le niveau d'expression du p53 sur biopsie préthérapeutiques et la réponse thérapeutique sur pièce opératoire. Une forte expression du p53 a été retrouvée dans 40 tumeurs (93%) qui ont ***une*** réponse thérapeutique incomplète contre

seulement 3 patients qui ont une forte expression du p53 dans le groupe de la réponse thérapeutique complète **(*p=0.002*).**

Tableau 28 : Association entre les deux groupes selon la réponse thérapeutique et les différents biomarqueurs

	Réponse thérapeutique		P value
	Réponse incomplète N(%)	Réponse complète N(%)	
Ki 67			0.62
<50	16 (88.9)	2 (11.1)	
≥ 50	34 (87.2)	5 (12.8)	
MSI			
Stable	9(81.8)	2(18.2)	0.22
instable	41(89.1)	5(10.9)	
KRAS exon 2			
Sauvage	35(85.4)	6(14.6)	0.66
muté	15(93.8)	1(6.3)	
Score HER 2 en 4 groupes			
0	37(86)	6(14)	0.81
1	7(87.5)	1(12.5)	
2	3(100)	3(100)	
3	3(100)	0(0)	
Score HER 2 en 2 groupes			0.43
0/1	44(86.3)	7(13.7)	
2/3	6(100)	0(0)	
P53			0.54
<50	10(71.4)	4(28.6)	
≥50	40(93)	3(7)	
P53			**0.002**
<20	6(100)	0(0.0)	
20-50	4(50)	4(50)	
>50	40(93)	3(7)	

2.1. Relation entre les caractéristiques clinicopathologiques et les différents biomarqueurs.

L'analyse statistique pour la recherche de la relation entre les caractéristiques clinicopathologiques et les niveaux d'expression des différents marqueurs immunohistochimiques n'a pas montré une relation statistiquement significative (Tableau .29)

Tableau 29 : Association entre les caractéristiques clinicopathologiques et la réponse thérapeutique

	MSI			Ki-67			HER-2					P-53			
	stable	Instable		faible	forte		S 0	S 1	S 2	S 3		faible	modérée	forte	
sexe **femme** **homme**	26(56.5) 20(43.5)	6(54.5) 5(45.5)	0.583	11(61.1) 7(38.9)	21(53.8) 18(46.2)	0.412	22((51.2) 21(48.8)	6(75) 2(25)	3(100) 0(0)	1(33.3) 2(66.7)	0.206	5(83.3) 1(16.7)	3(37.5) 5(62.5)	24(55.8) 19(44.2)	0.231
Age **-50** **+50**	17(37) 29(63)	6(54.5) 5(45.5)	0.232	9(50) 9(50)	14(35.9) 25(64.1)	0.236	18(41.9) 25(58.1)	2(25) 6(75)	3(100) 0(0)	0(0) 3(100)	**0.063**	3(50) 2(50)	4(50) 4(50)	16(37.2) 27(62.8)	0..698
Type histologique **Adenocarcinome** **Carcinoma mucineux/carcinoma en bague à chatton**	43(93.5) 3(6.5)	11(100) 0(0)	0.519	17(94.4) 1(5.6)	37(94.9) 2(5.1)	0.688	40(93) 3(7)	8(100) 0(0)	3(100) 0(0)	3(100) 0(0)	0.794	6(100) 0(0)	8(100) 0(0)	40(93) 3(7)	0.597
degrés de différenciation **Bien** **Moyen** **Peu/indifférencié**	24(52.2) 19(41.3) 3(6.5)	5(45.5) 6(54.5) 0(0)	0.562	9(50) 9(50) 0(0)	20(51.3) 16(41) 3(7.7)	0.446	21(48.8) 19(44.2) 3(7)	4(50) 4(50) 0(0)	2(66.7) 1(33.3) 0(0)	2(66.7) 1(33.3) 0(0)	0.958	3(50) 3(50) 0(0)	3(37.5) 4(50) 1(12.5)	23(53.5) 18(41.9) 2(4.7)	0.801
ypN **N0** **N+**	31(67.4) 15(32.6)	7(63.6) 4(36.4)	0.537	11(61.1) 7(38.9)	27(69.2) 12(30.8)	0.377	29(67.4) 14(32.6)	4(50) 4(50)	3(100) 0(0)	2(66.7) 1(33,3)	0.473	4(66.7) 2(33.4)	7(87.5) 1(12.5)	27(62.8) 16(37.2)	0.396
ypT **T0** **T1** **T2** **T3** **T4**	5(10.9) 2(4.3) 20(43.5) 19(41.3) 0(0)	2(18.2) 1(9.1) 1(9.1) 6(54.5) 1(0)	0.086	2(11.1) 0(0) 9(50) 7(38.9) 0(0)	5(12.8) 3(7.7) 12(30.8) 18(46.2) 1(2.6)	0.515	6(14) 3(7) 15(34.9) 18(41.9) 1(2.3)	1(12.5) 0(0) 3(37.5) 4(50) 0(0)	0(0) 0(0) 2(66.7) 1(33.3) 0(0)	0(0) 0(0) 1(33.3) 2(66.7) 0(0)	0.991	0(0) 0(0) 3(50) 3(50) 0(0)	4(50) 0(0) 2(25) 2(25) 0(0)	3(7) 3(7) 16(37.2) 20(46.5) 1(2.3)	0.091
Récidive **Non** **oui**	44(96.7) 2(4.3)	1(9.1) 10(90.9)	0.481	16(88.9) 2(11.1)	38(97.4) 1(2.6)	0.232	40(93) 3(7)	8(100) 0(0)	3(0) 0(0)	3((100) 0(0)	0.794	5(100) 0(0)	20(95.2) 1(4.8)	29(93.5) 2(6.5)	0.829

Métastases **NON** OUI	29(63) 17(37)	8(72.7) 3(27.3)	0.409	14(77.8) 4(22.2)	23(59) 16(41)	0.139	28(65.1) 15(34.9)	7(87.5) 1(12.5)	2(66.7) 1(33.3)	0(0) 3(100)	0.062	3(50) 3(50)	6(75) 2(25)	28(65.1) 15(34.9)	0.624
Métastase avec/sans récidive **Non** **Oui**	28(60.9) 18(39.1)	8(72.7) 3(27.3)	0.357	13(72.2) 5(27.8)	23(59) 16(41)	0.254	27(62.8) 16(37.2)	7(87.5) 1(33.3)	2((66.7) 1(33.3)	0(0) 3(100)	0.066	3(50) 3(50)	6(75) 2(25)	27(62.8) 16(37.2)	0.628

B. Marqueurs génétiques

1. Etude descriptive

1.1. Patients

L'analyse par biologie moléculaire portant sur 57 échantillons de biopsies prélevées avant traitement néoadjuvant a été réalisée pour déterminer le statut mutationnel étendu du RAS ; dont le KRAS, NRAS, et BRAF.

Le choix des échantillons en pré-thérapeutique s'est basé sur plusieurs études qui ont analysé l'hétérogénéité des mutations du gène KRAS grâce à la comparaison entre les mutations somatiques du gène KRAS dans des échantillons biopsiques en amant et en aval du traitement à la radiochimiothérapie. Ces travaux ont montré que la sensibilité de la détection des mutations somatiques dans les pièces de résection après traitement néoadjuvant était inférieure, selon les tests utilisés, par rapport aux biopsies ainsi que la fréquence élevée des faux négatifs. Cela est dû à la régression tumorale et aux faible taux de cellules tumorales viables (Boissiere-Michot et al., 2012).

1.2. Dosage et qualité de l'ADN

La qualité de l'extraction de l'ADN tissulaire requiert une importance majeure car elle influence directement sur la qualité des techniques de biologie moléculaire (PCR, Séquençage) utilisées pour rechercher les mutations. Apres extraction de l'ADN par KIT, les concentrations d'ADN obtenues varient entre 9 et 700 ng/µL. En observant le rapport de l'absorbance DO260/DO280, on constate qu'il est, pour touts les extraits d'ADN, compris entre 1.8 et 2. On en conclut que ces extraits ne sont contaminés ni par l'ARN ni par les protéines et qu'ils sont de bonne qualité (Fig.78).

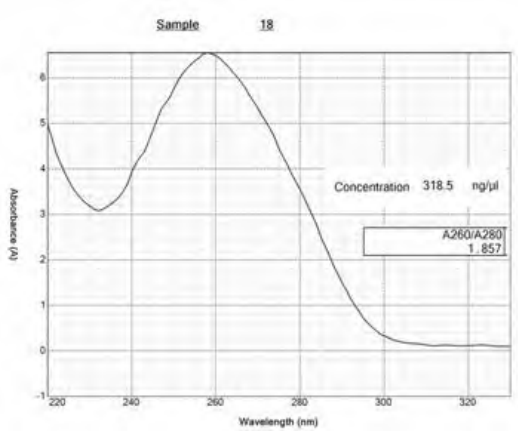


Figure 78 : Exemple d'une représentation graphique de l'absorbance des extraits d'ADN en fonction de la longueur d'onde

1. 3. Résultats de l'amplification des différents exons du gène KRAS

Après amplification des séquences correspondantes par PCR conventionnelle, la qualité de l'amplification a été contrôlée par migration sur gel d'agarose à 2% du produit de PCR, la figure 79 représente un exemple de visualisation des bandes d'intérêt**.**

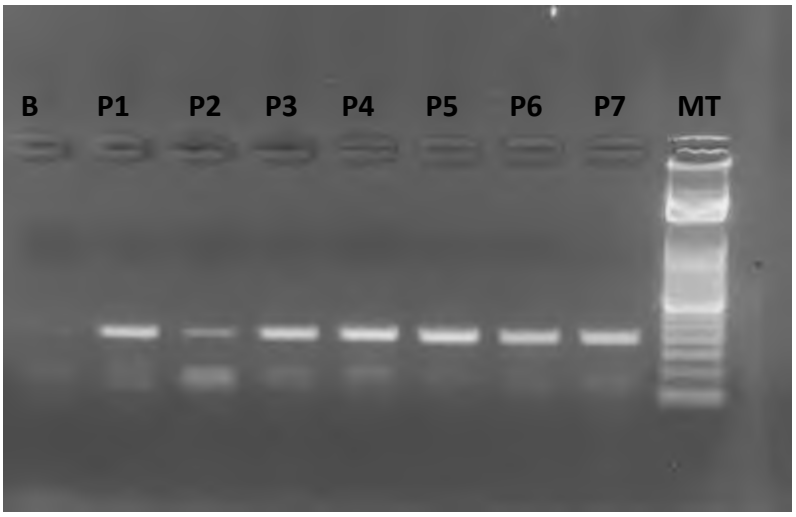


Figure 79 : Analyse sur gel d'Agarose à 2% des produits d'amplification par PCR en utilisant les couples d'amorces F/R de l'exon 2 du gène KRAS
*B : b**lanc (témoin négatif) ;** P(1-7)**, ADN amplifié des patients (1-7) ;***

*MT**, Marqueur de taille de 50 pb.***

1.4. Les mutations du gène KRAS

Le séquençage des produits de PCR a permis de déterminer la séquence nucléotidique en question. A l'aide des outils bioinformatiques, l'alignement des séquences retrouvées avec les séquences de référence sur la base de données BLAST sur le site https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi, a permis d'identifier les mutations recherchées.

Après analyse des séquences du gène *KRAS,* 16 mutations (28 %) ont été retrouvées dans l'exon 2 du gène *KRAS* dont la mutation du codon 12; c.35G>T entrainant une substitution de l'acide aminé Glycine en Valine qui a été identifiée dans 4 biopsies. Une autre mutation c.35G>A dans le même codon qui correspond à une substitution de l'acide aminé Glycine en Aspartate a été retrouvée dans 7 échantillons, tandis que la troisième mutation c.34G>T qui correspond à la substitution de l'acide aminé Glysine en Cystéine a été retrouvée chez 3 patients (Fig. 80) (Tableau 30).

Tableau 30 : Fréquence des mutations dans le gène KRAS

gène	exon	Codon	Nucléotide changé	Protéine	N
KRAS	2	12	GGT-GTT	p.G12V	4/57
	2	12	GGT-GAT	p.G12D	7/57
	2	12	GGT-TGT	p.G12C	3/57
	2	13	GGC-GGA	p.G13D	2/57
	4	146	GCA-ACA	p.A146T	2/57
	4	146	GCA-CCA	p.A146V	2/57
NRAS	2	12	GGT-GAT	p.G12D	1/47
	3	61	GAA-GTA	p.Q61L	1/57

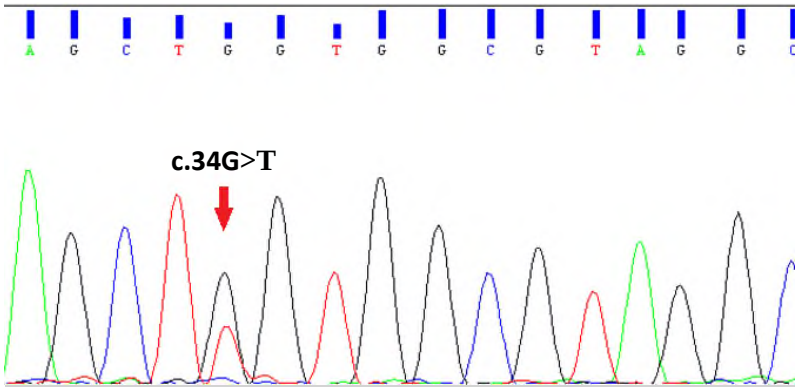


Figure 80 : ***Electrophérogramme montrant la mutation c.34G>T de l'exon 2 après séquencage par le séquenceur 3500 DX***

L'analyse de l'exon 4 a permis d'identifier 4 mutations de substitution du nucléotide Guanine en Adénine (2/57), et de Guanine en Cytosine (2/57) dans la position 436. Ces mutations représentent 20 % de toutes les mutations retrouvées sur le gène *KRAS* (**Fig. 81, 82**).

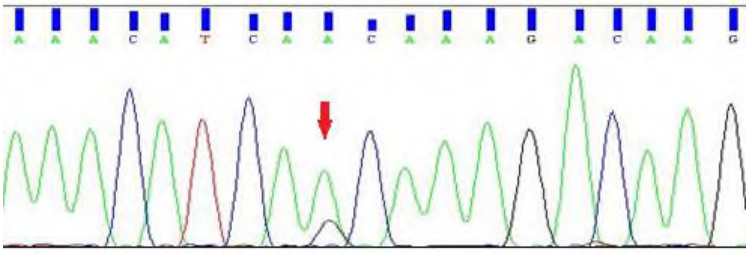
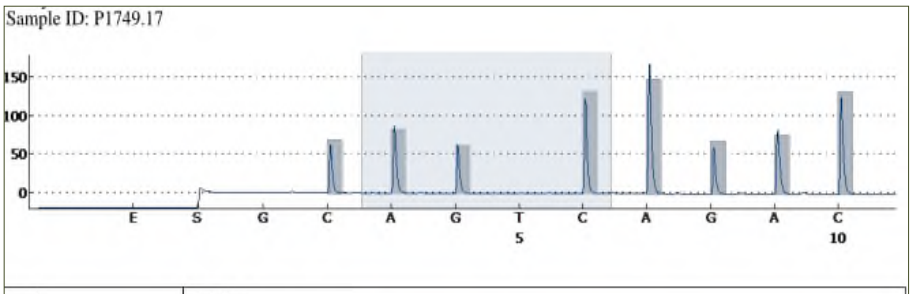


Figure 81 : Electophorégramme *montrant une mutation c.436G>A dans l'exon 4 du gène KRAS*



Result	Mutation
Frequency	10.0 % units (LOD: 4.4 % units)
Nucleotide Substitution	436G>A
Amino Acid Substitution	A146T
Quality	Passed

Figure 82 : ***Mutation dans l'exon 4 du gène KRAS, détectée par pyroséquençage***

1.5. Les mutations du gène NRAS

L'analyse du gène NRAS par séquençage a permis d'identifier 2 mutations dans le gène NRAS, une substitution en position 35 d'une Guanine en Adénine de l'exon 2 et une autre située au niveau du codon 61 qui correspond à une substitution d'une Adénine en Thymine (Tableau 30).

1.6. Les mutations du gène BRAF

Le séquençage de l'ADN des patients dont l'analyse des gènes KRAS et BRAF a montré un profil sauvage, a permis de définir un statut sauvage également dans la mutation V600 E.

Les mutations qui ont été retrouvées dans les gènes de la famille RAS représentent 38.59 % de tous les cas. Le gène KRAS seule occupe 90.9 % de toutes les mutations contre 9.09 % des mutations du gène NRAS. 80% des mutations du gène KRAS sont situées au niveau de l'exon 2, dans les codons 12 et 13, et 20% sont au niveau de l'exon 4.

2. Etude analytique

2.1. Association entre la réponse thérapeutique et les mutations RAS

L'analyse d'association entre les différentes mutations des exons 2, 3 et 4 du gène KRAS et NRAS n'a pas montré une association entre le statut mutationnel du gène KRAS et NRAS avec la réponse thérapeutique (Tableau 27).

L'analyse de l'association entre les critères clinicopathologiques et la présence des mutations dans les différents exons a montré une association statistiquement significative entre les mutations du codon 146 (A146T, A146V) dans les biopsies tumorales et l'apparition de métastases et de récidives (p=0.019) (Tableau 31).

Tableau 31 : Association entre les caractéristiques clinicopathologiques et la présence des mutations dans les gènes KRAS et NRAS

	KRAS									NRAS									
	Exon 2 N=57		*p*	Exon 3 N=50		*p*	Exon 4 N=51			Exon 2 N=47			Exon 3 N=57			Exon 4 N=44		*P*
	M	NM		M	NM		M	NM		M	NM		M	NM		M	NM	
sexe						-												-
femme	7(43.8)	16(39)	0.189	0(0)	28(56)		3(75)	25(53.2)	0.383	0(0)	26(56.5)	0.447	0(0)	32(57.1)	0.439	0	23(52.3)	
homme	9(56.3)	25(61)		0(0)	22(44)		1(25)	22(46.8)		1(100)	20(43.5)		1(100)	24(42.9)		0	21(47.7)	
Age **-50**						-												-
+50	5(31.3)	18(43.9)	0.285	0	21(42)		3(75)	17(36.2)	0.161	0(0)	20(43.5)	0.574	0(0)	23(41.1)	0.596	0	17(38.6)	
	11(68.8)	23(56.1)		0	29(58)		1(25)	30(63.8)		1(100)	26(56.5)		1(100)	33(58.9)		0	27(61.4)	
Type histologique						-												-
Adenocarcinome	15(93.8)	39(95.1)	0.636	0	47(94)		4(100)	44(93.6)	0.779	1(100)	43(93.5)	0.936	1(100)	53(94.6)	0.947	0	42(95.5)	
Carcinome mucineux/carcinoma en bague à chaton	1(6.3)	2(4.9)		0	3(6)		0(0)	3(6.4)		0(0)	3(6.5)		0(0)	3(5.4)		0	2(4.5)	
degrés de différenciation						-												-
Bien	11(68.8)	18(43.9)	0.185	0	24(48)		1(25)	24(51.1)	0.496	0(0)	22(47.8)	0.587	0(0)	29(51.8)	0.521	0	21(47.7)	
Moyen	5(31.3)	20(48.8)		0	24(48)		3(75)	21(44.7)		1(100)	22(47.8)		1(100)	24(42.9)		0	22(50)	
Peu/indifférencié	0(0)	3(7.3)		0	2(4)		0(0)	2(4.3)		0(0)	2(4.3)		0(0)	3(5.4)		0	1(2.3)	
ypN **N0**						--												--
N+	11(68.8)	27(65.9)	0.548	0	34(68)		3(75)	32(68.1)	0.629	1(100)	34(73.9)	0.277	0(0)	37(66.1)	0.667	0	31	
	5(31.3)	14(34.1)		0	16(32)		1(25)	15(31.9)		0(0)	12(26.1)		1(100)	19(33.9)		0	13	

ypT **T0** **T1** **T2** **T3** **T4**	1(14.6) 0(0) 5(31.3) 9(56.3) 1(6.3)	6(14.6) 3(7.3) 16(39) 16(56.3) 0(0)	0.252	0 0 0 0 0	6(12) 2(4) 17(34) 24(48) 1(2)	-	0(0) 1(25) 2(50) 1(25) 0(0)	5(10.6) 1(2.1) 18(38.3) 22(46.8) 1(2.1)	0.203	0 0 0 1(100) 0	5(10.9) 2(4.3) 17(37) 21(45.7) 1(2.2)	0.884	0 0 0 1(100) 0	7(12.5) 3(5.4) 21(37.5) 24(42.9) 1(1.8)	0.861	0 0 0 0 0	4(9.1) 1(2.3) 17(38.6) 21(47.7) 1(2.3)	-
Récidive **Non** **Oui**	1(2.4) 14(87.5)	40(97.6) 1(2.4)	0.187	0 0	47(94) 3(6)	-	4(100) 0(0)	44(93.6) 3(6.4)	0.779	1(100) 0(0)	43(93.5) 3(6.5)	0.9	1(100) 0(0)	53(94.6) 3(5.4)	0.9	0 0	41(93.2) 3(6.8)	-
Métastases **Non** **Oui**	5(31.3) 15(36.6)	26(63.4) 11(68.8)	0.478	0(0) 0(0)	32(64) 18(36)	-	0(0) 4(0)	32(68.1) 15(31.9)	0.016	1(100) 0(0)	28(60.9) 18(39.1)	0.404	0(0) 1(100)	37(66.1) 19(33.9)	0.351	0 0	27(61.4) 17(38/6)	-
Métastase avec/sans récidive **Non** **Oui**	11(68.8) 5(31.3)	5(31.3) 16(39)	0.410	19(38) 0(0)	31(62) 0(0)	-	0(0) 4(100)	31(66) 16(34)	0.019	0(0) 1(100)	27(58.7) 19(41.3)	0.426	0(0) 1(100)	36(64.3) 20(35.7)	0.368	0(0) 0(0)	18(40.9) 26(59.1)	-

2.2. Corrélation entre la survie des patients et les différents biomarqueurs

La corrélation entre la survie globale des patients avec les biomarqueurs immunohistochimiques et moléculaires n'a pas montré une association statistiquement significative (Fig. 83)

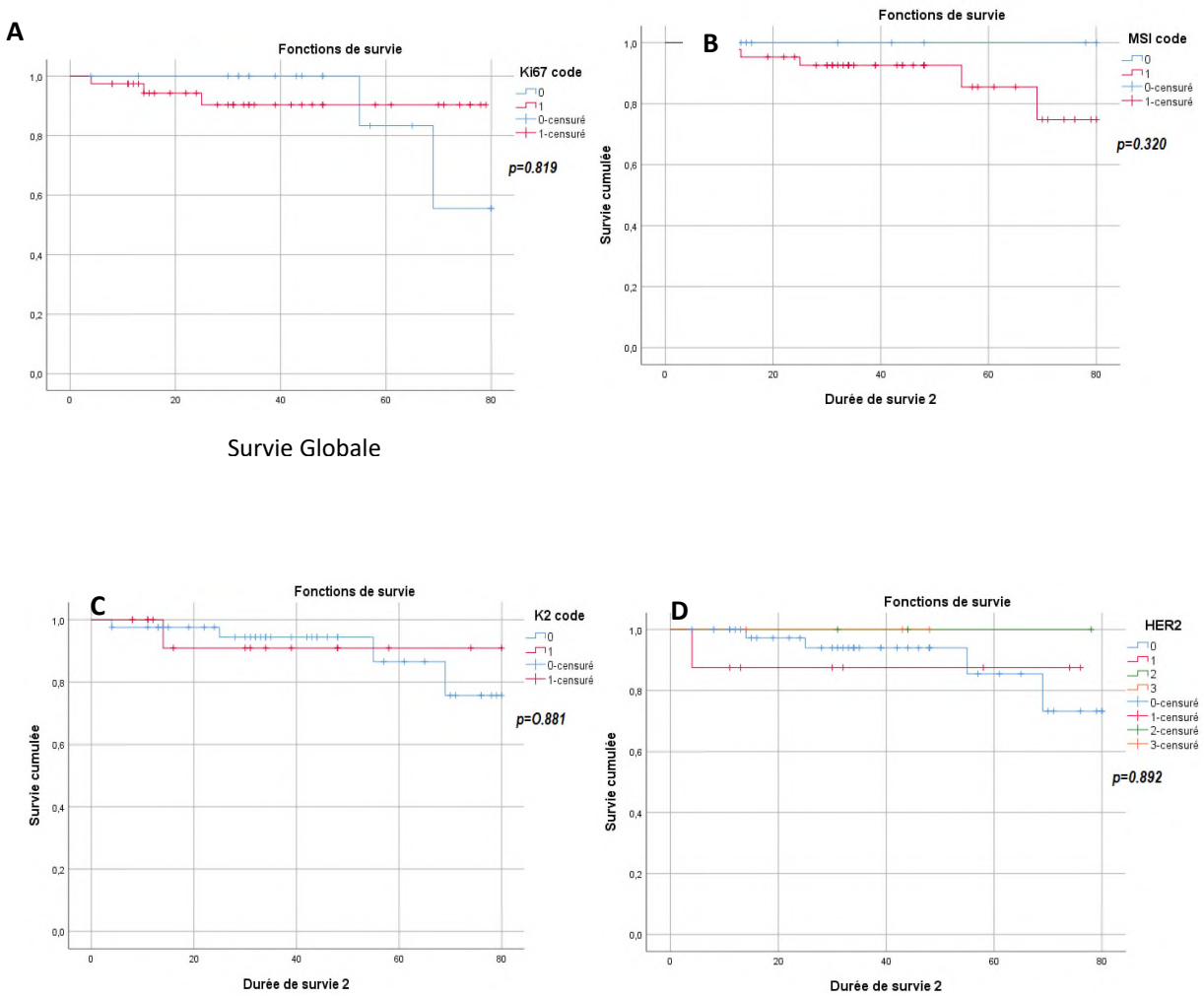


Figure 83 : Survie Globale des patients A. Survie globale des patients en fonction du Ki 67, B. Survie Globale des patients en fonction du MSI, C. Survie globale des patients en fonction des mutations de l'exon 2 du gene KRAS, D. Survie globale des patients en fonction des scores de l'HER2

Une forte expression de l'HER 2 correspondant a un score 3+ a été obsérvée chez 3 patients. L'expression de l'HER 2 est en relation avec la survie et l'apparition de métatstases et de récidives, la figure 79 montre une association entre une courte durée de survie sans rechute et le score 3+ (p=0.002)(Fig 84).

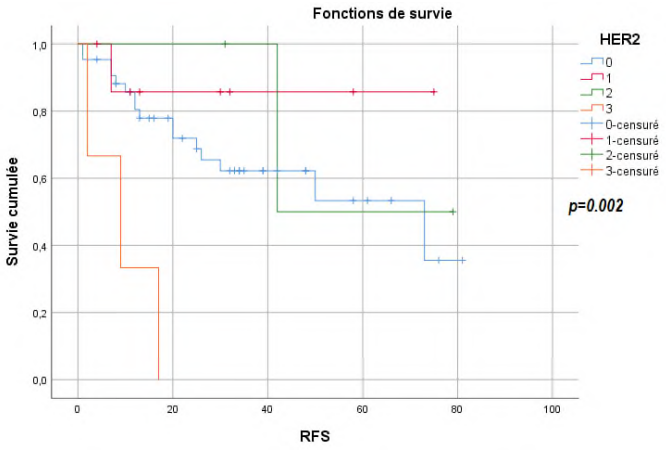


Figure 84 : Survie sans rechute en fonction des différents scores de l'HER 2

Partie IV. Microenvironnement tumoral lymphoïde

1. Calcul de la médiane de la densité des lymphocytes

54 patients ont été inclus dans cette étude. La médiane de la densité en CD 3+ des lymphocytes T dans la région du CT est égale à 60 cellules/mm^2 et 54.28 cellules/mm^2 pour les CD 3 (Fig. 85). La médiane de la densité en CD8+ des lymphocytes T dans la région CT est égale à 40 cellules/mm^2 et 20 cellules/mm^2 pour les CD 8+ IM (Tableau 32).

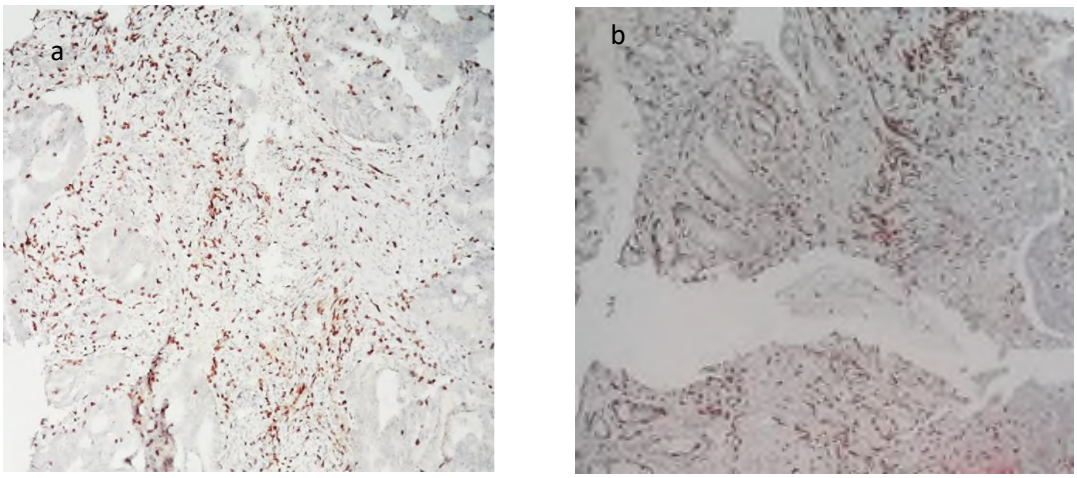


Figure 85 : a : Marquage immunohistochimique dans le corps de la tumeur (CT) (Grossissement x40)
b : Marquage immunohistochimique dans la marge d'invasion (MI) (Grossissement x40)

2. calcul de l'immunoscore

Le classement des densités en fonction du seuil détérminé par la médiane calculée a permis de distinguer 5 classes d'immunoscore ; I0 retrouvé dans 5 tumeurs (9.3%), I1 dans 10 tumeurs(18.5%), I2 dans 12tumeurs (22.2%), I3 dans 10tumeurs (18.5%) et I4 dans 17tumeurs (31.5%) (Tableau 32).

3. Groupes de l'immunoscore

Après regroupement des 5 immunoscores en 3 groupes, 15tumeurs (27.8%) ont été classés dans le groupe 1de faible infiltration lymphocytaire, 12 tumeurs (22.2%) étaient classées dans le groupe 2 (modéré) et 16 tumeurs ont été classées dans le groupe 3 (fort**) (**Tableau 32**)**

Tableau 32 : Analyse descriptive des caractéristiques clinicopathologiques et lymphocytaire des patients.

		Patients N(%)
Caractéristiques démographiques		
Age, moyenne (année)		55.26
	Minimum	25
	Maximum	80
	Ecart type	14.66
Age	<**50**	22 (40.7)
	⩾50	32 (59.3)
Sexe	**Homme**	22(40.7)
	femme	32(59.3)
Caractéristiques hitopathologiques et cliniques des patients		
Type histologique	**Adenocarcinome**	51(94.4)
	Carcinome mucineux/carcinome en bague à chaton	3(5.6)
Degré de differentiation	**bien**	27(55)
	moyen	24(44)
	peu/indifférencié	3(5.6)
Localisation de la tumeur	Haut rectum	4(7.4)
	Moyen rectum	27(50)
	bas rectum	23(42)
Immunohistochimie sur biopsies		
Densité de CD3 CT, moyenne (n cellules/mm2)		74.37
Median (n cells/mm2)		60
Ecart type		39.45
Minimum		8
Maximum		180
Densité de CD3 IM,moyenne (n cellules/mm2)		54.28
Médiane (n cells/mm2)		50
Ecart type		29.66
Minimum		10
Maximum		130
Score de CD3 (CT/IM) (un marqueur/deux regions)		
Ld		10(18.5)
Md		22(40.7)
Hd		22(40.7)
Densité de CD8 CT, moyenne (n cellules/mm2)		41.94
Médiane (n cells/mm2)		40
Ecart type		25.39
Minimum		10
Maximum		120
Densité de CD8 IM, moyenne (n cellules/mm2)		29.22
Médiane (n cells/mm2)		20
Standard deviation		20
Minimum		5
Maximum		80
Score de CD 8 (CI/IM) (un marqueur/deux regions)		
Ld		14(25.9)
Md		14(25.9)
Hd		26(48.1)
Immunoscore en 5 groupes		
I0		5(9.3)
I1		10(18.5)
I2		12(22.2)
I3		10(18.5)
I4		17(31.5)
Immunoscore en 3 groupes		
L		15(27.8)
M		12(22.2)

H		27(50)
Immunoscore en 2 groupes		
L		27(50)
H		27(50)
	Characteristics des pieces opératoires post-thérapeutiques	
Réponse thérapeutique (%)	<50%	19(35.2)
	⩾50%	35(64.8)
Réponse thérapeutique	Réponse incomplete	45(83.3)
	Réponse complete	9(16.7)
Grading de dvorak	1	7(13)
	2	19(35.2)
	3	19(35.2)
	4	9(16.7)
Invasion périnerveuse	Presence	6(11.1)
	Absence	48(88.9)
Invasion vasculaire	Presence	4(7.4)
	Absence	50(92.6)
ypN	N0	36(66.7)
	N1	13(24.1)
	N2	5(9.3
ypT		
T0		9(16.7)
T1		2(3.7)
T2		20(37)
T3		22(40.7)
T4		1(1.9)

4. comparaison entre l'immunoscore et la réponse thérapeutique

Parmi les 54 tumeurs on observe que dans 8 cas (88.9 %) des patients qui ont présenté une réponse complète ont été classés dans le score I4 de forte infiltration lymphocytaire. L'analyse statistique a montré une association significative entre les différents groupes de l'immunoscore sur la biopsie préthérapeutique et la réponse thérapeutique sur pièce opératoire (p=0.003). (**Tableau 33**). En plus, une faible infiltration tumorale dans la paroi rectale a été associée avec un immunoscore élevé.

Tableau 33 : Association entre la réponse thérapeutique et l'immunoscore

	Immunoscore n(%)					P value
	I0	I1	I2	I3	I4	
sexe						0.364
homme	1(4.5)	4(18.2)	5(22.7)	6(27.3)	6(27.3)	
femme	4(12.5)	6(18.8)	7(21.9)	4(12.5)	11(34.4)	
Age						0.516
<50	3(13.6)	3(13.6)	7(31.9)	3(13.6)	6(27.3)	
⩾50	2(6.3)	7(21.9)	5(15.6)	7(21.9)	11(34.4)	
Type histologique						0.239
Adenocarcinome Carcinome	5(9.8)	8(15.7)	12(23.5)	10(19.6)	16(31.4)	
mucineux/carcinome en bague à chaton	0(0)	2(66.7)	0(0)	0(0)	1(33.3)	
Degrès de différenciation						0.595
bien	2(7.4)	7(25.9)	5(18.5)	6(22.2)	7(25.9)	
Modéré	3(12.5)	2(8.3)	7(29.2)	4(16.7)	8(33.3)	

peu/indifférencié	0(0)	1(33.3)	0(0)	0(0)	2(66.7)	
Réponse thérapeutique (%)						0.140
<50%	3(15.8)	4(21.1)	3(15.8)	6(31.6)	3(15.8)	
⩾50%	2(5.7)	6(17.1)	9(25.7)	4(11.4)	14(40)	
Réponse thérapeutique						0.003
Réponse complete	5(11.1)	10(22.2)	12(26.7)	9(20)	9(20)	
Réponse incomplete	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	8(88.9)	
Dvorak						0.016
1	1(14.3)	1(14.3)	1(14.3)	2(28.6)	2(28.6)	
2	3(15.8)	5(26.3)	3(15.8)	5(26.3)	3(15.8)	
3	1(5.3)	4(21.1)	8(42.1)	2(10.5)	4(21.1)	
4	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	8(88.9)	
Invasion périnerveuse						0.086
Yes	2(33.3)	0(0)	0(0)	1(16.7)	3(50)	
No	3(6.3)	10(20.8)	12(25)	9(18.8)	14(29.2)	
Invasion vasculaire						0.725
Yes	1(25)	1(25)	0(0)	1(25)	1(25)	
No	4(8)	9(18)	12(24)	9(18)	16(32)	
ypT						0.008
T0	0(0)	0(0)	0(0)	1(11.1)	8(88.9)	
T1	0(0)	0(0)	1(50)	0(0)	1(50)	
T2	2(10)	2(10)	6(30)	7(35)	3(15)	
T3	3(13.6)	8(36.4)	4(18.2)	2(4.1)	5(22.7)	
T4	0(0)	0(0)	1(100)	0(0)	0(0)	
YpT						0.043
ypT0/T1/T2	2(6.5)	2(6.5)	7(22.6)	8(25.8)	12(38.7)	
ypT3/T4	3(13)	8(34.8)	5(21.7)	2(8.7)	5(21.7)	
ypN						0.039
N0	2(5.6)	5(13.9)	10(27.8)	7(19.4)	12(33.3)	
N1	3(23.1)	3(23.1)	2(15.4)	0(0)	5(38.5)	
N2	0(0)	2(40)	0(0)	3(60)	0(0)	
ypN						0.371
N0	2(6.5)	2(6.5)	7(22.6)	8(25.8)	12(38.7)	
N1/N2	3(13)	8(34.8)	5(21.7)	2(8.7)	5(21.7)	

L'infiltration lymphocytaire a été également analysée pour chaque marqueur d'une manière séparée. La densité des CD3 dans le CT et IM a été calculée et classée en 3 groupes. La même procédure a été réalisée pour le CD8 dans la région CT et IM. Les résultats obtenus sont décrits dans le tableau 80.
Une forte association entre l'infiltration en CD 3 et CD 8 a été retrouvée chez le groupe de patients qui ont une réponse histologique complète après traitement néoadjuvant (Tableau 34).

Tableau 34 : association entre les différents paramètres et l'infiltration des CD3 et CD8

	CD3 CT/IM Immunoscore			P value	CD8 CT/IM Immunoscore			P value
	I0 N(%)	I1 N(%)	I2 N(%)		I0 N(%)	I1 N(%)	I2 N(%)	
sexe				0.031				0.077
homme	1(4.5)	13(59.1)	8(36.4)		5(22.7)	7(31.8)	10(45.5)	
femme	9(28.1)	9(28.1)	14(43.8)		9(28.1)	7(21.9)	16(50)	
Age				1.000				0.375
<50	4(18.2)	9(40.9)	9(40.9)		8(36.4)	5(22.7)	9(40.9)	
⩾50	6(18.8)	13(40.6)	13(40.6)		6(18.8)	9(28.1)	17(53.1)	
Type histologique				1.000				1.000
Adenocarcinome	9(17.6)	21(41.2)	21(41.2)		13(25.5)	13(25.5)	25(49)	
Carcinomemucineux/carcinoma en bague à chaton	1(33.3)	1(33.3)	1(1)		1(33.3)	1(33.3)	1(33.3)	
Degres de différenciation				0.898				0.147
bien	5(18.5)	12(44.4)	10(37)		6(22.2)	11(40.7)	10(37)	
Modéré	5(20.8)	9(37.5)	10(41.7)		7(29.2)	3(12.5)	14(58.3)	
peu/indifférencié	0(0)	1(33.3)	2(66.7)		1(33.3)	0(0)	2(66.7)	
Réponse thérapeutique (%)				0.429				0.175
<50%	3(15.8)	10(52.6)	6(31.6)		8(42.1)	4(21.1)	7(36.8)	
⩾50%	7(20)	12(34.3)	16(45.7)		6(17.1)	10(28.6)	19(54.3)	
Réponse thérapeutique				0.008				0.002
Réponse complete	10(22.2)	21(46.7)	14(31.1)		14(31.1)	14(31.1)	17(37.8)	
Réponse incomplete	0(0)	1(11.1)	8(88.9)		0(0)	0(0)	9(100)	
Dvorak				0.078				0.007
1	1(14.3)	3(42.9)	3(42.9)		2(28.6)	2(28.6)	3(42.9)	
2	5(26.3)	9(47.4)	5(26.3)		8(42.1)	3(15.8)	8(42.1)	
3	4(21.1)	9(47.4)	6(31.6)		4(21.1)	9(47.4)	6(31.6)	
4	0(0)	1(11.1)	8(88.9)		0(0)	0(0)	9(100)	
Invasion périnerveuse				0.540				0.398
Oui	2(33.3)	1(16.7)	3(50)		1(33.3)	0(0)	4(66.7)	
Non	8(16.7)	21(43.8)	19(39.6)		12(25)	14(29.2)	22(45.8)	
Invasion vasculaire				1.000				0.359
Oui	1(25)	2(50)	1(25)		2(50)	0(0)	2(50)	
Non	9(18)	20(40)	21(42)		12(24)	14(28)	24(48)	
ypT				0.090				0.011
T0	0(0)	1(11.1)	8(88.9)		0(0)	0(0)	9(100)	
T1	0(0)	1(50)	1(50)		0(0)	1(50)	1(50)	
T2	4(20)	10(50)	6(30)		5(25)	5(25)	10(50)	
T3	6(27.3)	9(40.9)	7(31.8)		9(40.9)	7(31.8)	6(27.3)	
T4	0(0)	1(100)	0'0)		0(0)	1(100)	0(0)	
YpT				0.348				0.016
ypT0/T1/T2	4(12.9)	12(38.7)	15(48.4)		5(16.1)	6(19.4)	20(64.5)	
ypT3/T4	6(26.1)	10(43.5)	7(30.4)		9(39.1)	8(34.8)	6(26.1)	
ypN				0.185				0.842
N0	5(13.9)	14(38.9)	17(47.2)		8(22.2)	10(27.8)	18(50)	
N1	4(30.8)	4(30.8)	5(38.5)		5(38.5)	3(23.1)	5(38.5)	
N2	1(20)	4(80)	0(0)		1(20)	1(20)	3(60)	
ypN				0.357				0.751
N0	5(13.9)	14(38.9)	17(47.2)		8(22.2)	10(27.8)	18(50)	
N1/N2	5(27.8)	8(44.4)	5(27.8)		6(33.3)	4(22.2)	8(44.4)	

5. Survie des malades en fonction de l'immunoscore.

L'analyse de la survie globale des patients en fonction de l'immunoscore calculé sur les biopsies prétherapeutiques a montré qu'il y a une différence significative entre les différents scores pour la survie globale, une survie prolongée a été associée à un score élevé (Fig. 84. B).

par contre aucune signification n'a été trouvée entre l'immunoscore la survie sans rechute (Fig. 84, C).

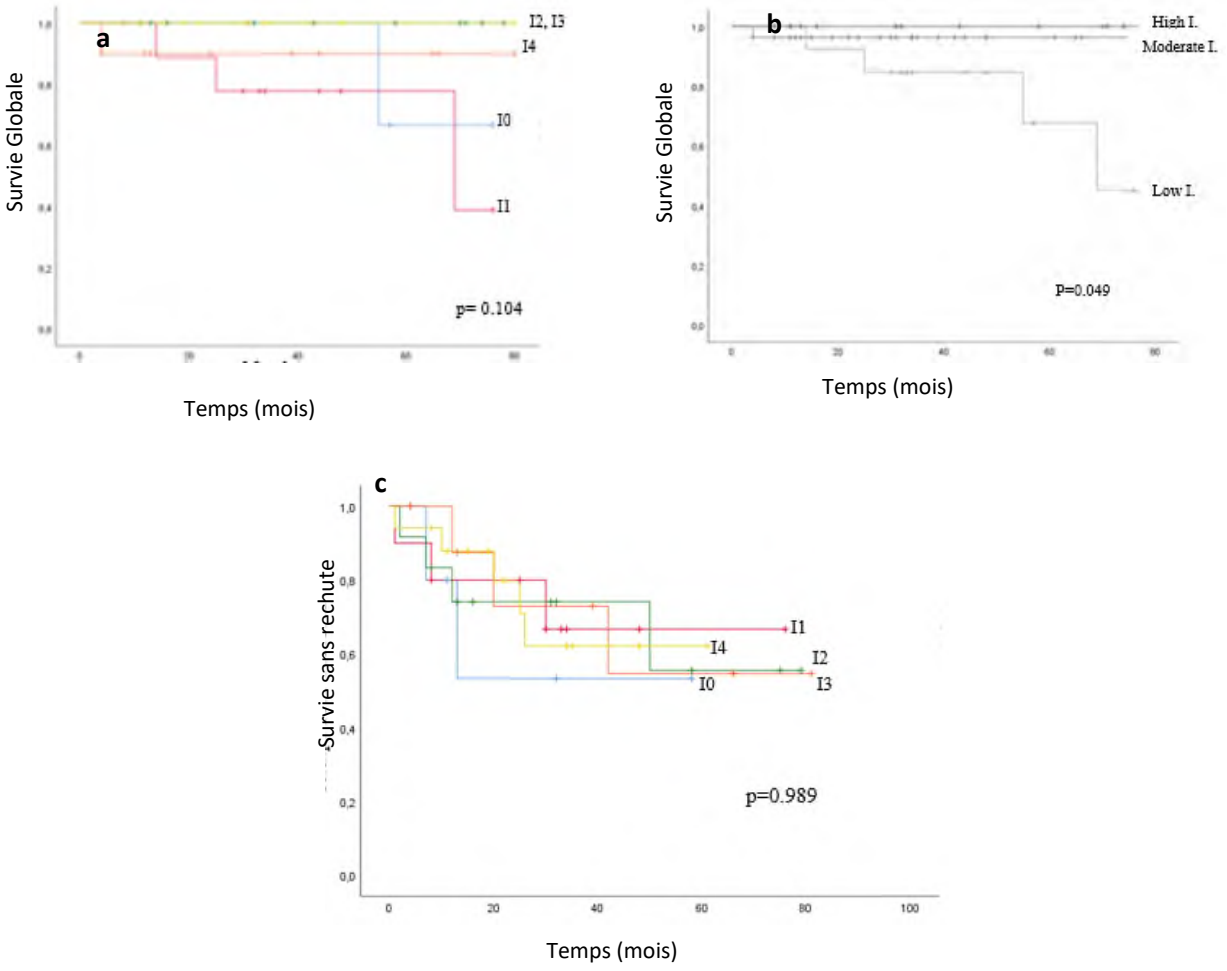


Figure 86 : Survie des patients en fonction des Immunoscores A.survie globale en fonction des 5 immunoscores B. Survie globale en fonction des immunoscores classée en 3 groupes C : Survie sans rechute en fonction de l'immunoscore.

Discussion

Le cancer du rectum (CR) constitue un problème de santé publique. Il représente dans le monde un des cancers les plus fréquents en termes d'incidence, prévalence, ainsi que de mortalité.

La mortalité par cancer est passée de 8,8 millions en 2015 à 9,6 millions en 2018, avec plus de 18 millions nouveaux cas estimés dans le monde selon la base de donnée GLOBOCAN 2018 (Bray et al., 2018; Ferlay et al., 2018).

Le cancer colorectal (CCR) représente le cancer digestif le plus fréquent. Ce est le troisième cancer chez les femmes après celui du sein, du col utérin et de l'utérus, et le deuxième chez les hommes après le cancer du poumon (Elidrissi Errahhali et al., 2017). 30 % des cas du CCR sont représentés par le CR (Arnold et al., 2017).
Le CR est le troisième cancer fréquent chez les hommes et le deuxième chez les femmes et représente respectivement 10% et 9,2% de tous les cancers (Bray et al., 2018; Schreuders et al., 2015). De plus, il est classé comme le 9ème cancer dans le monde après le cancer du foie, avec 704 376 (3,9%) nouveaux cas ,et 310 394 (3,2%) cas de décès de tous les cancers ont été rapportés dans le dernier rapport mis à jour par GLOBOCAN (Bray et al., 2018). Le cancer du rectum est liée d'une manière étroite avec le niveau de développement économique, son incidence est largement augmentée dans les pays industrialisés (Deng, 2017).

A. Particularités épidémiologiques du cancer du rectum au Maroc et dans notre région

Au Maroc, les données épidémiologiques sur le cancer rectal sont généralement associées aux cancers colorectaux. Avec une fréquence relativement faible par rapport aux pays développés. Vu l'absence du registre du cancer du rectum, la plupart des données épidémiologiques concernant le cancer du rectum isolé se limitent aux séries hospitalières réalisées en plus de l'incidence du cancer du rectum cité dans le registre du grand Casablanca. L'incidence du CR au Maroc aussi bien que celle des pays du Maghreb (Oran, et la Tunisie) est inférieur aux incidences observées en occident, au Japon, en Chine et aux USA (Benider et al., 2007; Tazi et al., 2013).
En outre, les cancers de l'appareil digestif dans la ville de Fès sont principalement représentés par le cancer colorectal et le cancer gastrique à prédominance masculine (Chbani et al., 2012).

Selon le registre de Rabat de 2005, le CR est le deuxième cancer digestif après celui de l'estomac en terme de fréquence.

Dans cette perspective, ce travail fournit un aperçu global sur le cancer du rectum dans une population marocaine. En effet, il démontre la relation entre la réponse thérapeutique après un traitement néoadjuvant, et les caractéristiques clinico-pathologiques et le pronostic des patients.

En ce qui concerne l'âge au moment du diagnostic, notre travail a trouvé que 56 ans représente l'âge moyen d'apparition de la maladie, ce qui est relativement semblables aux études précédentes des pays d'Afrique du Nord tels que la Tunisie (Letaif et al, 2017), la Libye (Elzouki AN et al, 2014), et l'Algérie (Mesli SN et al, 2016). D'autant plus l'âge est connu comme un facteur de risque, qui était plus élevé chez les hommes que chez les femmes, dans notre étude 58.35 ans contre 53.37 respectivement), ces résultats sont comparables aux données épidémiologiques publiées par Marly (Marley AR et al ; 2016).

Un total de 692 cas de cancer du rectum a été enregistré pour la période de 2008-2012 dans la région du grand Casablanca. Un taux d'incidence spécifique maximale a été de 17.7 pour 100 000, pour la classe d'âge située entre 55 ans et 59 ans chez les deux sexes (Benider et al., 2007). Le cancer du rectum est plus fréquent chez les personnes âgées que chez les jeunes, un résultat similaire a été observé dans notre étude avec 65,6% des patients qui ont plus de 50 ans et presque la moitié de notre échantillon ont moins de 50 ans.

Un sex-ratio de 1,03 qui caractérise une légère prédominance féminine a été observé dans notre série. Contrairement aux résultats rapportés par le registre de Rabat en 2005, dans lequel l'incidence observée a été de 3.4 chez les hommes versus 2.6 chez les femmes. le registre du grand Casablanca a également rapporté une légère prédominance masculine(soit 5.0 contre 3.8 pour 100000 sujets standardisé à l'échelle mondiale)(Benider et al., 2007)

En plus, le travail réalisé en Tunisie par *Missaoui et al* et a démontré que le taux d'incidence du CR chez les hommes est en augmentation par rapport aux femmes (Missaoui et al., 2010), cela a été expliqué par l'adoption de certaines comportements masculins à risque associés avec le cancer colorectal d'une manière générale et avec le cancer du rectum en particulier tel que : le tabagisme, la consommation élevé de l'alcool, et l'obésité (Baillie, 2008; Knai et al., 2007; Moghaddam et al., 2007; Popkin, 2004).

Par ailleurs dans notre série, la localisation la plus fréquente est le bas et moyen rectum avec 48 % et 43,4% respectivement, *Glcin Yegen et al*. ont décrits les même proportions dans leur population d'étude (Yegen et al., 2016).

Le type histologique le plus fréquemment rencontré dans le cancer rectal est l'adénocarcinome diagnostiqué dans 94% des cas de notre série, presque 89.2 % étaient des adénocarcinomes rectaux diagnostiqués dans la série de Rakici et al (Rakıcı et al., 2018). Cet adénocarcinome se développe à partir de l'épithélium glandulaire (Chou et al., 2011; Gado et al., 2014; Penna, 2008). Une proportion faible de l'adénocarcinome mucineux et le carcinomes en bague à chaton a été retrouvée. Ce sont des sous types histologiques qui constituent un facteur de mauvais pronostic, la présence de la mucine est un témoin de l'agressivité de la tumeur (O'Connell et al., 2004).

B. Quels effets du traitement néoadjuvant sur la tumeur et les caractéristiques ganglionnaires

La prise en charge actuelle des CR est complexe et nécessite des approches multidisciplinaires incluant la gastroentérologie, la chirurgie, l'oncologie, la radiothérapie et l'anatomopathologie, ainsi que le rôle important de l'oncogénétique (Berho et al., 2015) . La probabilité de survie à 5 ans est d'environ 55 % approximativement (De Bari et al., 2012).

La préservation sphinctérienne représentait une préoccupation majeur dans le traitement du cancer rectal, pour les tumeurs localement avancées du bas rectum (cT3/4, cN1/2) dont la marge anale est inférieur à 6 cm. En effet les études allemandes randomisées CCAO/ARO/AIO-94 ont montrées que la radiochimiothérapie néoadjuvante (CRT) suivie par une ETM est le traitement standard utilisé à l'échelle mondiale dans le traitement des tumeurs localement avancées (De Bari et al., 2012; Sauer et al., 2012). En effet, cela permettra de diminuer la taille de la tumeur, et d'augmenter les chances d'effectuer une préservation sphinctérienne en diminuant les taux de récidives locales (Chen and Lee, 2016).

L'altération de la qualité de vie des malades a été observée dans la plupart des cas. Une incontinence anale observée chez 50 % des patients, caractérisant le dysfonctionnement

intestinal, et une altération de la fonction sexuelle chez les hommes, avec une fréquence qui dépasse 50% et peut atteindre 90% (Franck Lazorthes, 2008), caractérisent le syndrome de la résection antérieur du rectum (SRA) en présence ou en absence du traitement néoadjuvant (Bregendahl et al., 2013). Un système de score a été validé depuis 2012 pour l'évaluation du SRA, il est constitué dans la plupart des cas d'une poly-exonération, des troubles de l'évacuation, une incontinence aux selles et/ou aux gaz, et une impériosité (Emmertsen and Laurberg, 2012; Juul et al., 2014a).

Losque les résultats oncologiques sont jugés équivalents la chirurgie conservatrice sphinctérienne est considérée supérieure à la chirurgie non conservatrice avec réalisation d'une stomie définitive c'est-à-dire que la qualité de vie des patients avec une stomie permanente est supposée être inférieure à celle des patients bénéficiant d'une chirurgie d'épargne rectale (Juul et al., 2014b). Une revue Cochrane a récemment douté sur la validité de cette hypothèse, et a conclu qu'aucune preuve claire n'a été trouvée concernant la qualité de vie entre les patients stomisés et non stomisés(Pachler and Wille-Jørgensen, 2012). Ceci est expliqué par l'apparition d'un certain degré de dysfonctionnement intestinal postopératoire chez 50% à 90% des patients qui ont subi une chirurgie avec conservation rectale (Bryant et al., 2012; Emmertsen and Laurberg, 2008).

Ce cancer est aussi caractérisé par une diffusion métastatique (hépatique et pulmonaire), et à des récidives locales très pénibles et généralement non résécables. Malgré les avancées réalisées dans sa prise en charge, son pronostic reste sombre.

Le siège du rectum représente la principale cause des difficultés qui entravent sa chirurgie, dont sa vascularisation lymphatique, ses rapports avec l'appareil sphinctérien et viscères urogénitaux, et son innervation étagée constituent les facteurs qui rendent la chirurgie du CR assez délicate et grevée de récidives, de troubles fonctionnels sphinctériens et de troubles urogénitaux (Buzatti and Petroianu, 2017).

La régression tumorale « réponse pathologique » après traitement néoadjuvant est représenté par la présence généralement de fibrose, de nécrose, de colloïde et de résidu tumorale en cas de réponse incomplète (Sakuyama et al., 2016). Ce paramètre important permet d'estimer l'efficacité du traitement néoadjuvant et constitue aussi une valeur pronostique (Bouzourene et al., 2003).

Après traitement néoadjuvant, nos patients étaient répondeurs (avec stigmates histologiques de réponse) à 78,7%, ce qui concorde avec les essais publiés (Gollins S. 2015). Une réponse

histologique complète a été retrouvé dans 17.2%, *Yilmaz Rakici* a rapporté un pourcentage de 20 % de réponse histologique complète après traitement néoadjuvant dans son travail (Rakıcı et al., 2018). 13.8 % était le taux de réponse thérapeutique complète retrouvé dans l'étude de Sakuyama et al. Intéressant 39 patients chez qui une chimioradiothérapie a été administrée comme traitement néoadjuvant (Sakuyama et al., 2018). Un taux de réponse pathologique élevé, avec 24 % de cas a été rapporté dans la série de *Matthew F et al* dans son étude réalisée sur 306 patients avec des tumeurs classées stade II et III (Kalady et al., 2009). La présence d'une bonne réponse thérapeutique dans notre série a été associée avec un stade II, III, et IV, un ratio des ganglions lymphatique élevé ainsi qu'une marge circonférentielle et une marge de résection saines. Plusieurs études ont corrélées entre les facteurs cliniques et pathologiques et la réponse aux traitements néoadjuvants, sans pouvoir déterminer des relations significatives (García-Aguilar et al., 2003). Par contre une étude plus large qui a intéressée 562 patients, réalisée par *Das et al* a montré une réponse pathologique complète dans 19 %, avec une association significative entre la réponse pathologique complète et une marge circonférentielle saine (Das et al., 2007).

Par contre, l'analyse de la survie globale et de la survie sans rechute n'a pas été associée dans notre étude avec la réponse thérapeutique au traitement néoadjuvant. Contrairement à l'étude de *Matthew et al* qui as montré une association entre une réponse complète et une diminution du taux de récidives locales, ainsi qu'une survie globale prolongée, comparée aux groupes qui ont une réponse incomplète (Kalady et al., 2009).

Le statut ganglionnaire représente un facteur pronostic important pour les patients traités avec un traitement néoadjuvant indépendamment du stade d'infiltration de la tumeur. Ces ganglions peuvent être de nature réactionnelle ne présentant aucune métastases, stérilisées ou métastatiques (Bibeau F.et al. 2014). L'analyse du statut ypN est liée d'une manière intrinsèque à la qualité de l'échantillonnage réalisé dans l'étape de l'examen macroscopique (Bibeau F. et al 2014).

Un nombre minimum de 12 ganglions lymphatiques a été recommandé pour permettre une meilleure estimation du statut ganglionnaire (Board, 2019, p. 20; Boutanos et al., 2019; Mechera et al., 2017; Sabbagh et al., 2014; Yegen et al., 2016).

Dans notre étude nous avons trouvé que le nombre moyen des ganglions lymphatiques retrouvé chez les patients qui ont reçus un traitement néoadjuvant a été de 12.68 GLs par patients (avec des extrêmes de 1- 40). Alors que le nombre moyen chez le groupe contrôle qui non pas reçu le

traitement néoadjuvant a été de 16.67 GLs (*p=0.0012*). 51% des patients avaient un nombre supérieur à 12 GLs contre 48.3% avec un nombre inférieur à 12 GLs. Approximativement, le même nombre a été rapporté par *Zhaomin et al* , 13 ganglions chez le groupe qui ont reçus le traitement néoadjuvant et 15 chez le groupe contrôle (Xu et al., 2016). Plusieurs études ont trouvé les mêmes résultats (Miller et al., 2012). En revanche d'autres études réalisés ont montrés que le traitement néoadjuvant diminue le nombre de ganglions lymphatiques à une valeur inférieur à 12 (Boutanos et al., 2019; Sprenger et al., 2010; Yegen et al., 2016).

Govindarajan et al. ont trouvé que le nombre moyen des ganglions positifs a été de 1.1 GL par patient, chez le groupe avec chirurgie seulement, et 0.4 dans le groupe avec traitement néoadjuvant. (Govindarajan et al., 2011). Dans notre série le nombre moyen des ganglions positifs a été de 1.05 dans le groupe de chirurgie contre 0.95 dans le groupe contrôle, cela reflète l'effet du traitement néoadjuvant sur la diminution du nombre des ganglions lymphatiques. L'effet de la radiothérapie sur la destruction des lymphocytes, la fibrose du stroma, et la radiosensibilité élevée des tissus lymphoïdes sont tous des facteurs qui peuvent expliquer la diminution dans le nombre et la taille des ganglions lymphatiques, ce qui peut rendre par conséquence leur détection difficile. (Fajardo, 1994; Shvero et al., 2001).

Nous avons également montré à travers cette étude que le nombre de ganglions métastatiques retrouvé est corrélé au nombre de ganglions totales disséqués, plus la taille de la pièce de résection est importante plus le nombre de ganglions lymphatiques est élevé. D'autres études ont montré les mêmes résultats (Gönen et al., 2009; Lu et al., 2013).

La taille médiane des ganglions lymphatiques disséqués a été de 3.2 mm, et la majorité des cas (51 %) ont une taille inférieure à 3.2 mm comme il a été rapporté par les autres articles publiés (Le et al., 2012; Marijnen et al., 2001; Sprenger et al., 2010) ce qui rend le curage ganglionnaire difficile à réaliser.

L'analyse de survie globale des patients en fonction du nombre optimal des GLs disséqués n'était pas concluante dans notre étude par rapport aux travaux de *Zhaomin et al. et Lykke et al* qui ont montré qu'un nombre optimal de 12 GLs a été associé avec une meilleure survie globale des patients (Lykke et al., 2015; Xu et al., 2016).

De manière à maitriser les difficultés des analyses liées au curage ganglionnaire, la méthode du ratio des ganglions lymphatique a été proposée en tant qu'une méthode alternative plus sensible pour l'analyse du pronostique des patients que le nombre totale des ganglions lymphatiques (Lu

et al., 2013; Sabbagh et al., 2014). En effet, notre analyse a montré qu'une valeur seuil de 0.13 a été prédictive de rechute.

Dans un autre volet, afin de caractériser le rôle que joue l'organisme dans sa défense contre les cellules tumorales, nous avons jugé essentiels de caractériser la réaction des lymphocytes B au niveau ganglionnaire. Effectivement, les centres germinatifs (GC) se forment dans les tissus lymphoïdes secondaires en réponse au défi antigénique et sont le site d'hypermutation somatique, générant des cellules B CG avec une affinité croissante pour l'agent incitant qui sont positivement sélectionnés au fil du temps(Suan et al., 2017).

L'activation d'un follicule lymphoïde conduit à la formation d'un centre germinatif composé de deux compartiments; une zone claire qui est le site ou les lymphocytes B testent leur récepteur d'antigène (BCR) contre l'antigène présenté sur les cellules dendritiques folliculaires (FDC), et une zone sombre qui est le site d'hypermutation somatique et de prolifération, ce qui permet de distinguer entre les différents processus moléculaires permettant une maturation efficace de l'affinité contre les antigènes (Bannard and Cyster, 2017). Les résultats de notre analyse ont montré une différence significative entre le nombre moyen élevé des centres germinatifs et un âge jeune, l'absence d'invasion vasculaire, un traitement néoadjuvant à base de radiothérapie exclusive, un ypN0 ainsi qu'à l'absence de métastases. Peu d'études ont analysés l'interaction entre les centres germinatifs et la réponse thérapeutique sur pièce de résection rectale.

La plupart se sont intéressésà l'analyse de la valeur pronostique de la réactivité histologique des ganglions lymphatiques. Or, les anciennes études réalisées par David J et al concernant le cancer du sigmoïde ont montrées que l'analyse des signes histologiques de réactivité lymphocytaire au sein des ganglions mésocoliques ont été associés à un meilleur pronostic dans les cancers du sigmoïde (Patt et al., 1975). Une hyperplasie paracorticale, des centres germinatifs corticaux, expliquait clairement la présence de réactivité lymphocytaire contre la tumeur, également elles reflètent la présence de macrophages dans les ganglions. Ainsi, une activité immunitaire anti-tumorale a été liée avec des signes de réactivité ganglionnaire (Pagès et al., 2008).

A la lumière des résultats qui caractérisent les ganglions lymphatiques, il est donc impératif de souligner d'une part le rôle essentiel du chirurgien dans l'étape de l'acte chirurgical qui est un facteur déterminant de la qualité de l'évaluation de l'atteinte ganglionnaire dans le mésorectum. Et d'autre part la place du pathologiste dans la qualité du curage ganglionnaire. Les techniques

courantes d'analyse macroscopique des ganglions lymphatiques recommandent l'utilisation des fixateurs aldéhydiques et en cas d'un curage insuffisant remportant moins de 12 ganglions lymphatiques il est recommandé de reprendre la pièce opératoire à la recherche de ganglions supplémentaires permettant une meilleur estimation du statut ganglionnaire (Paraf and Sabourin, 2000).

C. Quel impact de type de réponse histologique au niveau ganglionnaire sur le pronostic ?

L'analyse de la réponse thérapeutique sur les ganglions lymphatiques après traitement néoadjuvant a été largement négligé par les systèmes de classification des tumeurs rectales (Amin et al., 2017; Board, 2019).

De nombreux système de classification ont été proposés ; Ryan, Mandard, et Dworak (Dworak et al., 1997; Mandard et al., 1994; Ryan et al., 2005) se basant sur une estimation semi-quantitative de la régression tumorale et constituent une référence systématiquement utilisé par les pathologistes. Malgré ça elle a été confronté à des résultats discordantes entre les pathologistes spécialisés en gastro-intestinales (Chetty et al., 2012).

Dans cette partie de notre étude nous avons suggéré que l'effet thérapeutique évalué par un simple examen histologique pourrait être un facteur pronostic des patients. Une meilleure survie globale a été associée avec la présence combinée des deux ou des trois de réponse histologique ; fibrose, nécrose, et/ou colloïde, par rapport aux groupes de patients qui n'ont pas exprimés d'effet thérapeutique. Les investigations réalisées dans ce sens sont très rares, et seuls quelques auteurs ont analysés cette association. *See Hee Kim* a établi en 2016 de sa part un Dvorak modifié qui permet l'estimation de la réponse histologique après traitement néoadjuvant au niveau de la tumeur primitive et au niveau des ganglions lymphatiques disséqués. Egalement il a fait une analyse comparative entre les différents systèmes d'évaluation de la régression tumorale, Dvorak, Ryan AJCC et son système de Dvorak modifié. Il a finalement conclu que la prédiction de la survie globale et de la survie sans rechute est meilleure en utilisant le système ypstade associé au système Dvorak modifié comparé à l'utilisation du ypstade seul comme facteur prédictif (Kim et al., 2016).

D’autre part, Sataloff a utilisé une classification de la régression tumorale dans le cancer du sein, au niveau de la tumeur primitive et les ganglions périphériques après traitement néodajuvant suivi d’un traitement chirurgicale. Il a comparé la survie globale entre patients qui ont présenté une réponse complète versus réponse incomplète, et a pu conclure que 79% de la survie globale a été observé chez le groupe présentant une réponse histologique complète au niveau de la tumeur et de ganglions lymphatique. En effet ce système de classification aura un rôle important comme facteur pronostic. L’intégration de la réponse histologique ganglionnaire dans le compte rendu de résultat d’anatomie pathologique représente une nécessité ainsi que sa considération par les oncologues dans la prise en charge thérapeutique.

D. Biomarqueurs prédictifs et pronostiques de réponse au traitement néoadjuvant.

Actuellement, de nombreuses molécules ont été étudiées comme biomarqueurs potentiels de la radio et chimio-sensibilité dans le cancer du rectum. Bien que prometteurs, les résultats ont souvent été controversés et n’ont pas abouti à la mise en place de biomarqueurs individuels ni d’un panel de biomarqueurs pouvant être utilisés dans la routine pour distinguer les tumeurs rectales radio et chimio-sensibles des autres tumeurs (Bărbălan et al., 2018). Les groupes de chercheurs ont porté un challenge à la fois prometteur et prohibitive dans la détermination d’un panel restreint de biomarqueurs surtout, immunohistochimiques associés à un faible coût (Bărbălan et al., 2018).

A cet effet, nous avons essayé d’étudié et d’analyser les biomarqueurs qui peuvent être prédictifs de la réponse thérapeutique et pronostique, après le traitement néoadjuvant dans le cancer du rectum dans la population étudiée. En effet, un panel de 7 biomarqueurs a été étudié sur des biopsies avant traitement néoadjuvant pour réaliser cette analyse (Agostini et al., 2014; Kim et al., 2016).

La protéine p53 intervient dans le processus de régulation de la prolifération cellulaire, de la différentiation, de la réparation des altérations de l’ADN et de l’apoptose (Lane, 1992). Dans notre série une forte expression nucléaire analysée par immunohistochimie de la protéine p53 a été associée à une réponse thérapeutique incomplète ou partielle. *Hyuk hur et al* ont rapporté le même résultat dans leur travail réalisé sur 81 biopsies analysées avant traitement néoadjuvant (Hur et al., 2014). *Lin et al* ont montré dans leur étude réalisé sur 70 patients que l’absence d’expression de la protéine p53 sur les biopsies réalisées avant traitement était un bon facteur

prédictif d'une mauvaise réponse histologique(Lin et al., 2006). En effet, de nombreuses études ont expliqués cette hyperexpression protéique par une expression excessive du gène p53 sauvage aussi bien que par la stabilisation de la protéine p53 normale par liaison avec la protéine mdm2 ou avec une autre protéine (Bosari and Viale, 1995; Save et al., 1998). l'Association Américaine contre le cancer (AJCC) considère que le statut p53 est associé à une catégorie de marqueurs dont la valeur pronostique n'est pas suffisamment établit, et pour lesquels des investigations supplémentaires sont nécessaires notamment génétiques (Compton et al., 2000; Spolverato et al., 2011).

Par ailleurs, le profil des microsatellites dans le cancer colorectal (CRC) permet de donner des informations importantes sur le pronostic des patients (LAWES, 2003), en effet une meilleure survie globale a été associée avec une instabilité microsatellitaire de la tumeur (ELSALEH et al., 2000). Les protéines MMR jouent un rôle important dans l'identification des erreurs dans la séquence de l'ADN au cours du processus de réplication de l'ADN, ainsi que dans leur réparation(Yoon et al., 2011). L'accumulation des mutations dans la cellule est le résultat de l'inactivation de l'un de gènes codant pour les protéines de réparation des mésappariements de bases, cela conduit à la transformation maligne de la cellule (Duval and Hamelin, 2002; Lawes et al., 2003; Peltomäki, 2003). Une étude qui a été réalisée sur 209 patients atteints du cancer rectal a montré que la perte de l'expression de la protéine MSH6 est un facteur predictif independemment associé à la survie globale des patients, aussi bien il a montré que cette perte d'expression n'était pas associée à la réponse thérapeutique après traitement néoadjuvant (Huh et al., 2016). Dans notre étude l'analyse de l'expression des protéines MMR n'a pas montré une différence significative en terme de réponse thérapeutique et de survie des patients.

La protéine Ki-67 est un marquer de prolifération cellulaire, qui peut être détecté dans toutes les étapes et cycles de la différentiation cellulaire(SCHOLZEN, 2000). Son expression diffuse est associée à une réponse à la chimiothérapie. Dans notre contexte aucune association n'a été observée entre les différents groupes de réponse thérapeutique et l'expression du Ki-67. La majorité des études réalisées n'ont pas trouvé une association significative entre l'expression du Ki-67 et la réponse au traitement néoadjuvant (Bertolini et al., 2007; Jakob et al., 2008; Kudrimoti et al., 2007; Sturm et al., 2006). A l'exception, Huerta et al ont montré dans leur

analyse réalisé en 2010 que l'expression du Ki-67 est un facteur indépendamment prédictif de la réponse histologique après traitement néoadjuvant(Huerta et al., 2010). Bien que Ki-67 reflète le cycle cellulaire actif, il ne quantifie pas nécessairement la vitesse du processus de cycle cellulaire qui peut être le facteur critique de sensibilité à la chimiothérapie (Grem et al., 2001). Il est concevable que les tumeurs caractérisées par une expression élevée de Ki 67 peuvent avoir un temps de doublement relativement lents(Jakob et al., 2008).

Le récepteur 2 du facteur de croissance épidermal (HER2) a activité tyrosine kinase, joue un rôle dans la croissance, la division et la survie des cellules(Meng et al., 2014). L'expression positive de l'HER2 qui correspond dans notre étude au score 3 a été observée dans 5.3 % (3/57) des cas étudiés. Ceci a été confirmé dans la littérature selon les études réalisées qui ont retrouvées une expression dans 0.5% à 49.6% dans le cancer colorectal (Bang et al., 2010; Kruszewskia et al., 2010; Meng et al., 2015). En revanche *Mi Jung Kwon et al* ont retrouvé un taux de positivité supérieur, qui est égale à 17.6% dans les cas atteints d'un cancer rectal analysés par immunohistochime et/ou par hybridation insitu (Kwon et al., 2019).
Nous avons trouvé également qu'une expression membranaire forte (score 3+) de l'HER2 a été associée à un temps de rechute court des patients. D'autres travaux ont montré un résultat similaire en terme de survie, une hyperexpression de l'HER2 a été associée avec des faible taux de survie globale et de survie sans maladie chez les patients présentant un cancer colorectal (Heppner et al., 2014; Lim et al., 2013). Egalement, cette expression n'était pas associée avec la réponse thérapeutique au traitement neoadjuvant et avec la survie des patients comme il a été rapporté par l'étude de *Mi Jung Kwon et al* (Kwon et al., 2019). L'utilisation d'une amplification du gène HER2 s'avère importante même dans les cas présentant un score IHC HER2 de faible expression (score 0 et 1), vu que 7.7% des IHC HER2 0 et 11.1% des IHC HER2 1 ont montrés une amplification du gène HER2 (Kwon et al., 2019).

Pour les marqueurs génétiques dans notre étude le statut des mutations dans les gènes KRAS, KRAS et BRAF, chez les patients présentant un adénocarcinome rectal et qui ont reçu un traitement néoadjuvant suivi d'une chirurgie, a été étudié sur 57 biopsies prélevées avant traitement néoadjuvant. La majorité des mutations retrouvées dans notre série affectent le codon 12 et 13 (80%) (16/57) du gène KRAS cela correspond parfaitement à plusieurs travaux qui ont montré que 80% des mutations sont localisées dans le codon 12 et 13 du gène KRAS (Edkins

et al., 2006; JANAKIRAMAN et al., 2010; Smith et al., 2010) . Une étude similaire a été réalisée sur 47 patients, intéressant le gène KRAS a montré que 12/14 patients présentaient des mutations dans le codon 35 (Jo et al., 2016). Cela peut être expliqué par l'utilisation des technologies de séquençage plus sensibles et performantes comme SNaPshot ™, et le therascreen KRAS test. Ce dernier a été utilisé dans notre série mais a été limité seulement aux ADN présentant des difficultés d'amplification ou de séquençage du faible pourcentage de cellules tumorales. Les mutations du codon 12, 13 ont été retrouvées dans 27% des cas, tandis que les mutations retrouvées dans le gène NRAS ne représentaient que 2% selon *Vaughn et al* (Vaughn et al., 2011), ce qui rejoint les résultats trouvés dans notre série. La présence des mutations étaient sans valeur prédictive sur la réponse tumorale au traitement néoadjuvant et sur le pronostic des patients. Par ailleurs la présence des quatre mutations dans le codon 146 (A146T, A146V) du gène KRAS a été associée à l'apparition des métastases et récidives dans notre série. Dans la série de *Vhughn et al* deux rares mutations on étaient retrouvées dans le codon 14 (p.V141), ces mutations peuvent être pathogène selon la protéine recombinante résultante (Tyner et al., 2009). Véritablement, les mutations du gène KRAS provoque l'activation constitutive de la protéine KRAS et entraîne une dérégulation des processus en aval ainsi qu'une croissance cellulaire incontrôlable.

L'exploration de l'exon 15 du gène BRAF, n'a détecté aucune mutation dans cet exon, essentiellement la mutation V600E. Une autre mutation G1780A a été trouvée dans l'étude de *Gaedcke et al* qui a intéressée 94 patients, cette mutation conduit à la formation d'un nouveau acide aminé G594N tandis qu'aucune mutation V600E n'a été retrouvé (Gaedcke et al., 2010). Ainsi, la plupart des études qui ont analysé le statut mutationnel de l'exon 15 du gène BRAF ont montré que ces mutations sont fréquemment localisées dans le colon droit, et jouent un rôle mineur dans la carcinogenèse rectal par rapport à la carcinogenèse au niveau du colon(Gaedcke et al., 2010).

Par ailleurs, l'interaction entre les cellules du système immunitaire et les cellules cancéreuses fait partie des mécanismes de «l'immunosurveillance» ou récemment appelé « immunoedition » (Galon et al., 2012). D'une manière globale, un nouveau type de biomarqueur peut définir la composante intra-tumorale en cellules immunitaires. Ce biomarqueur pourra être complémentaire aux autres biomarqueurs liés d'une manière directe à la cellule tumorale (de Guillebon and Tartour, 2015) .

La révolution technologique qui a concerné les nanothechnologies, le système de calcul et d'imagerie ainsi que la pathologie digitale ont permis de mieux caractériser et d'identifier la composante de la cellule tumorale avec une grande précision et robustesse. Cela a permis de créer un terrain favorable pour la recherche et le développement de nouveaux biomarqueurs (Galon et al., 2006; Pagès et al., 2005)et a permis Aussi de comprendre le rôle que le système immunitaire joue dans la dynamique du cancer et de développer une méthode originale appelée « immunoscore ».

Des études ont montré que dans la plupart des tumeurs solides tel que le cancer colorectal, une forte infiltration immunitaire dans la tumeur a été associé à une survie prolongée (Fridman et al., 2012). Aussi dans la cohorte de Marria-Gabriela Anitei, qui a intéressé 111 patients une association significative a été retrouvé entre la densité des CD3+ et CD 8+ dans les régions de la tumeur et la survie globale et la survie sans maladie (Anitei et al., 2014). Ces résultats supportent les publications sur le cancer du rectum qui ont montré l'impact de l'association des lymphocytes T cytotoxiques avec une orientation immunitaire en faveur des lymphocytes Th1 (Jass, 1986; Nagtegaal et al., 2001; Szynglarewicz et al., 2007). Ces expériences ont donc suggérées que le comportement de la cellule tumorale est la conséquence d'un équilibre entre le processus d'invasion tumorale et la réponse immunitaire locale de l'hôte (Fridman et al., 2012; Hanahan and Weinberg, 2011).

Les résultats de notre étude concordent parfaitement avec la littérature, une forte infiltration lymphoïde au niveau du tissu tumoral avant traitement néoadjuvant est corrélée avec une réponse thérapeutique complète. D'autant plus la survie globale des patients dans notre série a été associée avec une forte densité de l'infiltration lymphocytaire.

L'élaboration de l'immunoscore à partir des biopsies réalisées à des fins de diagnostic est le seul matériel exempt d'effet de radiothérapie ou de chimiothérapie capable de donner une estimation réel et correcte sur le statut immunitaire sans biais dans le cancer du rectum.

Mlecnil et al. ont montré dans leur travail réalisé sur 599 tumeurs colorectales, que la densité intratumorale des cellules CD8 des lymphocytes T diminue progressivement avec l'augmentation de l'invasion tumorale. Des différences significatives en termes de densité immunitaire ont été observées entre les groupes de patients en fonction de l'extension de la tumeur (stade T) et de la présence de ganglions lymphatiques ou de métastases distantes (Bindea et al., 2013; Mlecnik et al., 2011).

Le travail réalisé sur 48 patients par *Maria-Gabriela Anitei* et. ainsi que d'autres publications ont mis en évidence une corrélation significative entre les densités de cellules CD3+ et les cellules CD8+ et la réponse au traitement néoadjuvant (Anitei et al., 2014; Yasuda et al., 2011). Cela a été également démontré dans notre étude, avec une association significative dans les différents groupes de réponses thérapeutiques et l'infiltration tumorale par chaque type de lymphocytes CD3+ et CD8+. Tandis que *Mélanie J*. n'avait pas trouvé les mêmes résultats dans sa cohorte intéressant 106 tumeurs rectales (McCoy et al., 2017, p.).

La présence de concordance entre les résultats de notre série et les autres travaux, a été remarquable, on tenant en considération la quantification des densités cellulaires par comptage à l'œil au microscope optique. Contrairement aux autres travaux qui ont utilisés la technique de construction d'un micoarray grâce à une station manuelle (Beecher Instruments, Alphelys, France) à partir d'un tissu tumoral (Galon et al., 2006), qui constitue un outil plus performant pour la détermination de l'immunoscore.

Nous avons été limités dans cette étude par le nombre limité des patients inclus dans l'analyse moléculaire et qui a un impact sur la robustesse des tests statistiques et l'analyse des résultats. D'autant plus le caractère rétrospectif de l'étude a un effet légèrement biaisant sur les résultats retrouvés. En plus, le manque de données sur certains paramètres, les perdus de vue sont aussi les limites de notre étude et devraient être améliorés dans une étude prospective.

Néanmoins ce travail reste le premier dans son genre au Maroc s'intéressant à la mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement néoadjuvant et pronostiques dans le cancer du rectum, travail ayant mis le point sur des marqueurs de la tumeur et de son microenvironnement.

Conclusion générale et perspectives

Le cancer du rectum est un problème majeur de santé public. L'efficacité du traitement néoadjuvant combinant la radiothérapie ou la chimioradiothérapie et la chirurgie avec exérèse totale du mésorectum a montré son intérêt dans la prise en charge des cancers du rectum localement avancés. Le but principal de la prise en charge multidisciplinaire est d'augmenter le taux de préservation sphinctérienne et de diminuer le taux de récidive locale. Le concept de résection tumorale locale avec la stratégie « Watch and wait » fait objet de nombreuses recherches cliniques et thérapeutique afin de diminuer les séquelles liées à la particularité anatomique du rectum, au traitement administré ainsi qu'aux complications post-chirurgicales. De manière remarquable, notre rapport représente la plus grande série au Maroc qui a mis la lumière sur les caractéristiques cliniques, épidémiologiques, pathologiques et moléculaires chez les patients marocains atteints de cancer rectal.

Bien que, d'énormes progrès ont été réalisés dans la compréhension de la biologie et de l'hétérogénéité du cancer du rectum, il reste encore beaucoup à faire afin de déterminer les patients à risque de récidive élevé nécessitant un traitement plus agressif. Quoi qu'il en soit, les décisions thérapeutiques sont basées sur les critères histopronostiques classiques que nous avons abordés. Ainsi le point majeure pour cette étude, est qu'il est essentiel de développer un ou de plusieurs biomarqueurs spécifiques potentiels, et de les valider pour l'utilisation en routine clinique pour la prédiction de la réponse au traitement néoadjuvant et le pronostic des patients avec un cancer rectal.

La détermination par la technique immunohistochimique de biomarqueurs prédictifs de réponse thérapeutique au traitement, a montré que la principale molécule de régulation du cycle cellulaire et d'apoptose est la p53 qui est fortement exprimée chez le groupe de patients présentant une réponse incomplète au traitement. Quoique l'expression protéique de la p53 reflète spécifiquement le profil d'altération génétique du gène *P53,* une analyse complémentaire de la recherche des altérations du gène p53 est primordiale pour conclure de la valeur prédictive de la protéine p53, pour la réponse thérapeutique ainsi que pour le pronostic. Concernant l'oncoprotéine membranaire HER2, une expression négative est plus fréquentes par rapport aux hyperexpressions immunohistochimiques. En plus, on pourra évoquer le rôle de la positivité de la protéine HER2 comme biomarqueur pronostic potentiel des patients avec cancer du rectum.

Ainsi il convient également pour plus de précision, de corréler entre les scores HER2 par immunohistochimie et l'amplification génétique du *HER2* en FISH.

La plupart des tumeurs analysées avant traitement néoadjuvant ont été caractérisées par un indice de prolifération cellulaire ki-67 d'expression nucléaire élevée, dont son rôle comme facteur prédictif de réponse aux traitements reste discutable. D'autant plus, les mutations du gène KRAS sont responsables dans la plupart du temps de la malignité de la tumeur par accélération du processus de division cellulaire et de la formation de métastases à distance. En effet, les mutations les plus fréquentes ont été retrouvées au niveau de l'exon 2 du gène KRAS suivi par l'exon 4. La présence des mutations dans le codon 146 (A146T, A146V) du gène KRAS sont prédictives d'apparition de métastases et de récidives.

Une forte infiltration lymphocytaire est liée avec une radiosensibilité et une chimiosensiblité remarquable des cellules tumorales. En conséquence, le test immunoscore devra figurer dans le rapport du compte rendu anatomopathologique, ainsi que sa considération par les cliniciens comme étant un biomarqueur pronostic de survie globale.

Perspectives :

Ce travail a pu mettre en évidence quelques biomarqueurs prédictifs et pronostic intéressants, facilement applicable eu routine. Cependant des études plus larges sont nécessaires afin de développer une signature moléculaire prédictive de réponse au traitement et pronostic afin de mieux sélectionner les patients à surveiller dans le but de limiter les complications post opératoires d'une chirurgie peut être réalisée par excès chez les patients avec réponse complète

Références bibliographiques

Aaltonen, L.A., Hamilton, S.R., 2000. Pathology and genetics of tumours of the digestive system - Missouri University of Science & Technology Library. consulté le 17.3.19.[http://publications.iarc.fr/Book-And-Report-Series/Who-Iarc-Classification-Of-tumours/Pathology-And-Genetics-Of-Tumours-Of-The-Digestive-System-2000]

Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J.-P., et al, 1993. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. Science 260, 812–816.

Agostini, M., Crotti, S., Bedin, C., Cecchin, E., Maretto, I., D'Angelo, E., et al, 2014. Predictive response biomarkers in rectal cancer neoadjuvant treatment. Front. Biosci. Sch. Ed. 6, 110–119.

Albert, M.L., Sauter, B., Bhardwaj, N., 1998. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. Nature 392, 86. https://doi.org/10.1038/32183

ALEXANDER, J., 2001. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. Am J Pathol 158, 527–535.

Amin, M.B., Edge, S.B., Greene, F.L., 2017. AJCC Cancer Staging Manual.p 159-190

Anitei, M.-G., Zeitoun, G., Mlecnik, B., Marliot, F., Haicheur, N., Todosi, A.-M., et al. 2014. Prognostic and predictive values of the immunoscore in patients with rectal cancer. Clin. Cancer Res. 20, 1891–1899.

Aparicio, T., 2007. Carcinogène colique, Données fondamentales. Gastroenterologie. consulté le 20.06.2018. [http://emvmsa1a.jouve-hdi.com/article/62134]

ARNAUD, J., 1980. Carcinoembryonic antigen (CEA) in diagnosis and prognosis of colorectal carcinoma. Colon Rectum 23, 141–144.

Arnold, M., Sierra, M.S., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., Bray, F., 2017. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. Gut 66, 683–691. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-310912

ASCO, 2018. colorectal cancer. consulté le 30.06.19.[https://www.cancer.net/cancer-types/colorectal-cancer/view-all]

Au, H.-J., Karapetis, C.S., Khambata-Ford, S., Jonker, D., Tu, D., Tebbutt, N.C., Price, T.J., Simes, R.J., Chalchal, H., Shapiro, J.D., 2008. K-ras mutations and benefit from Cetuximab in advanced colorectal cancer.

Baillie, K., 2008. Health implications of transition from a planned to a free-market economy–an overview. Obes. Rev. 9, 146–150.

Bang, Y.-J., Van Cutsem, E., Feyereislova, A., Chung, H.C., Shen, L., Sawaki, A., et al. 2010. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. The Lancet 376, 687–697.

Bannard, O., Cyster, J.G., 2017. Germinal centers: programmed for affinity maturation and antibody diversification. Curr. Opin. Immunol., Lymphocyte development and activation * Tumour immunology 45, 21–30. https://doi.org/10.1016/j.coi.2016.12.004

Bărbălan, A., Nicolaescu, A.C., Măgăran, A.V., MERCUŢ, R., BĂLĂŞOIU, M., BĂNCESCU, G., ŞERBĂNESCU, M.-S., LAZĂR, O.F., SĂFTOIU, A., 2018. Immunohistochemistry predictive markers for primary colorectal cancer tumors: where are we and where are we going? Rom J Morphol Embryol 59, 29–42.

Baxevanis, C.N., Papamichail, M., Perez, S.A., 2013. Immune classification of colorectal cancer patients: impressive but how complete? Expert Opin. Biol. Ther. 13, 517–526.

BECOUARN, Y., RULLIER, A., GORRY, P., SMITH, D., RICHARD-MOLARD, B., ECHINARD, E., TEXEREAU, P., BEYSSAC, R., LEGOUX, J.-L., LAMOULIATIE, H., 2005. Value of microsatellite instability typing in detecting hereditary non-polyposis colorectal cancer: A prospective multicentric study by the Association Aquitaine Gastro. Gastroentérologie Clin. Biol. 29, 667–675.

Bell, S., Kong, J.C., Wale, R., Staples, M., Oliva, K., Wilkins, S., Mc Murrick, P., Warrier, S.K., 2018. The effect of increasing body mass index on laparoscopic surgery for colon and rectal cancer. Colorectal Dis. 20, 778–788.

Benider, A., Bennani Othmani, M., Harif, M., Karkouri, M., Quessar, A., Sahraoui, S., Sqali, S., 2007. Registre des cancers de la région du Grand Casablanca, Année 2004. Assoc. Lalla Salma.72-79.

Bertolini, F., Bengala, C., Losi, L., Pagano, M., Iachetta, F., Dealis, C., Jovic, G., Depenni, R., Zironi, S., Falchi, A.M., Luppi, G., Conte, P.F., 2007. Prognostic and predictive value of baseline and posttreatment molecular marker expression in locally advanced rectal cancer treated with neoadjuvant chemoradiotherapy. Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys. 68, 1455–1461. https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2007.02.018

Bibeau, F., Frugier, H., Palasse, J., Leaha, C., Gunin de Vallerin, A., Château, M.C., 2011. Impact des traitements néoadjuvants des adénocarcinomes rectaux localement évolués sur la régression tumorale histologique de la tumeur primitive et des ganglions lymphatiques. Étude Prospect. Sur Une Sér. De 254.

Bibeau, F., Frugier, H., Pedot, M., Boissière-Michot, F., 2012. Instabilité microsatellitaire dans le cancer colorectal. Oncologie 14, 525–529. https://doi.org/10.1007/s10269-012-2203-4

Bibeau, Frédéric, Rullier, A., Jourdan, M.-F., Frugier, H., Palasse, J., Leaha, C., de Vallerin, A.G., Rivière, B., Bodin, X., Perrault, V., 2011. Prise en charge des cancers du rectum localement avancés: quel rôle pour le pathologiste en 2011?, in: Annales de Pathologie. Elsevier, pp. 433–441.

Bindea, G., Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Waldner, M., Obenauf, A.C., Angell, H., Fredriksen, T., Lafontaine, L., Berger, A., 2013. Spatiotemporal dynamics of intratumoral immune cells reveal the immune landscape in human cancer. Immunity 39, 782–795.

Board, W.C. of T.E., 2019. Digestive System Tumours, 5th ed.159-170.

Boissiere-Michot, F., Lopez-Crapez, E., Frugier, H., Berthe, M.-L., Ho-Pun-Cheung, A., Assenat, E., Maudelonde, T., Lamy, P.-J., Bibeau, F., 2012. KRAS genotyping in rectal adenocarcinoma specimens with low tumor cellularity after neoadjuvant treatment. Mod. Pathol. 25, 731–739.

Boland, C.R., Thibodeau, S.N., Hamilton, S.R., Sidransky, D., Eshleman, J.R., Burt, R.W., Meltzer, S.J., Rodriguez-Bigas, M.A., Fodde, R., Ranzani, G.N., 1998. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. AACR. 1998 Nov 15;58(22):5248-57.

Botteri E, Iodice S, Bagnardi V, Raimondi S, Lowenfels AB, Maisonneuve P. Smoking and colorectal cancer: a meta-analysis. JAMA. 2008; 300 (23):2765–2778.

BOS, J., 1988. The ras gene family and human carcinogenesis. Mutat Res 195, 255–271.

Bosari, S., Viale, G., 1995. The clinical significance of p53 aberrations in human tumours. Virchows Arch. 427, 229–241. https://doi.org/10.1007/BF00203389

Boutanos, C., Capdepont, M., Svrcek, M., Thélu, F., Guedj, N., Poizat, F., Bibeau, F., Turlin, B., Rousseau, A., Bardier, A., 2019. National multicentric evaluation of quality of pathology reports for rectal cancer in France in 2016. Virchows Arch. 474, 561–568.

Bouvier, M., 1991. Physiologie de la continence fécale et de la defecation. Arch. Int. Physiol. Biochim. Biophys. 99, A53–A63. https://doi.org/10.3109/13813459109145917

Bouzourene, H., Bosman, F.T., Matter, M., Coucke, P., 2003. Predictive factors in locally advanced rectal cancer treated with preoperative hyperfractionated and accelerated radiotherapy. Hum. Pathol. 34, 541–548.

Bray, F., Ferlay, J., Soerjomataram, I., Siegel, R.L., Torre, L.A., Jemal, A., 2018. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. CA. Cancer J. Clin. 68, 394–424. https://doi.org/10.3322/caac.21492

Bregendahl, S., Emmertsen, K.J., Lous, J., Laurberg, S., 2013. Bowel dysfunction after low anterior resection with and without neoadjuvant therapy for rectal cancer: a population-based cross-sectional study. Colorectal Dis. 15, 1130–1139.

Bryant, C.L., Lunniss, P.J., Knowles, C.H., Thaha, M.A., Chan, C.L., 2012. Anterior resection syndrome. Lancet Oncol. 13, e403–e408.

Buzatti, K.C. de L.R., Petroianu, A., 2017. Pathophysiological aspects of the low anterior resection syndrome for treatment of rectal cancer. Rev. Col. Bras. Cir. 44, 397–402. https://doi.org/10.1590/0100-69912017004003

Cancer today, 2018a. Cancer today. consulté le 02.03.19.[http://gco.iarc.fr/today/home]

Cao, K.J., Ma, G.S., Liu, Y.L., Wan, D.S., 2009. Incidence of colorectal cancer in Guangzhou City from 2000 to 2002. Chin J Cancer 28, 441–444.

CARETHERS, J., 2004. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. Gastroenterology 126, 394–401.

Cawkwell, L., Gray, S., Murgatroyd, H., Sutherland, F., Haine, L., Longfellow, M., O'Loughlin, S., Cross, D., Kronborg, O., Fenger, C., 1999. Choice of management strategy for colorectal cancer based on a diagnostic immunohistochemical test for defective DNA repair. Gut 45, 409–415.

Cedermark, B., Dahlberg, M., Glimelius, B., P\a ahlman, L., Rutqvist, L.E., Wilking, N., 1997. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. N. Engl. J. Med. 336, 980–987.

Chapusot, C., Martin, L., Puig, P.L., Ponnelle, T., Cheynel, N., Bouvier, A.M., Rageot, D., Roignot, P., Rat, P., Faivre, J., 2004. What Is the Best Way to Assess Microsatellite

Instability Status in Colorectal Cancer?: Study on a Population Base of 462 Colorectal Cancers. Am. J. Surg. Pathol. 28, 1553–1559.

Chbani, L., Hafid, I., Berraho, M., Nejjari, C., Amarti, A., 2012. Digestive cancers in Morocco: Fez-Boulemane region. Pan Afr. Med. J. 13, 46.

Chen, P.-C., Lee, J.-C., 2016. Treatment of locally advanced low rectal cancer. Formos. J. Surg. 49, 83–88. https://doi.org/10.1016/j.fjs.2016.02.003

Chen, W., Zheng, R., Baade, P.D., Zhang, S., Zeng, H., Bray, F., Jemal, A., Yu, X.Q., He, J., 2016. Cancer statistics in China, 2015. CA. Cancer J. Clin. 66, 115–132.

Chetty, R., Gill, P., Govender, D., Bateman, Adrian, Chang, H.J., Deshpande, V., Driman, D., Gomez, M., Greywoode, G., Jaynes, E., Lee, C.S., Locketz, M., Rowsell, C., Rullier, A., Serra, S., Shepherd, N., Szentgyorgyi, E., Vajpeyi, R., Wang, L.M., Bateman, Andrew, 2012. International study group on rectal cancer regression grading: interobserver variability with commonly used regression grading systems. Hum. Pathol. 43, 1917–1923. https://doi.org/10.1016/j.humpath.2012.01.020

Cho, E., 2004. Alcohol Intake and Colorectal Cancer: A Pooled Analysis of 8 Cohort Studies. Ann. Intern. Med. 140, 603. https://doi.org/10.7326/0003-4819-140-8-200404200-00007

Chou, C.-L., Chang, S.-C., Lin, T.-C., Chen, W.-S., Jiang, J.-K., Wang, H.-S., Yang, S.-H., Liang, W.-Y., Lin, J.-K., 2011. Differences in clinicopathological characteristics of colorectal cancer between younger and elderly patients: an analysis of 322 patients from a single institution. Am. J. Surg. 202, 574–582.

Claudio P, Irene T, Paolo B, Eva N & Carlo L-V. Alcohol Consumption and Cancer Risk, Nutrition and Cancer,2010. 63:7, 983-990.

Compton, C., Fenoglio-Preiser, C.M., Pettigrew, N., Fielding, L.P., 2000. American joint committee on cancer prognostic factors consensus conference: colorectal working group. cancer 88, 1739–1757.

CoPath, 2013. Cours. consulté le 14.04.19 .[http://campus.cerimes.fr/anatomie-pathologique/enseignement/anapath_18/site/html/2_2.html].

Cotte E, et al, 2019. « Cancer du rectum ». , in: Thésaurus National de Cancérologie Digestive, Mars 2019.

CSG5, N.I. for C., 2004. Guidance on cancer services: improving outcomes in colorectal cancers: manual update. National Institute for Clinical Excellence. Consulté le 10.06.2017.[https://www.nice.org.uk/guidance/CSG5]

Cui, Y., Yang, X., Shi, Z., Yang, Z., Du, X., Zhao, Z., Cheng, X., 2019. Radiomics analysis of multiparametric MRI for prediction of pathological complete response to neoadjuvant chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. Eur. Radiol. 29, 1211–1220. https://doi.org/10.1007/s00330-018-5683-9

Das, P., Skibber, J.M., Rodriguez-Bigas, M.A., Feig, B.W., Chang, G.J., Wolff, R.A., Eng, C., Krishnan, S., Janjan, N.A., Crane, C.H., 2007. Predictors of tumor response and downstaging in patients who receive preoperative chemoradiation for rectal cancer. Cancer 109, 1750–1755.

Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. Nature 417, 949–955.

De Bari, B., Bosset, J.-F., Gérard, J.-P., Maingon, P., Valentini, V., 2012. État des lieux du traitement multidisciplinaire du cancer du rectum. Cancer/Radiothérapie 16, 711–720.

de Calan, L., Gayet, B., Bourlier, P., Perniceni, T., 2004. Cancer du rectum : anatomie chirurgicale, préparation à l'intervention, installation du patient. EMC - Chir. 1, 275–292. https://doi.org/10.1016/j.emcchi.2004.03.002

de Guillebon, E., Tartour, E., 2015. Immunité antitumorale (mécanismes, immunoediting, immunosurveillance). Oncologie 17, 337–344. https://doi.org/10.1007/s10269-015-2542-z

DE LA CHAPELLE, A., 2004. Genetic predisposition to colorectal cancer. Nat. Rev Cancer 4, 769–780.

Deng, Y., 2017. Rectal Cancer in Asian vs. Western Countries: Why the Variation in Incidence? Curr. Treat. Options Oncol. 18, 64. https://doi.org/10.1007/s11864-017-0500-2

Devesa, S.S., Blot, W.J., Stone, B.J., Miller, B.A., Tarone, R.E., Fraumeni Jr, J.F., 1995. Recent cancer trends in the United States. JNCI J. Natl. Cancer Inst. 87, 175–182.

DREYER, C., RAYMOND, E., FAIVRE, S., 2009. La voie de signalisation P13K/AKT/mTOR. Cancéro Dig. 1, 187–189.

Dumont, F., Mariani, A., Elias, D., Goéré, D., 2015. Stratégie chirurgicale pour les cancers du bas rectum. J. Chir. Viscérale 152, 22–30. https://doi.org/10.1016/j.jchirv.2014.09.008

Dunn, G.P., Old, L.J., Schreiber, R.D., 2004. THE THREE ES OF CANCER IMMUNOEDITING. Annu Rev Immunol 22, 329–60.

Duval, A., Hamelin, R., 2002. Mutations at Coding Repeat Sequences in Mismatch. CANCER Res. 62, 2447–2454.

Dworak, O., Keilholz, L., Hoffmann, A., 1997. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. Int. J. Colorectal Dis. 12, 19–23.

Edge, S.B., Compton, C.C., 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th Edition of the AJCC Cancer Staging Manual and the Future of TNM. Ann. Surg. Oncol. 17, 1471–1474. https://doi.org/10.1245/s10434-010-0985-4

Edkins, S., O'Meara, S., Parker, A., Stevens, C., Reis, M., Jones, S., Greenman, C., Davies, H., Dalgliesh, G., Forbes, S., 2006. Recurrent KRAS codon 146 mutations in human colorectal cancer. Cancer Biol. Ther. 5 (8), 928-32;

El hairech, A.Achour, 2013. Cancer du rectum : aspect clinique et thérapeutique dans le service de Chirurgie générale à l'hôpital militaire de Marrakech. Thèse N 07 / *2013.*

El Sissy, C., Marliot, F., Haicheur, N., Kirilovsky, A., Scripcariu, D., Lagorce-Pagès, C., Galon, J., Pagès, F., 2017. Mise au point sur l'Immunoscore et ses potentielles implications cliniques, in: Annales de Pathologie. Elsevier, pp. 29–38.

Elidrissi Errahhali, Manal, Elidrissi Errahhali, Mounia, Ouarzane, M., Boulouiz, R., Bellaoui, M., 2017. Cancer incidence in eastern Morocco: cancer patterns and incidence trends, 2005–2012. BMC Cancer 17. https://doi.org/10.1186/s12885-017-3597-6

ELSALEH, H., POWELL, B., SOONTRAPORNCHAI, P., JOSEPH, D., GORIA, F., SPRY, N., IACOPETTA, B., 2000. p53 gene mutation, microsatellite instability and adjuvant chemotherapy: Impact on survival of 388 patients with Dukes' C colon carcinoma. Oncology 58, 52–59.

Emmertsen, K.J., Laurberg, S., 2012. Low anterior resection syndrome score: development and validation of a symptom-based scoring system for bowel dysfunction after low anterior resection for rectal cancer. Ann. Surg. 255, 922–928.

Emmertsen, K.J., Laurberg, S., 2008. Bowel dysfunction after treatment for rectal cancer. Acta Oncol. 47, 994–1003.

Erlandsson, J., Holm, T., Pettersson, D., Berglund, \AAke, Cedermark, B., Radu, C., Johansson, H., Machado, M., Hjern, F., Hallböök, O., 2017. Optimal fractionation of preoperative radiotherapy and timing to surgery for rectal cancer (Stockholm III): a multicentre, randomised, non-blinded, phase 3, non-inferiority trial. Lancet Oncol. 18, 336–346.

Fajardo, L.F., 1994. Effects of ionizing radiation on lymph nodes, in: The Lymphatic System and Cancer. Karger Publishers, pp. 37–45.

Faucheron, J.L., 1999. [Surgical anatomy of pelvic nerves]. Ann. Chir. 53, 985–989.

FAZIO, V.W., ZUTSHI, M., REMZI, F.H., PARC, Y., RUPPERT, R., FURST, A., CELEBREZZE, J., GALANDUIK, S., ORANGIO, G., HYMAN, N., 2007. A randomized multicenter trial to compare long-term functional outcome, quality of life, and complications of surgical procedures for low rectal cancers. Discuisson. Ann. Surg. 246, 481–490.

Fearon, E.R., Vogelstein, B., 1990. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61, 759–767. https://doi.org/10.1016/0092-8674(90)90186-I

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., Heanue, M., Colombet, M., Boyle, P., 2007. Estimates of the cancer incidence and mortality in Europe in 2006. Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol. 18, 581–592. https://doi.org/10.1093/annonc/mdl498

Ferlay, J., Colombet, M., Soerjomataram, I., Mathers, C., Parkin, D.M., Piñeros, M., Znaor, A., Bray, F., 2018. Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. Int. J. Cancer. https://doi.org/10.1002/ijc.31937

Ferlitsch, M., Moss, A., Hassan, C., Bhandari, P., Dumonceau, J.-M., Paspatis, G., Jover, R., Langner, C., Bronzwaer, M., Nalankilli, K., 2017. Colorectal polypectomy and endoscopic mucosal resection (EMR): European Society of Gastrointestinal Endoscopy (ESGE) clinical guideline. Endoscopy 49, 270–297.

Folkman, J., Hahnfeldt, P., Hlatky, L., 2000. OPINION: Cancer: looking outside the genome. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 1, 76.

Franck Lazorthes, 2008. Qualité de vie après chirurgie carcinologique du rectum. Gastroentérologie clinique & biologique. 24: 47-52

Fridman, W.H., Pages, F., Sautes-Fridman, C., Galon, J., 2012. The immune contexture in human tumours: impact on clinical outcome. Nat. Rev. Cancer 12, 298.

Fund, W.C.R., Research, A.I. for C., 2007. Food, nutrition, physical activity, and the prevention of cancer: a global perspective. Amer Inst for Cancer Research. Washington DC: AICR,280-290

Gado, A., Ebeid, B., Abdelmohsen, A., Axon, A., 2014. Colorectal cancer in Egypt is commoner in young people: Is this cause for alarm? Alex. J. Med. 50, 197–201.

Gaedcke, J., Grade, M., Jung, K., Schirmer, M., Jo, P., Obermeyer, C., Wolff, H.A., Herrmann, M.K., Beissbarth, T., Becker, H., Ried, T., Ghadimi, M., 2010. KRAS and BRAF mutations in patients with rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. Radiother.

Oncol. J. Eur. Soc. Ther. Radiol. Oncol. 94, 76–81. https://doi.org/10.1016/j.radonc.2009.10.001

Galon, J., Bruni, D., 2019. Approaches to treat immune hot, altered and cold tumours with combination immunotherapies. Nat. Rev. Drug Discov. 1.

Galon, J., Costes, A., Sanchez-Cabo, F., Kirilovsky, A., Mlecnik, B., Lagorce-Pagès, C., Tosolini, M., Camus, M., Berger, A., Wind, P., 2006. Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. Science 313, 1960–1964.

Galon, J., Pagès, F., Marincola, F.M., Angell, H.K., Thurin, M., Lugli, A., et al., 2012. Cancer classification using the Immunoscore: a worldwide task force. J. Transl. Med. 10, 205. https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-205

García-Aguilar, J., de Anda, E.H., Sirivongs, P., Lee, S.-H., Madoff, R.D., Rothenberger, D.A., 2003. A pathologic complete response to preoperative chemoradiation is associated with lower local recurrence and improved survival in rectal cancer patients treated by mesorectal excision. Dis. Colon Rectum 46, 298–304.

Gérard, J.-P., Azria, D., Gourgou-Bourgade, S., Martel-Laffay, I., Hennequin, C., Etienne, P.-L., Vendrely, V., François, E., de La Roche, G., Bouché, O., 2010. Comparison of two neoadjuvant chemoradiotherapy regimens for locally advanced rectal cancer: results of the phase III trial ACCORD 12/0405-Prodige 2. J. Clin. Oncol. 28, 1638–1644.

Glynne-Jones, R., Wyrwicz, L., Tiret, E., Brown, G., Rödel, C., Cervantes, A., Arnold, D., 2018. Rectal cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. Ann. Oncol. 29, iv263–iv263. https://doi.org/10.1093/annonc/mdy161

Godlewski, G., Prudhomme, M., 2000. Embryology and anatomy of the anorectum. Basis of surgery. Surg. Clin. North Am. 80, 319–343.

Goldberg, R.M., 2006. Intensive surveillance after stage II or III colorectal cancer: is it worth it? American Society of Clinical Oncology.

Golo, D., But-Hadzic, J., Anderluh, F., Brecelj, E., Edhemovic, I., Jeromen, A., Omejc, M., Oblak, I., Secerov-Ermenc, A., Velenik, V., 2018. Induction chemotherapy, chemoradiotherapy and consolidation chemotherapy in preoperative treatment of rectal cancer - long-term results of phase II OIGIT-01 Trial. Radiol. Oncol. 52, 267–274. https://doi.org/10.2478/raon-2018-0028

Gönen, M., Schrag, D., Weiser, M.R., 2009. Nodal staging score: a tool to assess adequate staging of node-negative colon cancer. J. Clin. Oncol. 27, 6166.

Govindarajan, A., Gönen, M., Weiser, M.R., Shia, J., Temple, L.K., Guillem, J.G., Paty, P.B., Nash, G.M., 2011. Challenging the Feasibility and Clinical Significance of Current Guidelines on Lymph Node Examination in Rectal Cancer in the Era of Neoadjuvant Therapy. J. Clin. Oncol. 29, 4568–4573. https://doi.org/10.1200/JCO.2011.37.2235

Grady, W.M., 2004. Genomic instability and colon cancer. Cancer Metastasis Rev. 23, 11–27.

Grem, J.L., Danenberg, K.D., Behan, K., Parr, A., Young, L., Danenberg, P.V., Nguyen, D., Drake, J., Monks, A., Allegra, C.J., 2001. Thymidine kinase, thymidylate synthase, and dihydropyrimidine dehydrogenase profiles of cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen. Clin. Cancer Res. 7, 999–1009.

Gunderson, L.L., Jessup, J.M., Sargent, D.J., Greene, F.L., Stewart, A.K., 2010. Revised TN Categorization for Colon Cancer Based on National Survival Outcomes Data. J. Clin. Oncol. 28, 264–271. https://doi.org/10.1200/JCO.2009.24.0952

Hahn, S.A., Schutte, M., Hooue, A., Moskaluk, C.A., Dacosta, L.T., Rozenblum, E., Weinstein, C.L., Fischer, A., Yeo, C.J., Hruban, R.H., 1996. A candidate tumor-suppressor gene at human-chromosome 18q21. 1. Science 271, 350–353.

Hamilton, W., Sharp, D., 2004. Diagnosis of colorectal cancer in primary care: the evidence base for guidelines. Fam. Pract. 21, 99–106.

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2011. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. Cell 144, 646–674. https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013

HEALD, R., 1986. Recurrence and survival after total mesorectal excision for rectal cancer. Lancet 1, 1479–1482.

Heald, R.J., Ryall, R., 1982. Recurrent cancer after restorative resection of the rectum. Br. Med. J. Clin. Res. Ed 284, 826–827.

Heppner, B.I., Behrens, H., Balschun, K., Haag, J., Krüger, S., Becker, T., Röcken, C., 2014. HER2/neu testing in primary colorectal carcinoma. Br. J. Cancer 111, 1977.

Hirata, Y., Kanno, K., Kishikawa, N., Tomoda, S., Kimura, K., Kobayashi, T., Miyamori, D., Otani, Y., Mizooka, M., Arihiro, K., Oka, S., Tanaka, S., Tazuma, S., 2018. Primary Signet Ring Cell Carcinoma of Rectum Diagnosed by Boring Biopsy in Combination with Endoscopic Mucosal Resection. Case Rep. Med. 2018. https://doi.org/10.1155/2018/5860815

Hötker, A.M., Garcia-Aguilar, J., Gollub, M.J., 2014. Multiparametric MRI of rectal cancer in the assessment of response to therapy: a systematic review. Dis. Colon Rectum 57, 790–799. https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000000127

Hsing, A.W., McLaughlin, J.K., Chow, W.-H., Schuman, L.M., Chien, H.T.C., Gridley, G., Bjelke, E., Wacholder, S., Blot, W.J., 1998. Risk factors for colorectal cancer in a prospective study among U.S. white men. Int. J. Cancer 77, 549–553. https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19980812)77:4<549::AID-IJC13>3.0.CO;2-1

Hu, H., Krasinskas, A., Willis, J., 2011. Perspectives on Current Tumor-Node-Metastasis (TNM) Staging of Cancers of the Colon and Rectum. Semin. Oncol., Colorectal Cancer 38, 500–510. https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2011.05.004

Huerta, S., Hrom, J., Gao, X., Saha, D., Anthony, T., Reinhart, H., Kapur, P., 2010. Tissue microarray constructs to predict a response to chemoradiation in rectal cancer. Dig. Liver Dis. 42, 679–684.

Huh, J.W., Kim, H.C., Kim, S.H., Park, Y.A., Cho, Y.B., Yun, S.H., Lee, W.Y., Park, H.C., Choi, D.H., Park, J.O., Park, Y.S., Chun, H.-K., 2016. Mismatch Repair Gene Expression as a Predictor of Tumor Responses in Patients With Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiation. Medicine (Baltimore) 95. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002582

Hur, H., Kim, N.K., Min, B.S., Baik, S.H., Lee, K.Y., Koom, W.S., Ahn, J.B., Kim, H., 2014. Can a biomarker-based scoring system predict pathologic complete response after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer? Dis. Colon Rectum 57, 592–601. https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000000109

Ilyas, M., Straub, J., Tomlinson, I.P., Bodmer, W.F., 1999. Genetic pathways in colorectal and other cancers. Eur. J. Cancer Oxf. Engl. 1990 35, 1986–2002.

Istvan, G., Lazorthes, F., Chérubin, M., Buisson, T., Gamagani, R., Chiotasso, P., 1997. [Preservation of sexual innervation in the surgery of rectal cancers]. Ann. Chir. 51, 678–681.

Jakob, C., Liersch, T., Meyer, W., Becker, H., Baretton, G.B., Aust, D.E., 2008. Predictive value of Ki67 and p53 in locally advanced rectal cancer: Correlation with thymidylate synthase and histopathological tumor regression after neoadjuvant 5-FU-based chemoradiotherapy. World J Gastroenterol 14, 1060–1066.

JANAKIRAMAN, M., VAKIANI, E., ZHAOSHI, Z., PRATILAS, C.A., TAYLOR, B.S., CHITALE, D., HALILOVIC, E., WILSON, M., HUBERMAN, K., RICARTE, J.C., 2010. Genomic and Biological Characterization of Exon 4 KRAS Mutations in Human Cancer. Cancer Res. 70, 5901–5911.

Jass, J.R., 1986. Lymphocytic infiltration and survival in rectal cancer. J. Clin. Pathol. 39, 585–589. https://doi.org/10.1136/jcp.39.6.585

Jass, J.R., O'brien, M.J., Riddell, R.H., Snover, D.C., Anatomic, A. of D. of, Pathology, S., 2007. Recommendations for the reporting of surgically resected specimens of colorectal carcinoma. Hum. Pathol. 38, 537–545.

Jeong, S.-Y., Park, J.W., Nam, B.H., Kim, S., Kang, S.-B., Lim, S.-B., Choi, H.S., Kim, D.-W., Chang, H.J., Kim, D.Y., 2014. Open versus laparoscopic surgery for mid-rectal or low-rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): survival outcomes of an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. Lancet Oncol. 15, 767.

Jo, P., König, A., Schirmer, M., Kitz, J., Conradi, L.-C., Azizian, A., Bernhardt, M., Wolff, H.A., Grade, M., Ghadimi, M., Ströbel, P., Schildhaus, H.-U., Gaedcke, J., 2016. Heterogeneity of KRAS Mutation Status in Rectal Cancer. PLOS ONE 11, e0153278. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0153278

Jones, P.A., Baylin, S.B., 2002. The fundamental role of epigenetic events in cancer. Nat. Rev. Genet. 3, 415.

JONKER, D.J., O'CALLAGHAN, C.J., KARAPETIS, C.S., ZALCBERG, J.R., DONGSHENG, T., AU, H.-J., BERRY, S.R., KRAHN, M., PRICE, T., SIMES, R.J., 2007. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 357, 2040–2048.

Juul, T., Ahlberg, M., Biondo, S., Emmertsen, K.J., Espin, E., Jimenez, L.M., Matzel, K.E., Palmer, G., Sauermann, A., Trenti, L., 2014a. International validation of the low anterior resection syndrome score. Ann. Surg. 259, 728–734.

Juul, T., Ahlberg, M., Biondo, S., Espin, E., Jimenez, L.M., Matzel, K.E., Palmer, G.J., Sauermann, A., Trenti, L., Zhang, W., Laurberg, S., Christensen, P., 2014b. Low Anterior Resection Syndrome and Quality of Life: an International Multicenter Study. Dis. Colon Rectum 57, 585. https://doi.org/10.1097/DCR.0000000000000116

Kalady, M.F., de Campos-Lobato, L.F., Stocchi, L., Geisler, D.P., Dietz, D., Lavery, I.C., Fazio, V.W., 2009. Predictive factors of pathologic complete response after neoadjuvant chemoradiation for rectal cancer. Ann. Surg. 250, 582–589.

Kang, S.-B., Park, J.W., Jeong, S.-Y., Nam, B.H., Choi, H.S., Kim, D.-W., Lim, S.-B., Lee, T.-G., Kim, D.Y., Kim, J.-S., 2010. Open versus laparoscopic surgery for mid or low rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy (COREAN trial): short-term outcomes of an open-label randomised controlled trial. Lancet Oncol. 11, 637–645.

Kemp, Z., Thirlwell, C., Sieber, O., Silver, A., Tomlinson, I., 2004. An update on the genetics of colorectal cancer. Hum. Mol. Genet. 13, R177–R185.

Kerr, D., 2003. Clinical development of gene therapy for colorectal cancer. Nat. Rev. Cancer 3, 615–622. https://doi.org/10.1038/nrc1147

Kim, S.H., Chang, H.J., Kim, D.Y., Park, J.W., Baek, J.Y., Kim, S.Y., Park, S.C., Oh, J.H., Yu, A., Nam, B.-H., 2016. What Is the Ideal Tumor Regression Grading System in Rectal Cancer Patients after Preoperative Chemoradiotherapy? Cancer Res. Treat. Off. J. Korean Cancer Assoc. 48, 998–1009. https://doi.org/10.4143/crt.2015.254

Kirzin, S., Duchalais, E., Rives, M., Game, X., Meurette, G., Portier, G., 2016. Recommandations pour la pratique clinique Cancer du rectum. Côlon Rectum 10, 28–34. https://doi.org/10.1007/s11725-015-0623-1

Knai, C., Suhrcke, M., Lobstein, T., 2007. Obesity in Eastern Europe: an overview of its health and economic implications. Econ. Hum. Biol. 5, 392–408.

KONDO, Y., 2004. Epigenetic changes in colorectal cancer. Cancer Metastasis Rev 23, 29–39.

Kruszewskia, W.J., Rzepkoc, R., Ciesielskia, M., Szefelb, J., Zielinskid, J., Szajewskia, M., Jasinskib, W., Kaweckib, K., Wojtackia, J., 2010. Expression of HER2 in colorectal cancer does not correlate with prognosis. Dis. Markers 29, 207–212.

Kudrimoti, M., Lee, E.Y., Kang, Y., Ahmed, M., Mohiuddin, M., 2007. Genetic markers predictive of response to induction chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancers. J. Ky. Med. Assoc. 105, 18–22.

Kwaan, M., n.d. Comprehensive Rectal Cancer Care. Springer. 10.1007/978-3-319-98902-0

Kwon, M.J., Soh, J.S., Lim, S.-W., Kang, H.S., Lim, H., 2019. HER2 as a limited predictor of the therapeutic response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. Pathol. Res. Pract. https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.01.037

lahlaidi anatomie topographique - Téléchargement gratuit, lire des documents pdf et des fichiers . consulté le 02.03.2018. [https://fradownme.com/fr/lahlaidi-anatomie-topographique]

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-Anal. Biol. Spéc. 23, 260–279. https://doi.org/10.1016/j.immbio.2008.07.016

Lane, D.P., 1992. Cancer. p53, guardian of the genome. Nature 359 (6395), 486-7. 1992. PMID 1406967.

LAUFMAN, H., SAPHIR, O., 1951. Primary linitis plastica type of carcinoma of the colon. AMA Arch. Surg. 62, 79–91.

Laurent-Puig, P., Agostini, J., Maley, K., 2010. Oncogenèse colorectale. Bull. Cancer (Paris) 97, 1311–1321. https://doi.org/10.1684/bdc.2010.1216

LAWES, D., 2003. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. Eur J Surg Oncol 29, 201–212.

Lawes, D.A., SenGupta, S., Boulos, P.B., 2003. The clinical importance and prognostic implications of microsatellite instability in sporadic cancer. Eur. J. Surg. Oncol. EJSO 29, 201–212.

Le, M., Nelson, R., Lee, W., Mailey, B., Duldulao, M., Chen, Y.-J., Garcia-Aguilar, J., Kim, J., 2012. Evaluation of lymphadenectomy in patients receiving neoadjuvant radiotherapy for rectal adenocarcinoma. Ann. Surg. Oncol. 19, 3713–3718.

Leblanc, F., Laurent, C., Rullier, E., 2008. Peut-on se passer d'un curage ganglionnaire dans le cancer du rectum ? J. Chir. (Paris), La chirurgie ganglionnaire dans les cancers viscéraux 145, 12S40-12S43. https://doi.org/10.1016/S0021-7697(08)45008-1

Liang, J.-T., Chang, K.-J., Chen, J.-C., Lee, C.-C., Cheng, Y.-M., Hsu, H.-C., Wu, M.-S., Wang, S.-M., Lin, J.-T., Cheng, A.-L., 1999. Hypermethylation of the p16 gene in sporadic T3N0M0 stage colorectal cancers: association with DNA replication error and shorter survival. Oncology 57, 149–156.

Lievre, A., Bachet, J.-B., Boige, V., Cayre, A., Le Corre, D., Buc, E., Ychou, M., Bouché, O., Landi, B., Louvet, C., 2008. KRAS mutations as an independent prognostic factor in patients with advanced colorectal cancer treated with cetuximab. J. Clin. Oncol. 26, 374–379.

LIEVRE, A., LAURENT-PUIG, P., 2010. La voie de signalisation RAS/MAPK. Cancéro Dig. 2, 38–42.

Lim, S.-W., Kim, Hye-Ran, Kim, H.-Y., Huh, J.-W., Kim, Y.-J., Shin, J.-H., Suh, S.-P., Ryang, D.-W., Kim, Hyeong-Rok, Shin, M.-G., 2013. Over-expression of Her-2 in colorectal

cancer tissue, but not in serum, constitutes an independent worse prognostic factor. Cell. Oncol. 36, 311–321.

Lin, L.-C., Lee, H.-H., Hwang, W.-S., Li, C.-F., Huang, C.-T., Que, J., Lin, K.-L., Lin, F.-C., Lu, C.-L., 2006. p53 and p27 as predictors of clinical outcome for rectal-cancer patients receiving neoadjuvant therapy. Surg. Oncol. 15, 211–216.

Lopes, G., Stern, M.C., Temin, S., Sharara, A.I., Cervantes, A., Costas-Chavarri, A., Engineer, R., Hamashima, C., Ho, G.F., Huitzil, F.D., Moghani, M.M., Nandakumar, G., Shah, M.A., Teh, C., Manjarrez, S.E.V., Verjee, A., Yantiss, R., Correa, M.C., 2019. Early Detection for Colorectal Cancer: ASCO Resource-Stratified Guideline. J. Glob. Oncol. 5, 1–22. https://doi.org/10.1200/JGO.18.00213

Lu, Y.-J., Lin, P.-C., Lin, C.-C., Wang, H.-S., Yang, S.-H., Jiang, J.-K., Lan, Y.-T., Lin, T.-C., Liang, W.-Y., Chen, W.-S., Lin, J.-K., Chang, S.-C., 2013. The Impact of the Lymph Node Ratio is Greater than Traditional Lymph Node Status in Stage III Colorectal Cancer Patients. World J. Surg. 37, 1927–1933. https://doi.org/10.1007/s00268-013-2051-4

Lykke, J., Jess, P., Roikjaer, O., Group, D.C.C., 2015. Increased lymph node yield is associated with improved survival in rectal cancer irrespective of neoadjuvant treatment: results from a national cohort study. Dis. Colon Rectum 58, 823–830.

Mandard, A.-M., Dalibard, F., Mandard, J.-C., Marnay, J., Henry-Amar, M., Petiot, J.-F., Roussel, A., Jacob, J.-H., Segol, P., Samama, G., 1994. Pathologic assessment of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy of esophageal carcinoma. Clinicopathologic correlations. Cancer 73, 2680–2686.

MARCUS, V., MADLENSKY, L., GRYFE, R., KIM, H., SO, K., MILLAR, A., TEMPLE, L., HSIEH, E., HIRUKI, T., NAROD, S., 1999. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: A practical test for dna mismatch repair-deficient tumors. Am. J. Surg. Pathol. 23, 1248–1255.

Marijnen, C.A.M., Nagtegaal, I.D., Kranenbarg, E.K., Hermans, J., Van de Velde, C.J.H., Leer, J.W.H., Van Krieken, J., Committee, P.R., Investigators, the C.C., 2001. No downstaging after short-term preoperative radiotherapy in rectal cancer patients. J. Clin. Oncol. 19, 1976–1984.

Martel, P., Malafosse, M., Lecomte, P., Gallot, D., 2004. Incontinence anale par rupture sphinctérienne : rôle de l'étiologie dans la qualité des résultats après réparation chirurgicale. Consulté le 12.04.2018 [https://www.em-consulte.com/en/article/24231]

Masson, E., n.d. Physiologie de la sensorimotricité colique et anorectale. EM-Consulte. Consulté le 24.02.19.[https://www.em-consulte.com/article/924716/physiologie-de-la-sensorimotricite-colique-et-anor]

Masui, H., Ike, H., Yamaguchi, S., Oki, S., Shimada, H., 1996. Male sexual function after autonomic nerve-preserving operation for rectal cancer. Dis. Colon Rectum 39, 1140–1145.

Maximiano, S., Magalhaes, P., Guerreiro, M.P., Morgado, M., 2016. Trastuzumab in the treatment of breast cancer. BioDrugs 30, 75–86.

McCoy, M.J., Hemmings, C., Anyaegbu, C.C., Austin, S.J., Lee-Pullen, T.F., Miller, T.J., Bulsara, M.K., Zeps, N., Nowak, A.K., Lake, R.A., Platell, C.F., 2017. Tumour-infiltrating regulatory T cell density before neoadjuvant chemoradiotherapy for rectal cancer does not predict treatment response. Oncotarget 8, 19803–19813. https://doi.org/10.18632/oncotarget.15048

Mechera, R., Schuster, T., Rosenberg, R., Speich, B., 2017. Lymph node yield after rectal resection in patients treated with neoadjuvant radiation for rectal cancer: a systematic review and meta-analysis. Eur. J. Cancer 72, 84–94.

Meng, X., Huang, Z., Di, J., Mu, D., Wang, Y., Zhao, X., Zhao, H., Zhu, W., Li, X., Kong, L., Xing, L., 2015. Expression of Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 in Resected Rectal Cancer. Medicine (Baltimore) 94. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000002106

Meng, X., Wang, R., Huang, Z., Zhang, J., Feng, R., Xu, X., Zhu, K., Dou, X., Chen, D., Yu, J., 2014. Human epidermal growth factor receptor-2 expression in locally advanced rectal cancer: Association with response to neoadjuvant therapy and prognosis. Cancer Sci 105, 818–824.

Meyerhardt, J.A., Mangu, P.B., Flynn, P.J., Korde, L., Loprinzi, C.L., Minsky, B.D., Petrelli, N.J., Ryan, K., Schrag, D.H., Wong, S.L., 2013. Follow-up care, surveillance protocol, and secondary prevention measures for survivors of colorectal cancer: American Society of Clinical Oncology clinical practice guideline endorsement. J Clin Oncol 31, 4465–4470.

Miller, E.D., Robb, B.W., Cummings, O.W., Johnstone, P.A., 2012. The effects of preoperative chemoradiotherapy on lymph node sampling in rectal cancer. Dis. Colon Rectum 55, 1002–1007.

Minamoto, T., Sawaguchi, K., Ohta, T., Itoh, T., Mai, M., 1994. Superficial-type adenomas and adenocarcinomas of the colon and rectum: A comparative morphological study. Gastroenterology 106, 1436–1443. https://doi.org/10.1016/0016-5085(94)90395-6

Missaoui, N., Jaidaine, L., Abdelkader, A.B., Beizig, N., Anjorin, A., Yaacoubi, M.T., Hmissa, S., 2010. Clinicopathological Patterns of Colorectal Cancer in Tunisia 4. Pan Afr Med J. 2017; 28: 121

Mlecnik, B., Tosolini, M., Kirilovsky, A., Berger, A., Bindea, G., Meatchi, T., Bruneval, P., Trajanoski, Z., Fridman, W.-H., Pagès, F., 2011. Histopathologic-based prognostic factors of colorectal cancers are associated with the state of the local immune reaction. J. Clin. Oncol. 29, 610–618.

Moghaddam, A.A., Woodward, M., Huxley, R., 2007. Obesity and Risk of Colorectal Cancer: A Meta-analysis of 31 Studies with 70,000 Events. Cancer Epidemiol. Prev. Biomark. 16, 2533–2547. https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-07-0708

Monier, R., 2000. Aspects fondamentaux : mécanismes de cancérogenèse et relation dose–effet. Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie 323, 603–610. https://doi.org/10.1016/S0764-4469(00)00161-X

MOORE, H., 2003. Adequacy of 1-cm distal margin after restorative rectal cancer resection with sharp mesorectal excision and preoperative combined-modality therapy. Ann Surg Oncol 10, 80–85.

Moore, M.J., French, A.J., Goldberg, R.M., Hamilton, S.R., Shepherd, L.E., Redston, M., Gallinger, S., 2003. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. N. Engl. J. Med. 349, 247.

Munemitsu, S., Albert, I., Souza, B., Rubinfeld, B., Polakis, P., 1995. Regulation of intracellular beta-catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor-suppressor protein. Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 3046–3050.

Murphy, N., Norat, T., Ferrari, P., Jenab, M., Bueno-de-Mesquita, B., Skeie, G., et al, 2012. Dietary fibre intake and risks of cancers of the colon and rectum in the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC). PloS One 7, e39361. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039361

Nagtegaal, I.D., Marijnen, C.A., Kranenbarg, E.K., Mulder-Stapel, A., Hermans, J., van de Velde, C.J., van Krieken, J.H.J., 2001. Local and distant recurrences in rectal cancer patients are predicted by the nonspecific immune response; specific immune response has only a systemic effect-a histopathological and immunohistochemical study. BMC Cancer 1, 7.

Nagtegaal, I.D., Marijnen, C.A., Kranenbarg, E.K., van de Velde, C.J., van Krieken, J.H.J., Investigators, P.R.C. the C.C., 2002a. Circumferential margin involvement is still an

important predictor of local recurrence in rectal carcinoma: not one millimeter but two millimeters is the limit. Am. J. Surg. Pathol. 26, 350–357.

NAGTEGAAL, I.D., TOT, T., JAYNE, D.G., MCSHANE, P., NIHLBERG, A., MARSHALL, H.C., PAHLMAN, L., BROWN, J.M., GUILLOU, P.J., QUIRKE, P., 2011. Lymph Nodes, Tumor Deposits, and TNM: Are We Getting Better? J. Clin. Oncol. 29, 2487–2492.

Nagtegaal, I.D., van de Velde, C.J., van der Worp, E., Kapiteijn, E., Quirke, P., Van Krieken, J., 2002b. Macroscopic evaluation of rectal cancer resection specimen: clinical significance of the pathologist in quality control. J. Clin. Oncol. 20, 1729–1734.

Nagtegaal, I.D., Van Krieken, J., 2002. The role of pathologists in the quality control of diagnosis and treatment of rectal cancer—an overview. Eur. J. Cancer 38, 964–972.

NAKAMURA, Y., 1993. The role of the APC (adenomatous polyposis coli) gene in human cancers. Adv Cancer Genet 62, 65–87.

Nash, G.M., Row, D., Weiss, A., Shia, J., Guillem, J.G., Paty, P.B., Gonen, M., Weiser, M.R., Temple, L.K., Fitzmaurice, G., 2011. A predictive model for lymph node yield in colon cancer resection specimens. Ann. Surg. 253, 318–322.

O'Connell, J.B., Maggard, M.A., Livingston, E.H., Cifford, K.Y., 2004. Colorectal cancer in the young. Am. J. Surg. 187, 343–348.

Olayioye, M.A., Neve, R.M., Lane, H.A., Hynes, N.E., 2000. The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. EMBO J. 19, 3159–3167.

OLSCHWANG, S., BONAÏTI, C., FEINGOLD, J., FREBOURG, T., GRANUJOUAN, S., LASSET, C., LAURENT-PUIG, P., LECURU, F., MILLAT, B., SOBOL, H., 2004. Identification et prise en charge du syndrome HNPCC (hereditary non polyposis colon cancer), prédisposition héréditaire aux cancers du côlon, du rectum et de l'utérus. Bull. Cancer (Paris) 91, 303–315.

Pachler, J., Wille-Jørgensen, P., 2012. Quality of life after rectal resection for cancer, with or without permanent colostomy. Cochrane Database Syst. Rev.

Pagès, F., Berger, A., Camus, M., Sanchez-Cabo, F., Costes, A., Molidor, R., Mlecnik, B., Kirilovsky, A., Nilsson, M., Damotte, D., 2005. Effector memory T cells, early metastasis, and survival in colorectal cancer. N. Engl. J. Med. 353, 2654–2666.

Pagès, F., Berger, A., Zinzindohoué, F., Kirilovsky, A., Galon, J., Fridman, W.-H., 2008. Implications immunologiques potentielles du curage ganglionnaire: Exemple du cancer colorectal. J. Chir. (Paris) 145, 12S6–12S12.

Paraf, F., Sabourin, J.-C., 2000. Nombre optimal de ganglions lymphatiques et métastases ganglionnaires occultes dans les cancers colorectaux: point de vue du pathologiste. Gastroentérologie Clin. Biol. 24, 423–429.

Parsons, R., Myeroff, L.L., Liu, B., Willson, J.K., Markowitz, S.D., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., 1995. Microsatellite instability and mutations of the transforming growth factor β type II receptor gene in colorectal cancer. Cancer Res. 55, 5548–5550.

Patt, D.J., Brynes, R.K., Vardiman, J.W., Coppleson, L.W., 1975. Mesocolic lymph node histology is an important prognostic indicator for patients with carcinoma of the sigmoid colon: an immunomorphologic study. Cancer 35, 1388–1397.

Peltomäki, P., 2003. Role of DNA Mismatch Repair Defects in the Pathogenesis of Human Cancer. J. Clin. Oncol. 21, 1174–1179. https://doi.org/10.1200/JCO.2003.04.060

Penna, C., 2008. Adénocarcinome du rectum : quelles explorations préthérapeutiques pour quels cancers. pages 126-132. 32, 5P2

PENNA, C., 2002. Prise en charge chirurgicale de la polypose adénomateuse familiale. J. Chir. (Paris) 139, 260–267.

Pessaux, P., Burtin, P., Arnaud, J.P., 2001. Recherche de l'extension locorégionale dans l'adénocarcinome rectal. Ann. Chir. 126, 10–17. https://doi.org/10.1016/S0003-3944(00)00451-X

Pfizenmaier, K., Bartsch, H., Scheurich, P., Seliger, B., Ücer, U., Vehmeyer, K., Nagel, G.A., 1985. Differential γ-interferon response of human colon carcinoma cells: inhibition of proliferation and modulation of immunogenicity as independent effects of γ-interferon on tumor cell growth. Cancer Res. 45, 3503–3509.

PIARD, F., MARTIN, L., CHAPUSOT, C., PONNELLE, T., FAIVRE, J., 2002. Les voies de la carcinogenèse colorectale: intérêt et application pour le pathologiste, in: Annales de Pathologie. Masson, pp. 277–288.

Popkin, B.M., 2004. The nutrition transition: an overview of world patterns of change. Nutr. Rev. 62, S140–S143.

Qin, Q., Huang, B., Cao, W., Zhou, J., Ma, T., Zhou, Z., Wang, J., Wang, L., 2017. Bowel dysfunction after low anterior resection with neoadjuvant chemoradiotherapy or chemotherapy alone for rectal cancer: a cross-sectional study from China. Dis. Colon Rectum 60, 697–705.

Quirke, P., Morris, E., 2007. Reporting colorectal cancer. Histopathology 50, 103–112.

Quirke, P., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Couture, J., O'Callaghan, C., Myint, A.S., Bessell, E., Thompson, L.C., 2009a. Effect of the plane of surgery achieved on locl recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. The Lancet 373, 821.

Quirke, P., Steele, R., Monson, J., Grieve, R., Khanna, S., Couture, J., O'Callaghan, C., Myint, A.S., Bessell, E., Thompson, L.C., 2009b. MRC CR07/NCIC-CTG CO16 Trial Investigators; NCRI Colorectal Cancer Study Group. Effect of the plane of surgery achieved on local recurrence in patients with operable rectal cancer: a prospective study using data from the MRC CR07 and NCIC-CTG CO16 randomised clinical trial. Lancet 373, 821–828.

Rahir, G., Moser, M., 2012. Tumor microenvironment and lymphocyte infiltration. Cancer Immunol. Immunother. 61, 751–759.

Rajagopalan, H., Nowak, M.A., Vogelstein, B., Lengauer, C., 2003. The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. Nat. Rev. Cancer 3, 695.

Rakıcı, S.Y., Bedir, R., Hatipoğlu, C., 2018. Are there predictors that can determine neoadjuvant treatment responses in rectal cancer? Turk. J. Gastroenterol. Off. J. Turk. Soc. Gastroenterol. 30(3): 220–227.

Rashid, A., Shen, L., Morris, J.S., Issa, J.-P.J., Hamilton, S.R., 2001. CpG Island Methylation in Colorectal Adenomas. Am. J. Pathol. 159, 1129–1135. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61789-0

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, 234–245.

Riou, B., 2012. Principales recommandations pour l'évaluation d'un biomarqueur. Biomarqueurs En Médecine D'urgence 7–18.

RÖDEL, C., MARTUS, P., PAPADOUPOLOS, T., FÜZESI, L., KLIMPFINGER, M., FIETKAU, R., LIERSCH, T., HOHENBERGER, W., RAAB, R., SAUER, R., 2005. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. J. Clin. Oncol. 23, 8688–8696.

Ronaghi, M., Uhlén, M., Nyrén, P. al, 1998. A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. Science 281, 363–365.

Rouanet, P., 2017. De qui peut-on se passer dans la prise en charge du cancer du rectum? Cancer/Radiothérapie 21, 536–538.

Rouvière, H., Cordier, G.J., Delmas, A., 1924. Anatomie humaine: descriptive et topographique. Masson Paris.

Rullier, A., Laurent, C., Capdepont, M., Vendrely, V., Belleannée, G., Bioulac-Sage, P., Rullier, E., 2008. Lymph nodes after preoperative chemoradiotherapy for rectal carcinoma: number, status, and impact on survival. Am. J. Surg. Pathol. 32, 45–50. https://doi.org/10.1097/PAS.0b013e3180dc92ab

RULLIER, E., DENOST, Q., VENDRELY, V., RULLIER, A., LAURENT, C., 2013. Low Rectal Cancer: Classification and Standardization of Surgery. Dis. Colon Rectum 56, 560–567.

Rullier, E., Rouanet, P., Tuech, J.-J., Valverde, A., Lelong, B., Rivoire, M., Faucheron, J.-L., Jafari, M., Portier, G., Meunier, B., 2017. Organ preservation for rectal cancer (GRECCAR 2): a prospective, randomised, open-label, multicentre, phase 3 trial. The Lancet 390, 469–479.

Ryan, R., Gibbons, D., Hyland, J.M.P., Treanor, D., White, A., Mulcahy, H.E., O'donoghue, D.P., Moriarty, M., Fennelly, D., Sheahan, K., 2005. Pathological response following long-course neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. Histopathology 47, 141–146.

Sabbagh, C., Mauvais, F., Cosse, C., Rebibo, L., Joly, J.-P., Dromer, D.,et al., APCD-LNR-2011 study group, 2014. A lymph node ratio of 10% is predictive of survival in stage III colon cancer: a French regional study. Int. Surg. 99, 344–353. https://doi.org/10.9738/INTSURG-D-13-00052.1

Sakuyama, N., Kojima, M., Kawano, S., Akimoto, T., Saito, N., Ito, M., Ochiai, A., 2016. Histological differences between preoperative chemoradiotherapy and chemotherapy for rectal cancer: a clinicopathological study. Pathol. Int. 66, 273–280. https://doi.org/10.1111/pin.12409

Sakuyama, N., Kojima, M., Kawano, S., Matsuda, Y., Mino-Kenudson, M., Ochiai, A., Ito, M., 2018. Area of residual tumor is a robust prognostic marker for patients with rectal cancer undergoing preoperative therapy. Cancer Sci. 109, 871–878. https://doi.org/10.1111/cas.13521

Sauer, R., Liersch, T., Merkel, S., Fietkau, R., Hohenberger, W., Hess, C., Becker, H., Raab, H.-R., Villanueva, M.-T., Witzigmann, H., 2012. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German

CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. J. Clin. Oncol. 30, 1926–1933.

Saurin, J.-C., 2008. La polypose adénomateuse familiale (PAF) atténuée : une entité à connaître. consulté le 02.10.18.[[https://www.em-consulte.com/en/article/173775]

Save, V., Nylander, K., Hall, P.A., 1998. Why is p53 protein stabilized in neoplasia? Some answers but many more questions! J. Pathol. J. Pathol. Soc. G. B. Irel. 184, 348–350.

Schlienger, J.-L., Luca, F., Vinzio, S., Pradignac, A., 2009. Obésité et cancer. Rev. Médecine Interne 30, 776–782. https://doi.org/10.1016/j.revmed.2009.04.007

SCHOLZEN, T., 2000. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. J Cell Physiol 182, 311–322.

Schreiber, R.D., Old, L.J., Smyth, M.J., 2011. Cancer Immunoediting: Integrating ImmunityLs Roles in Cancer Suppression and Promotion. 331 (6024), 1565-70.

Schreuders, E.H., Ruco, A., Rabeneck, L., Schoen, R.E., Sung, J.J.Y., Young, G.P., Kuipers, E.J., 2015. Colorectal cancer screening: a global overview of existing programmes. Gut 64, 1637–1649. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2014-309086

Sepulveda, A.R., Hamilton, S.R., Allegra, C.J., Grody, W., Cushman-Vokoun, A.M., Funkhouser, W.K., Kopetz, S.E., Lieu, C., Lindor, N.M., Minsky, B.D., 2017. Molecular biomarkers for the evaluation of colorectal cancer: guideline from the American Society for Clinical Pathology, College of American Pathologists, Association for Molecular Pathology, and American Society of Clinical Oncology. Am. J. Clin. Pathol. 147, 221–260.

Shvero, J., Koren, R., Marshak, G., Sadov, R., Hadar, T., Yaniv, E., Konichezsky, M., Feinmesser, R., Gal, R., 2001. Histological changes in the cervical lymph nodes after radiotherapy. Oncol. Rep. 8, 909–911.

Sinha, R., Rothman, N., Brown, E.D., Mark, S.D., Hoover, R.N., Caporaso, N.E., Levander, O.A., Knize, M.G., Lang, N.P., Kadlubar, F.F., 1994. Pan-fried meat containing high levels of heterocyclic aromatic amines but low levels of polycyclic aromatic hydrocarbons induces cytochrome P4501A2 activity in humans. Cancer Res. 54, 6154–6159.

Smith, G., Bounds, R., Wolf, H., Steele, R.J.C., Carey, F.A., Wolf, C.R., 2010. Activating K-Ras mutations outwith ‘hotspot’codons in sporadic colorectal tumours–implications for personalised cancer medicine. Br. J. Cancer 102, 693–703.

Smyth, M.J., Cretney, E., Takeda, K., Wiltrout, R.H., Sedger, L.M., Kayagaki, N., Yagita, H., Okumura, K., 2001. Tumor Necrosis Factor–related Apoptosis-inducing Ligand (TRAIL)

Contributes to Interferon–dependent Natural Killer Cell Protection from Tumor Metastasis. J. Exp. Med. 193, 661–670.

Soyka, J.D., Veit-Haibach, P., Strobel, K., Breitenstein, S., Tschopp, A., Mende, K.A., Lago, M.P., Hany, T.F., 2008. Staging Pathways in Recurrent Colorectal Carcinoma: Is Contrast-Enhanced 18F-FDG PET/CT the Diagnostic Tool of Choice? J. Nucl. Med. 49, 354–361. https://doi.org/10.2967/jnumed.107.048249

Spolverato, G., Pucciarelli, S., Bertorelle, R., De Rossi, A., Nitti, D., 2011. Predictive Factors of the Response of Rectal Cancer to Neoadjuvant Radiochemotherapy. Cancers 3, 2176–2194. https://doi.org/10.3390/cancers3022176

Sprenger, T., Rothe, H., Homayounfar, K., Beissbarth, T., Ghadimi, B.M., Becker, H., Liersch, T., 2010. Preoperative chemoradiotherapy does not necessarily reduce lymph node retrieval in rectal cancer specimens—results from a prospective evaluation with extensive pathological work-up. J. Gastrointest. Surg. 14, 96.

S.R. Hamilton, B. Vogelstein, S. Kudo, E. Riboli, S. Nakamura, P. Hainaut, 2000. Tumors of the colon and rectum.

Sturm, I., Rau, B., Schlag, P.M., Wust, P., Hildebrandt, B., Riess, H., Hauptmann, S., Dörken, B., Daniel, P.T., 2006. Genetic dissection of apoptosis and cell cycle control in response of colorectal cancer treated with preoperative radiochemotherapy. BMC Cancer 6, 124.

Suan, D., Sundling, C., Brink, R., 2017. Plasma cell and memory B cell differentiation from the germinal center. Curr. Opin. Immunol., Lymphocyte development and activation * Tumour immunology 45, 97–102. https://doi.org/10.1016/j.coi.2017.03.006

SURAWEERA, N., DUVAL, A., REPERANT, M., VAURY, C., FURLAN, D., LEROY, K., SERUCA, R., IACOPETTA, B., HAMELIN, R., 2002. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. Gastroenterology 123, 1804–1811.

Szynglarewicz, B., Matkowski, R., Suder, E., Sydor, D., Forgacz, J., Pude\lko, M., Grzebieniak, Z., 2007. Predictive value of lymphocytic infiltration and character of invasive margin following total mesorectal excision with sphincter preservation for the high-risk carcinoma of the rectum. Adv. Med. Sci. Gruyter Open 52. 52, 159-63.

Tajima, A., Hess, M.T., Cabrera, B.L., Kolodner, R.D., Carethers, J.M., 2004. The mismatch repair complex hMutSα recognizes 5-fluorouracil-modified DNA: Implications for chemosensitivity and resistance. Gastroenterology 127, 1678–1684.

Tazi, M.A., Er-Raki, A., Benjaafar, N., 2013. Cancer incidence in Rabat, Morocco: 2006–2008. Ecancermedicalscience 7.

TAZI Mohammed, BENJAAFAR Noureddine, ER-RAKI Abdelouahed, 2009. Cancer incidence in Rabat, 2005, 2009th ed. Rabat morocco.

THIBODEAU, S., BREN, G., SCHAID, D., 1993. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. Science 260, 816–819.

Tiret, E., Pocard, M., 1999. Exérèse totale du mésorectum et conservation de l'innervation à destinée génito-urinaire dans la chirurgie du cancer du rectum, in: Annales de Chirurgie. Elsevier, pp. 507–514.

Tong, G.-J., Zhang, G.-Y., Liu, J., Zheng, Z.-Z., Chen, Y., Niu, P.-P., Xu, X.-T., 2018. Comparison of the eighth version of the American Joint Committee on Cancer manual to the seventh version for colorectal cancer: A retrospective review of our data. World J. Clin. Oncol. 9, 148–161. https://doi.org/10.5306/wjco.v9.i7.148

Tyner, J.W., Erickson, H., Deininger, M.W., Willis, S.G., Eide, C.A., Levine, R.L., Heinrich, M.C., Gattermann, N., Gilliland, D.G., Druker, B.J., 2009. High-throughput sequencing screen reveals novel, transforming RAS mutations in myeloid leukemia patients. BLOOD 113.

Valentini, V., Aristei, C., Glimelius, B., Minsky, B.D., Beets-Tan, R., Borras, J.M., Haustermans, K., Maingon, P., Overgaard, J., Pahlman, L., 2009. Multidisciplinary rectal cancer management: 2nd European rectal cancer consensus conference (EURECA-CC2). Radiother. Oncol. 92, 148–163.

Valtorta, E., Martino, C., Sartore-Bianchi, A., Penaullt-Llorca, F., Viale, G., Risio, M., Rugge, M., Grigioni, W., Bencardino, K., Lonardi, S., Zagonel, V., Leone, F., Noe, J., Ciardiello, F., Pinto, C., Labianca, R., Mosconi, S., Graiff, C., Aprile, G., Frau, B., Garufi, C., Loupakis, F., Racca, P., Tonini, G., Lauricella, C., Veronese, S., Truini, M., Siena, S., Marsoni, S., Gambacorta, M., 2015. Assessment of a HER2 scoring system for colorectal cancer: results from a validation study. Mod. Pathol. 28, 1481–1491. https://doi.org/10.1038/modpathol.2015.98

VAN CUTSEM, E., KÖHNE, C.-H., HITRE, E., ZALUSKI, J., CHANGCHIEN, C.-R., MAKHSON, A., D'HAENS, G., PINTER, T., LIM, R., BODOKY, G., 2009. Cetuximab and Chemotherapy as Initial Treatment for Metastatic Colorectal Cancer. N. Engl. J. Med. 360, 1408–1417.

Vasen, H.F., Watson, P., Mecklin, J.-P., Lynch, H.T., 1999. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. Gastroenterology 6, 1453–1456.

Vather, R., Sammour, T., Kahokehr, A., Connolly, A., Hill, A., 2011. Quantitative lymph node evaluation as an independent marker of long-term prognosis in stage III rectal cancer. ANZ J. Surg. 81, 883–888. https://doi.org/10.1111/j.1445-2197.2010.05595.x

Vaughn, C.P., ZoBell, S.D., Furtado, L.V., Baker, C.L., Samowitz, W.S., 2011. Frequency of KRAS, BRAF, and NRAS mutations in colorectal cancer. Genes. Chromosomes Cancer 50, 307–312.

Washington, M.K., Berlin, J., Branton, P., Burgart, L.J., Carter, D.K., Fitzgibbons, P.L., Halling, K., Frankel, W., Jessup, J., Kakar, S., Minsky, B., Nakhleh, R., Compton, C.C., 2009. Protocol for the Examination of Specimens From Patients With Primary Carcinoma of the Colon and Rectum. Arch. Pathol. Lab. Med. 133, 1539–1551. https://doi.org/10.1043/1543-2165-133.10.1539

Westra, J.L., Schaapveld, M., Hollema, H., de Boer, J.P., Kraak, M.M., de Jong, D., ter Elst, A., Mulder, N.H., Buys, C.H., Hofstra, R.M., 2005. Determination of TP53 mutation is more relevant than microsatellite instability status for the prediction of disease-free survival in adjuvant-treated stage III colon cancer patients. J Clin Oncol 23, 5635–5643.

Xu, Z., Berho, M.E., Becerra, A.Z., Aquina, C.T., Hensley, B.J., Arsalanizadeh, R., Noyes, K., Monson, J.R.T., Fleming, F.J., 2016. Lymph node yield is an independent predictor of survival in rectal cancer regardless of receipt of neoadjuvant therapy. J. Clin. Pathol. jclinpath-2016-203995. https://doi.org/10.1136/jclinpath-2016-203995

Yang, J.-J., Kang, J.-S., Krauss, R.S., 1998. Ras signals to the cell cycle machinery via multiple pathways to induce anchorage-independent growth. Mol. Cell. Biol. 18, 2586–2595.

Yang, Y., Wang, G., He, J., Zhang, J., Xi, J., Wang, F., 2018. High tie versus low tie of the inferior mesenteric artery in colorectal cancer: a meta-analysis. Int. J. Surg. 52, 20–24.

Yarden, Y., Sliwkowski, M.X., 2001. Untangling the ErbB signalling network. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 127.

Yasuda, K., Nirei, T., Sunami, E., Nagawa, H., Kitayama, J., 2011. Density of CD4 (+) and CD8 (+) T lymphocytes in biopsy samples can be a predictor of pathological response to chemoradiotherapy (CRT) for rectal cancer. Radiat. Oncol. 6, 49.

Yegen, G., Keskin, M., Büyük, M., Kunduz, E., Balık, E., Sağlam, E.K., Kapran, Y., Asoğlu, O., Güllüoğlu, M., 2016. The effect of neoadjuvant therapy on the size, number, and distribution of mesorectal lymph nodes. Ann. Diagn. Pathol. 20, 29–35. https://doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2015.10.008

Yoon, Y.S., Yu, C.S., Kim, T.W., Kim, J.H., Jang, S.J., Cho, D.H., Roh, S.A., Kim, J.C., 2011. Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses. J. Gastroenterol. Hepatol. 26, 1733–1739.

Zhan, T., Gu, J., Li, M., Du, C., 2013. Intermediate-Fraction Neoadjuvant Radiotherapy for Rectal Cancer. Dis. Colon Rectum 56, 422. https://doi.org/10.1097/DCR.0b013e31828576c6

Annexes

Annexe 1 : classification histologique du colon et du rectum selon l'OMS (Board, 2019)

Benign epithelial tumours and precursors

8213/0*	Serrated dysplasia, low grade
8213/2*	Serrated dysplasia, high grade
	Hyperplastic polyp, microvesicular type
	Hyperplastic polyp, goblet cell
8210/0*	Adenomatous polyp, low-grade dysplasia
8210/2*	Adenomatous polyp, high-grade dysplasia
8211/0*	Tubular adenoma, low grade
8211/2*	Tubular adenoma, high grade
8261/0*	Villous adenoma, low grade
8261/2*	Villous adenoma, high grade
8263/0*	Tubulovillous adenoma, low grade
8263/2*	Tubulovillous adenoma, high grade
	Advanced adenoma
8148/0	Glandular intraepithelial neoplasia, low grade
8148/2	Glandular intraepithelial neoplasia, high grade

Malignant epithelial tumours

8140/3	Adenocarcinoma NOS
8213/3	Serrated adenocarcinoma
8262/3*	Adenoma-like adenocarcinoma
8265/3	Micropapillary adenocarcinoma
8480/3	Mucinous adenocarcinoma
8490/3	Poorly cohesive carcinoma
8490/3	Signet-ring cell carcinoma
8510/3	Medullary adenocarcinoma
8560/3	Adenosquamous carcinoma
8020/3	Carcinoma, undifferentiated, NOS
8033/3*	Carcinoma with sarcomatoid component
8240/3	Neuroendocrine tumour NOS
8240/3	Neuroendocrine tumour, grade 1
8249/3	Neuroendocrine tumour, grade 2
8249/3	Neuroendocrine tumour, grade 3
8152/3	L-cell tumour
8152/3	Glucagon-like peptide-producing tumour
8152/3	PP/PYY-producing tumour
8241/3	Enterochromaffin-cell carcinoid
8241/3	Serotonin-producing tumour
8246/3	Neuroendocrine carcinoma NOS
8013/3	Large cell neuroendocrine carcinoma
8041/3	Small cell neuroendocrine carcinoma
8154/3	Mixed neuroendocrine–non-neuroendocrine neoplasm (MiNEN)

These morphology codes are from the International Classification of Diseases for Oncology, third edition, second revision (ICD-O-3.2) [1378A]. Behaviour is coded /0 for benign tumours; /1 for unspecified, borderline, or uncertain behaviour; /2 for carcinoma in situ and grade III intraepithelial neoplasia; /3 for malignant tumours, primary site; and /6 for malignant tumours, metastatic site. Behaviour code /6 is not generally used by cancer registries.

This classification is modified from the previous WHO classification, taking into account changes in our understanding of these lesions.

* Codes marked with an asterisk were approved by the IARC/WHO Committee for ICD-O at its meeting in April 2019.

Annexe 2

Fiche clinique

GENERALITEES :

Numéro d'identification (initiale du nom et du prénom) : |_|_|_|_|

Numéro Anapath : |_|_|_|_|

Sexe : ☐ M ☐ F

Date de naissance : ...../...../.....

Ville de naissance : .....

Origine ethnique : .....

Statut matrimonial : ☐ célibataire ☐ Marié ☐ Divorcé

Profession : .....

DONNEES CLINIQUES

Type de traitement néoadjuvant : ☐ RCC protocole long

☐ RCC protocole court

Dose d'irradiation : .....

Durée d'irradiation : .....

Chimiothérapie néoadjuvante : .....

Siège : ☐ Bas rectum

☐ Moyen rectum

☐ Haut rectum

Distance marge anale : ..... cm

Type de résection : .....

Date de début des symptômes : ..... /...../.....

Date du diagnostic de la maladie : ...../..... /.....

Durée entre Radio-chimiothérapie et l'intervention chirurgicale : .....

Date d'intervention chirurgicale : ……. /……../……..

Date de métastase : ……/……../…….

Siège de métastases : ……

Date de récidive : ……/……./……

Date de dernière consultation : ……/……./……

Date de perte de vue : ……../……./……

Date de décès : ……./……../……..

Survie avec maladie : ☐ oui ☐ non

DONNEES ANATOMOPATHOLOGIQUES

BIOPSIES

Références anapath : …….

Nombre : ……. Taille ……..mm Fixateur : fomol

Siège : ▢ bas rectum ▢ moyen rectum ▢ haut rectum

Type hitologique:

▢ Adénocarcinome ▢ Adénocarcinome mucineux

▢ Carcinome à cellule indépendantes ▢ Adénocarcinome adénosquameux

▢ Carcinome médullaire ▢ carcinome indifférencié

Degré de différenciation :

▢ Bien ▢ moyen ▢ peu ▢ indifférencié

Stroma :

▢ Inflammatoire ▢ scléreux ▢ mucineux

Lésions associées :

DONNES ANATOMOPATHOLOGIQUES

PIECES

Référence Anapath : …….

Macroscopie :

Type de résection :…….

Dimensions : L : …… cm

Aspect macroscopique de la tumeur : ▢ bourgeonnante

▢ Ulcéro-bourgeonnante

☐ Infiltrante

☐ Ulcéro-infiltrante

☐ Ulcérée

☐ Pédiculée

Taille tumorale : ……. Cm

Limite radiaire : ……mm

Limite périphérique : ……..mm

Siège : ☐ Haut rectum

☐ Moyen rectum

☐ Bas rectum

Limites longitudinales : proximale :……. Distale……..

Perforation : ☐ oui ☐ non

Obstruction : ☐ oui ☐ non

Dilatation proximale : ☐ oui ☐ non

Histo-pathologie :

Type hitologique:

☐ Adénocarcinome ☐ Adénocarcinome mucineux

☐ Carcinome à cellule indépendantes ☐ Adénocarcinome adénosquameux

☐ Carcinome médullaire ☐ carcinome indifférencié

Degré de différenciation :

☐ Bien ☐ moyen ☐ peu ☐ indifférencié

Présence d'embole vasculaire : ☐ oui ☐ non

Présence d'engainement périnérveux : ☐ oui ☐ non

Limite circonférentielle : …… mm

ypT : ……..

ypN : …….

% de réponse thérapeutique : **……**%

Dvorak : ▢ **Dvorak 1**

▢ **Dvorak 2**

▢ **Dvorak 3**

▢ **Dvorak 4**

Annexe 3

.Séquence nucléotidique du gène KRAS

ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCC
TTGACGATACAGCTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATA
GAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGAT
ATTCTCGACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACAGTGCAATGAGGGACCAGTACATG
AGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATCATTT
GAAGATATTCACCATTATAGAGAACAAATTAAAAGAGTTAAGGACTCTGAAGAT
GTACCTATGGTCCTAGTAGGAAAT**AAA**TGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGAC
ACAAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTATGGAATTCCTTTTATTGAAACA
TCA**GCA**AAGACAAGACAGGGTGTTGATGATGCCTTCTATACATTAGTTCGAGAA
ATTCGAAAACATAAAGAAAAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAGAAAAAGAAG
TCAAAGACAAAGTGTGTAATTATGTAA

Séquence nucléotidique du gène NRAS

ATGACTGAGTACAAACTGGTGGTGGTTGGAGCAGGTGGTGTTGGGAAAAGCGCA
CTGACAATCCAGCTAATCCAGAACCACTTTGTAGATGAATATGATCCCACCATA
GAGGATTCTTACAGAAAACAAGTGGTTATAGATGGTGAAACCTGTTTGTTGGAC
ATACTGGATACAGCTGGACAAGAAGAGTACAGTGCCATGAGAGACCAATACATG
AGGACAGGCGAAGGCTTCCTCTGTGTATTTGCCATCAATAATAGCAAGTCATTT
GCGGATATTAACCTCTACAGGGAGCAGATTAAGCGAGTAAAAGACTCGGATGAT
GTACCTATGGTGCTAGTGGGAAACAAGTGTGATTTGCCAACAAGGACAGTTGAT
ACAAAACAAGCCCACGAACTGGCCAAGAGTTACGGGATTCCATTCATTGAAACC
TCAGCCAAGACCAGACAGGGTGTTGAAGATGCTTTTTACACACTGGTAAGAGAA
ATACGCCAGTACCGAATGAAAAAACTCAACAGCAGTGATGATGGGACTCAGGGT
TGTATGGGATTGCCATGTGTGGTGATGTAA

Séquence nucléotidique du gène BRAF

TCTTCATGAAGACCTCACAGTAAAAATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACAGTGAA
ATCTCGATGGAGTGGGTCCCATCAGTTTGAACAGTTGTCTGGATCCATTTTGTG
GATGGCACCAGAAGTCATCAGAATGCAAGATAAAAATCCATACAGCTTTCAGTC
AGATGTATATGCATTTGGAATTGTTCTGTATGAATTGATGACTGGACAGTTACC
TTATTC