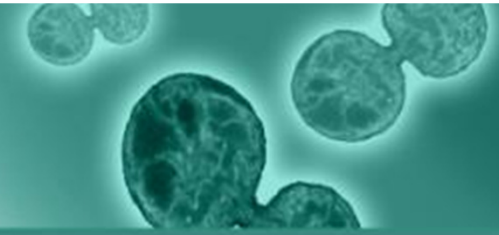




Inserm



Pathologie moléculaire dans le cancer colorectal

L'exemple des mutations du gène *KRAS*

Dr. Marius Ilie

8 novembre 2011

Laboratoire de Pathologie Clinique et Expérimentale, Hôpital Pasteur
INSERM ERI21, Faculté de Médecine de Nice

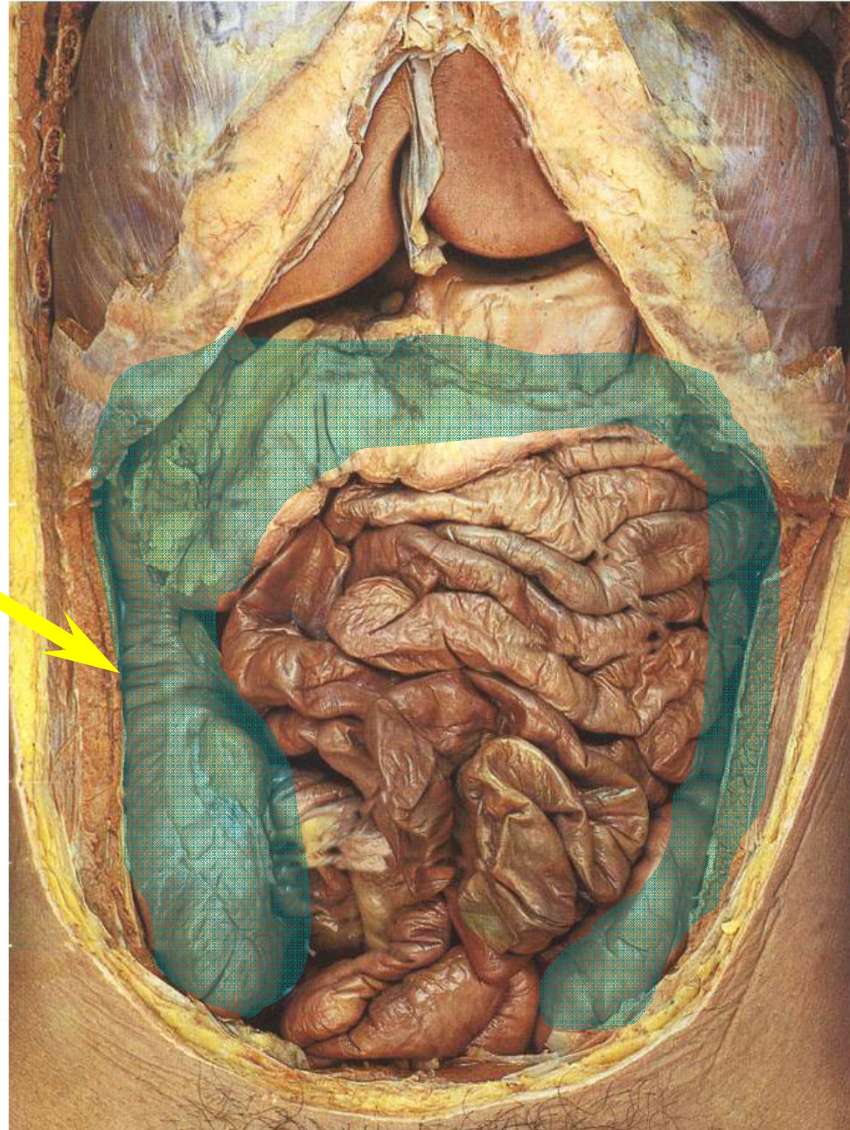
Rôle de la pathologie moléculaire?

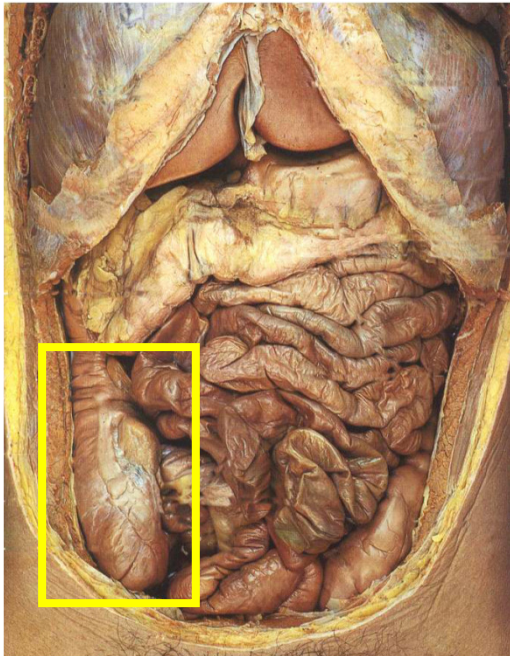
A decorative header image showing a microscopic view of several cells, possibly yeast or bacteria, with a greenish tint. The cells are of various sizes and some appear to be budding or dividing. The background is a gradient of light to dark green.

- **Diagnostic anatomo-pathologique**
 - **Diagnostic moléculaire**
-

Anatomie du colon

CADRE COLIQUE



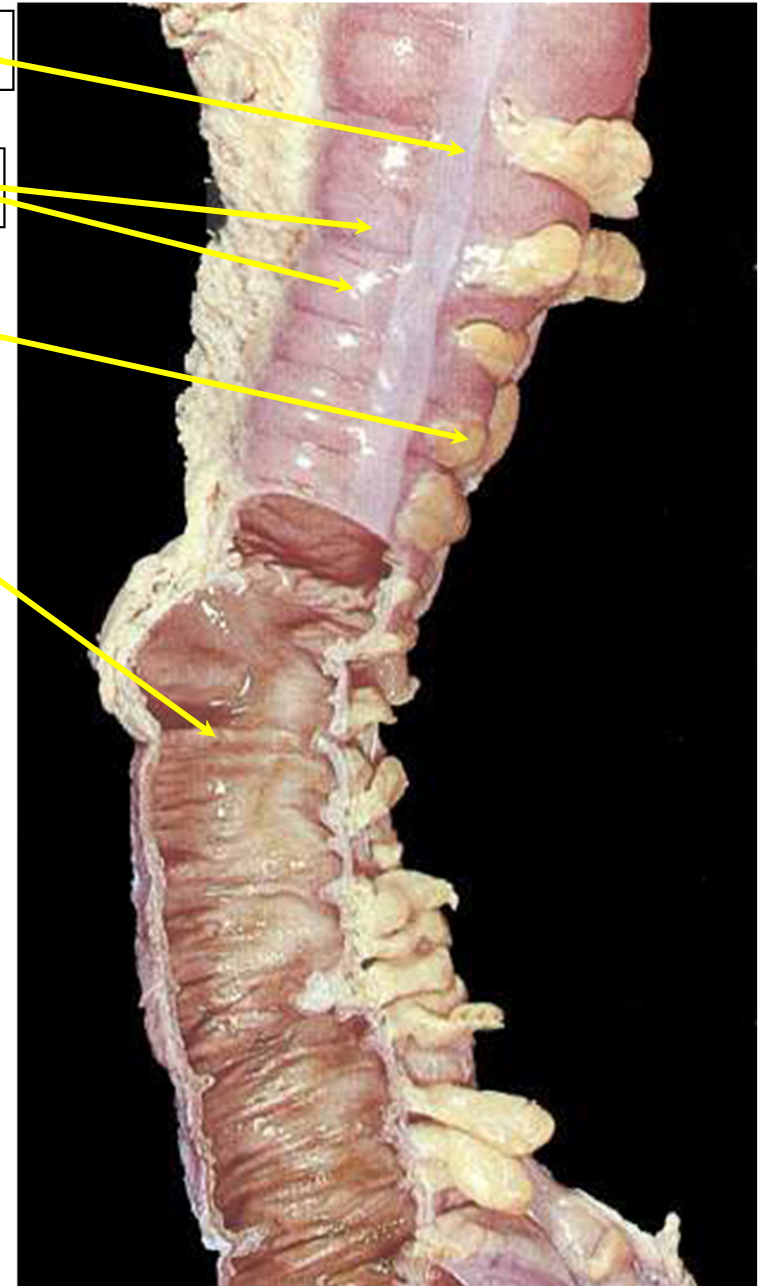


Bandelette longitudinale

Bosselures

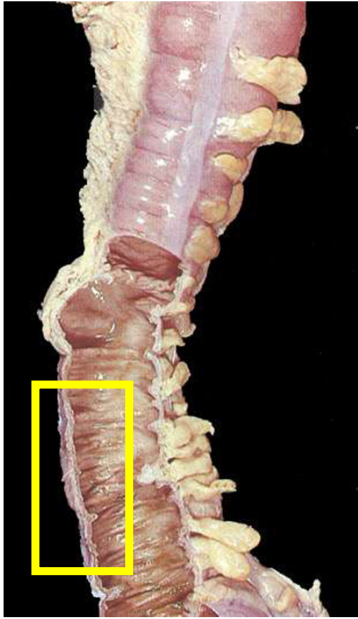
Appendice épiploïque

Valvule colique



Le colon se caractérise macroscopiquement par son **diamètre plus volumineux** que le grêle, la présence de **bandelettes musculaires** longitudinales, entre lesquelles des **bosselures** sont observées. Ces dernières sont séparées par des sillons, qui impriment des plis sur la muqueuse, appelés crêtes ou **valvules coliques**. Sur la partie antérieure s'implante des masses graisseuses, les **appendices épiploïques**

Paroi colique – rappel histologique

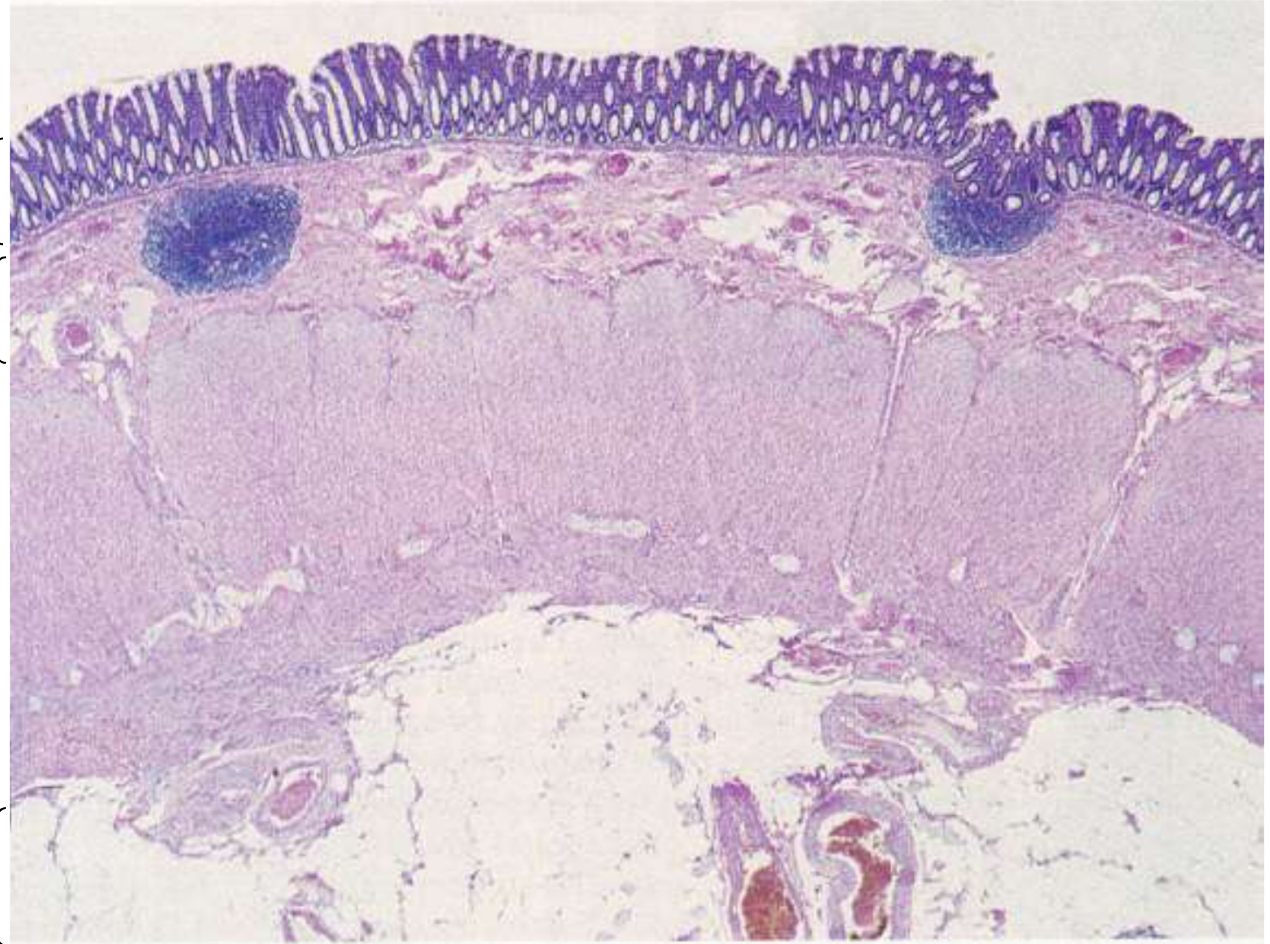


Muqueuse

Sous
muqueuse

Musculeuse

Séreuse





Glandes Lieberkühn

Chorion

Musculaire muqueuse



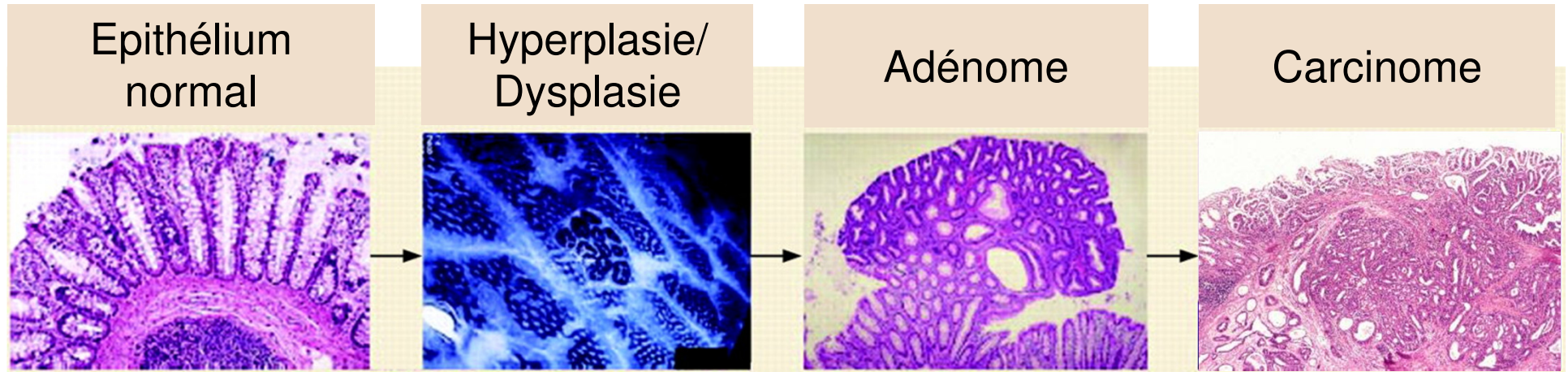


Entérocytes

Cellules
caliciformes



Séquence adénome – carcinome



Tumeur maligne – association de modifications cellulaires et architecturales

Critères cytologiques de malignité

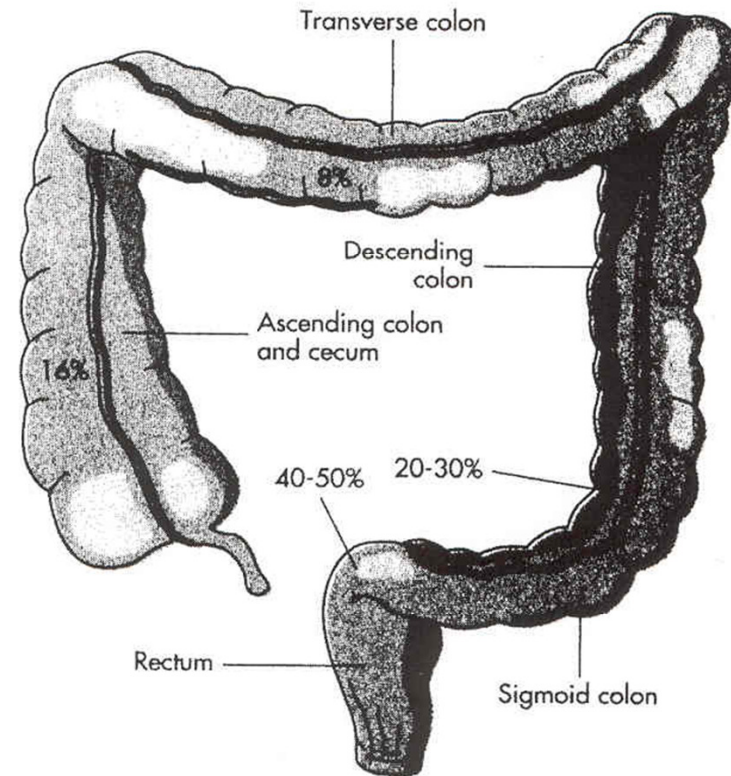
- Cellule ressemble peu ou pas à la cellule normale
- Augmentation du rapport nucléocytoplasmique
- Polymorphisme et atypies des noyaux (hyperchromatiques et de contour irrégulier, anguleux)
- Mitoses nombreuses et anormales

Critères architecturaux de malignité

- Agencement tissulaire partiellement ou totalement désorganisé
- Perte de la maturation et différenciation cellulaire
- Disparition des cellules claires superficielles

Cancer colorectal: épidémiologie

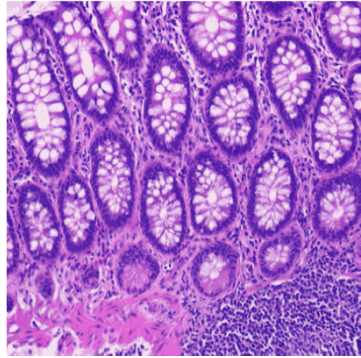
- Se retrouve autant chez l'homme que chez la femme
- 40-50% cancers du rectum
- 20-35% côlon descendant et côlon sigmoïde, 8% côlon transverse et 16% côlon ascendant
- Prévalent après 50 ans
- Avec dépistage précoce 91% de survie / Sans dépistage 63% de survie
- **2^{ème} cause de décès par cancer dans le monde**



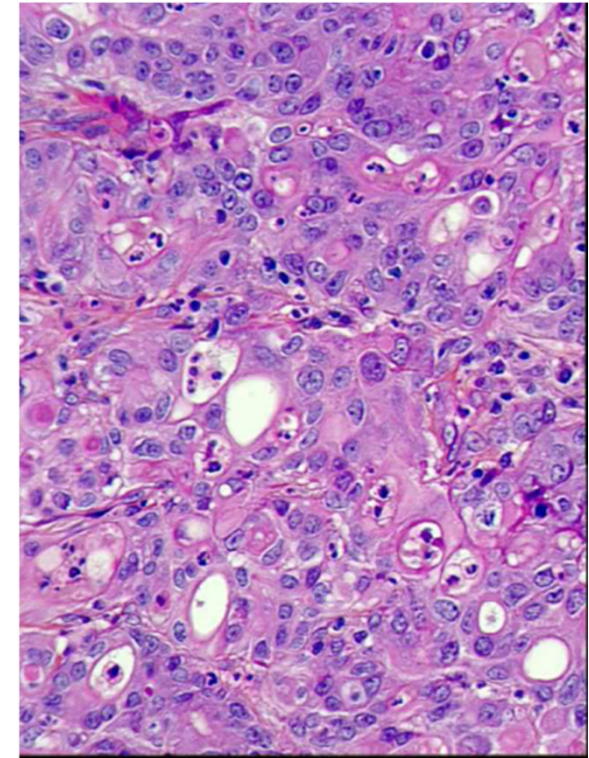
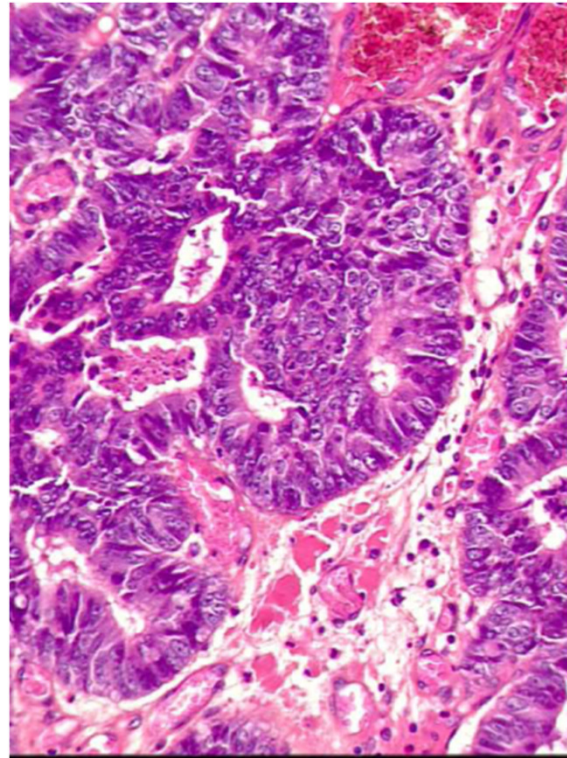
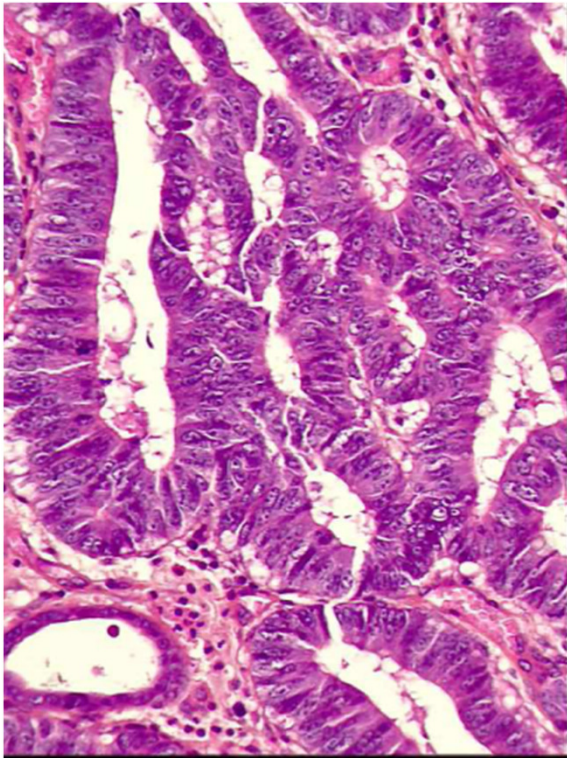
SOUS-TYPES HISTOLOGIQUES

- **Forme commune – adénocarcinome lieberkuhnien (98% de tous les cancer du colon)**
(grade de différenciation)
- **Carcinomes (Classification OMS)**
 - **Adénocarcinome mucineux (10%) (>50% mucus)**
 - **Carcinome à cellules en bague à chaton**
 - **Carcinome adénoquameux**
 - **Carcinome à petites cellules**
 - **Carcinome épidermoïde**
 - **Carcinome médullaire**
 - **Carcinome indifférencié**

Adénocarcinome lieberkuhnien – grade de différenciation

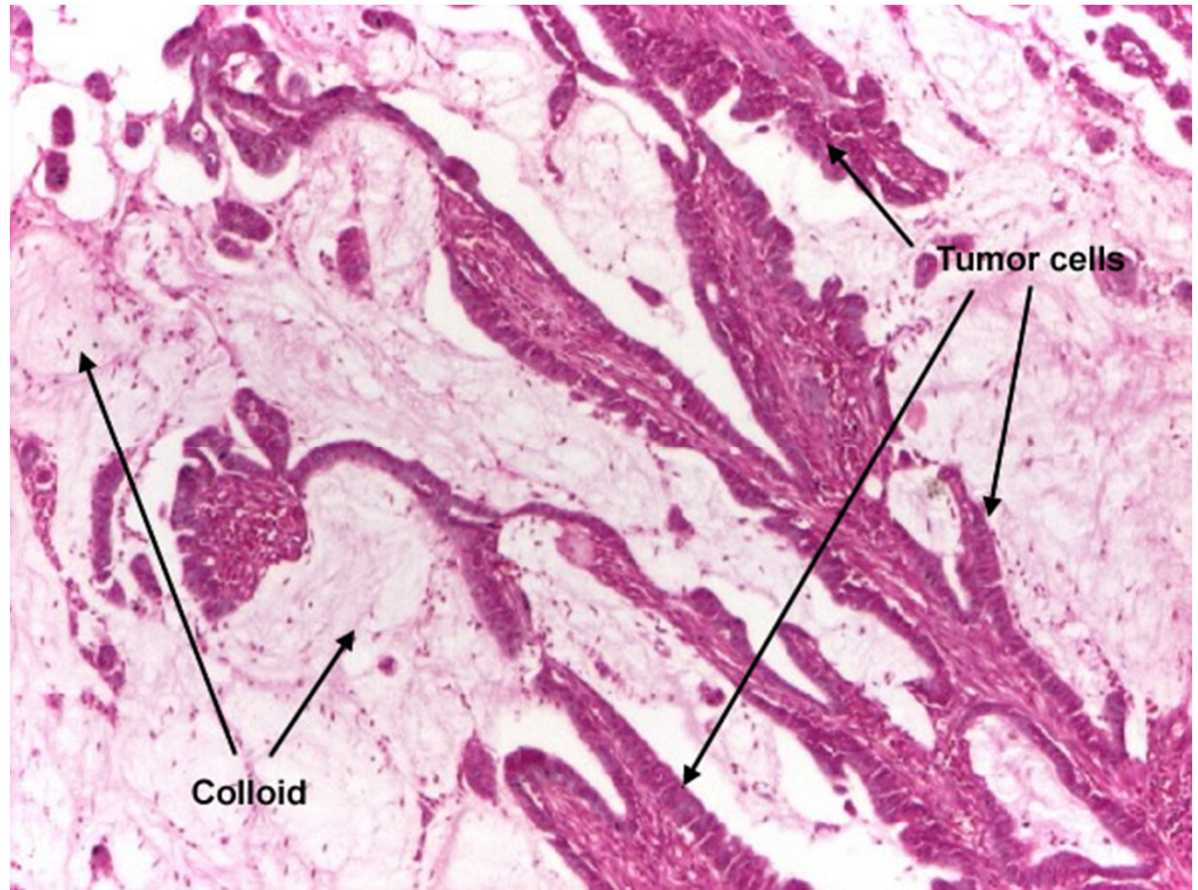


Epithélium normal

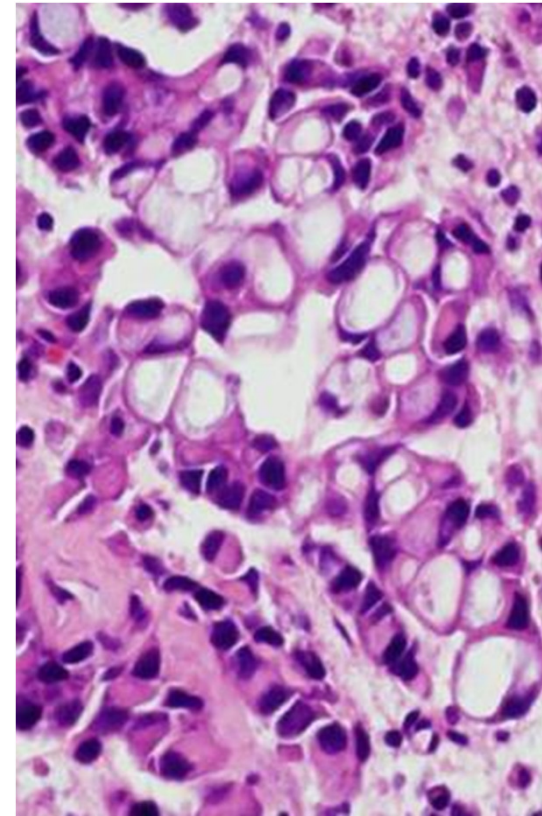
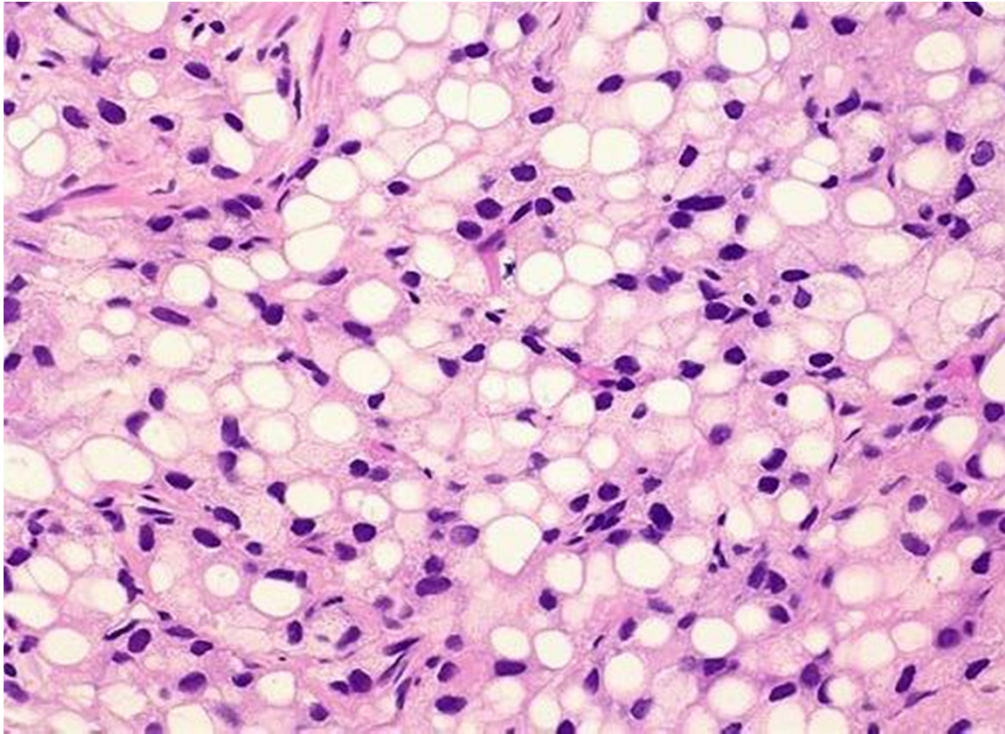


Tumeur bien, moyennement ou peu différenciée

Adénocarcinome mucineux

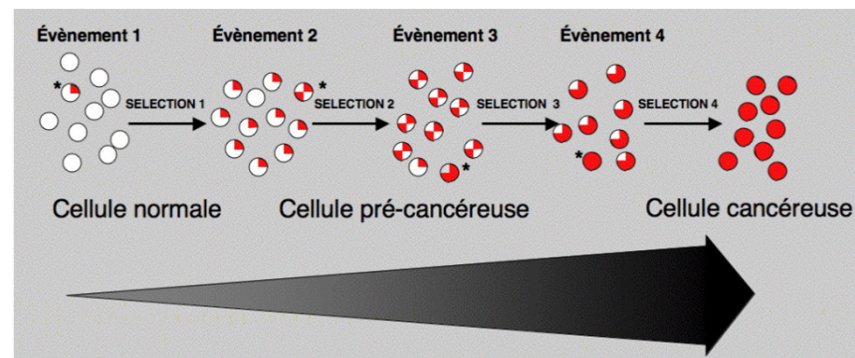


Adénocarcinome à cellules en bague à chaton

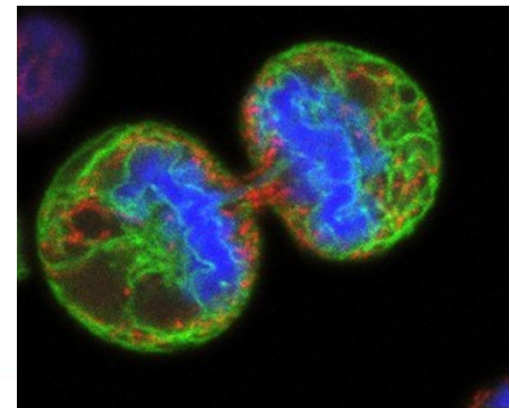


Diagnostic moléculaire

- **Cancer** = tumeur maligne formée à partir d'une cellule initialement normale qui se transforme grâce à une accumulation d'événements moléculaires délétères (instabilité génétique – ex. **mutations** des gènes)



- La **transformation cellulaire** tumorale se traduit par:
 - Perte de contrôle du cycle cellulaire (prolifération tumorale)
 - Insensibilité à l'apoptose
 - Anomalies de la réparation de l'ADN
 - Migration, invasion et métastase



Mutations

Une mutation est une variation du matériel génétique (ADN) par rapport à la séquence de référence

Amino acid No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sequence	ATG	ACT	GAA	TAT	AAA	CTT	GTG	GTA	GTT	GGA	GCT	GGT	GGC	GTA	GGC
												Gly			
				10			20			30				40	

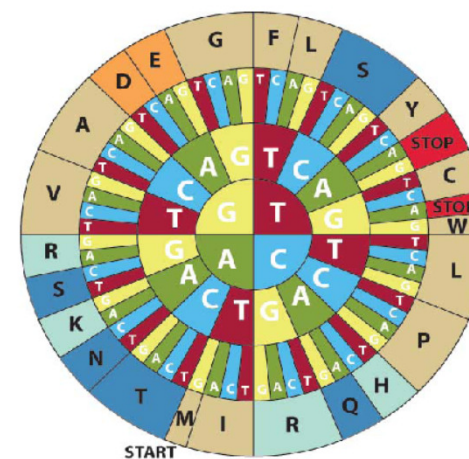
Amino acid No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Sequence	ATG	ACT	GAA	TAT	AAA	CTT	GTG	GTA	GTT	GGA	GCT	GTT	GGC	GTA	GGC
												Val			
				10			20			30				40	

c.34G>T
p.G12V

Codon Wheel Decoding DNA

Use the codon wheel to translate DNA codons into amino acids.

To decode a codon find the first letter of your sequence in the inner circle and work outwards to see the corresponding amino acid. For example: CAT codes for H (Histidine)



Amino acid code

A - Alanine	G - Glycine	M - Methionine	S - Serine
C - Cysteine	H - Histidine	N - Asparagine	T - Threonine
D - Aspartic Acid	I - Isoleucine	P - Proline	V - Valine
E - Glutamic acid	K - Lysine	Q - Glutamine	W - Tryptophan
F - Phenylalanine	L - Leucine	R - Arginine	Y - Tyrosine

Image: C. Brooksbank, European Bioinformatics Institute

- Deux types de mutations:
 - Germinales (affectent les gamètes, transmissibles)
 - Somatiques (ne touchent pas les cellules destinées à la reproduction, elles ne seront donc jamais héréditaires, une cause importante de cancers)

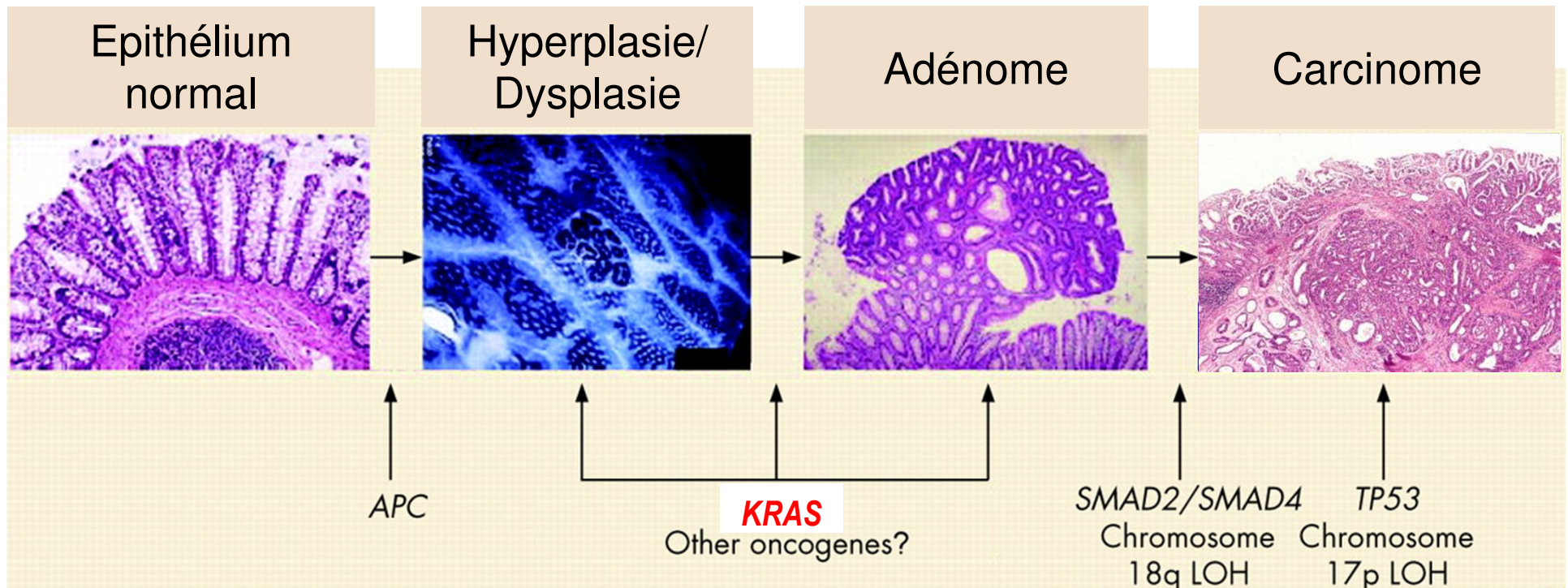
Mutations géniques



- Il y a trois grandes catégories de gènes associés aux pathologies cancéreuses :
- **Oncogènes** = régulateurs positifs de la prolifération cellulaire (**les accélérateurs**). Ils deviennent hyper-actifs indépendamment de tout signal. Les plus connus sont les oncogènes *Kras*, *Egfr*, *myc*
- **Gènes suppresseurs de tumeurs** qui sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire (**les freins**). Ils sont inactivés dans les cellules cancéreuses
- Il existe également les **gènes de réparation** qui sont capables de détecter et de réparer les lésions de l'ADN qui ont modifié les oncogènes ou les gènes suppresseurs de tumeur. Ces systèmes de réparation sont également inactivés dans les cellules cancéreuses

Cancer colorectal

Instabilité génétique



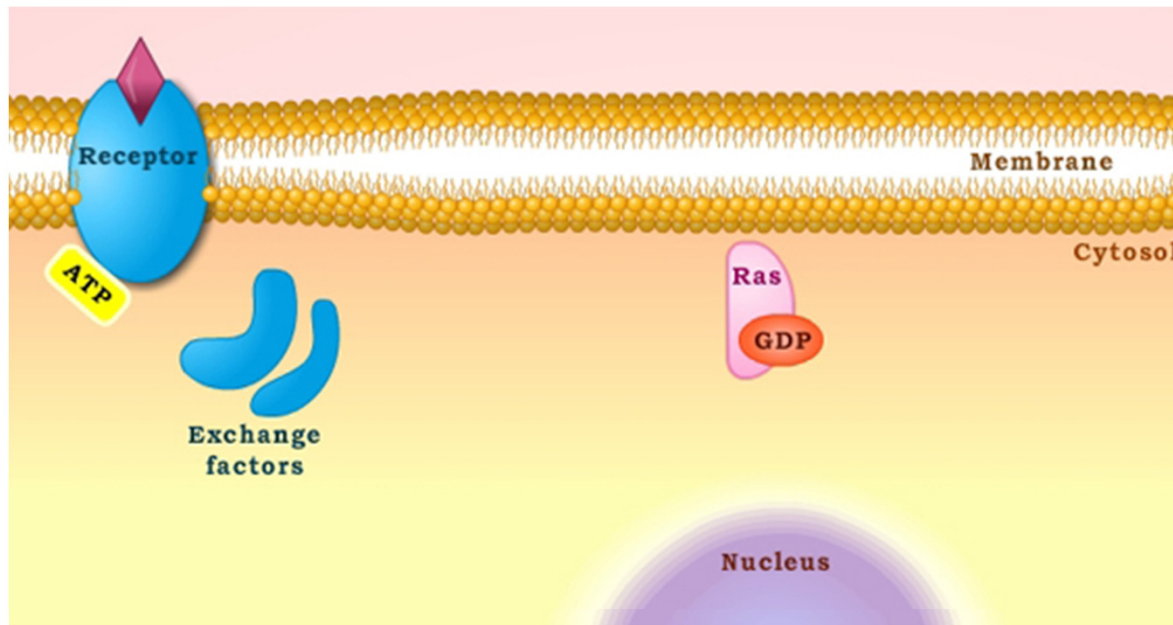
Mutations somatiques de l'oncogène *KRAS*

=

événements moléculaires précoces dans la carcinogénèse du cancer colorectal

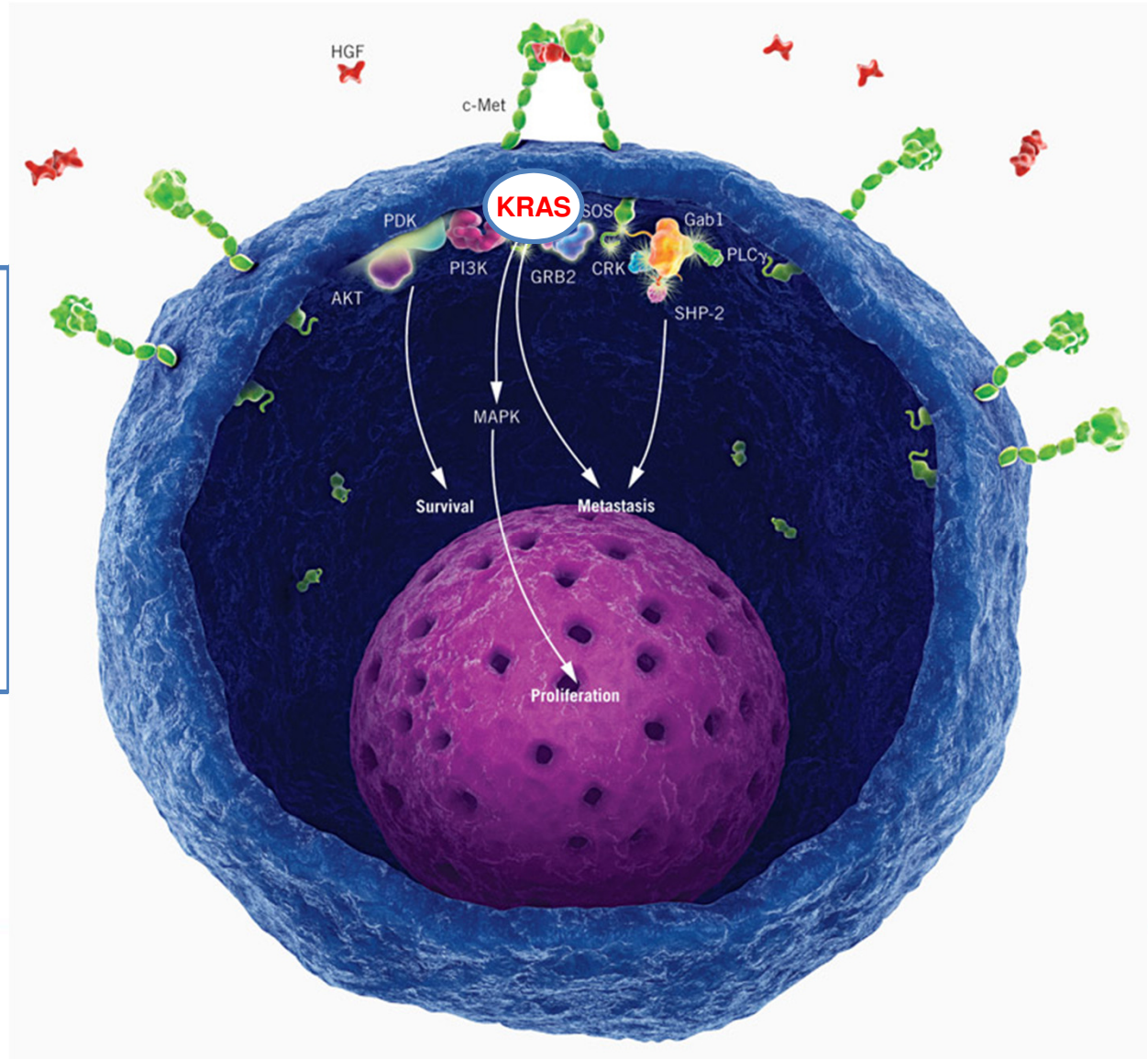
KRAS – interrupteur moléculaire central

- *KRAS* permet la transmission des messages intracellulaires vers le noyau
- Possède un rôle “d’interrupteur moléculaire” au sein des cascades de signalisation, et oscille entre deux états:
 - Inactif – RAS est lié à un GDP
 - Actif – RAS est lié à un GTP. Cette forme est ensuite « mise sous silence » par l’hydrolyse du GTP en GDP par des protéines de régulation (GAP)

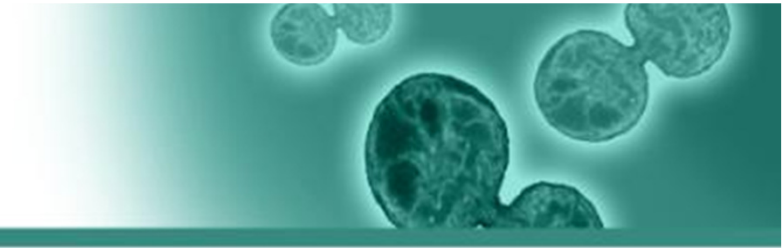


Rôle de KRAS dans le cancer

Rôle central dans les voies de régulation, de la prolifération, de la survie et de la différenciation cellulaire



Les mutations du gène KRAS

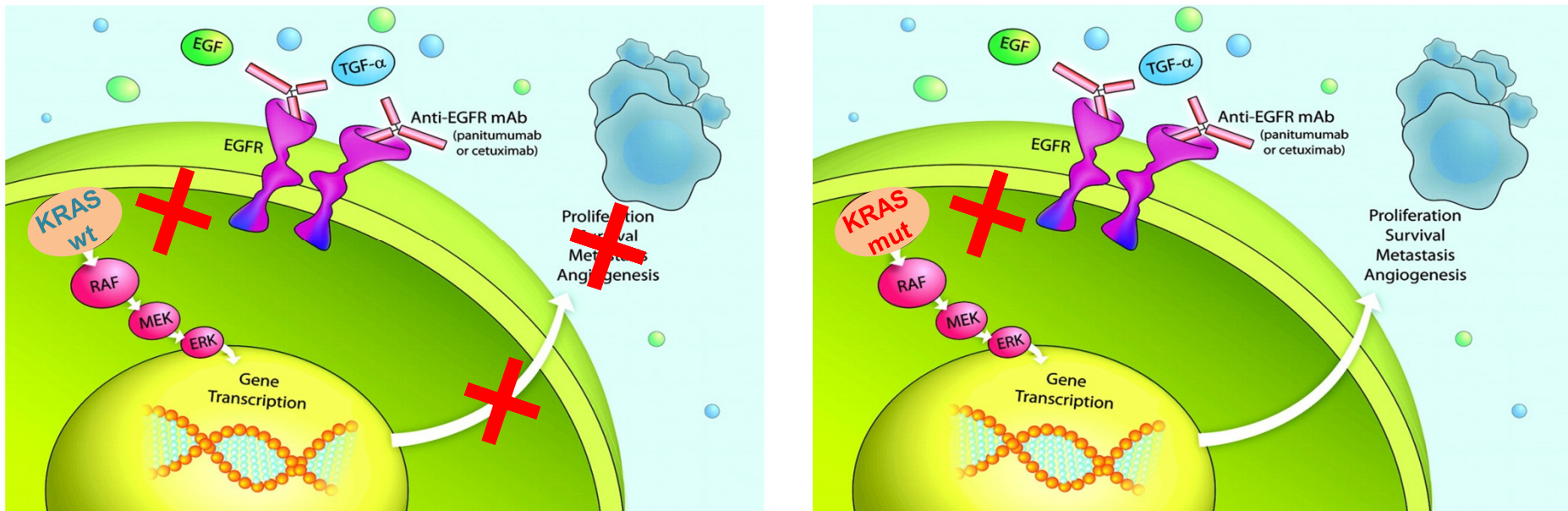


Fréquence des mutations KRAS dans les différents types de cancers	
Colorectal	32% - 57%
Pancréas	72% - 90%
Poumon	15% - 50%
Endomètre	5% - 50%
Vésicule biliaire	14% - 38%
Myélome multiple	16% - 33%

- Il s'agit de mutations ponctuelles, le plus fréquemment (90%) localisés au niveau des **codons 12 et 13**
- Ces mutations ont pour conséquence la production des protéines KRAS **constitutivement actives**
- L'accumulation des formes actives de KRAS provoque une **activation continue** des voies de signalisation en aval de la protéine KRAS

Intérêt clinique des mutations *KRAS* dans le cancer colorectal

- Anticorps anti-EGFR: cetuximab (Erbitux®; Merck Serono) et panitumumab (Vectibix®; Amgen)
- La présence des mutations *KRAS* dans les tumeurs colorectales est prédictive d'une **absence de réponse au traitement par les anti-EGFR**



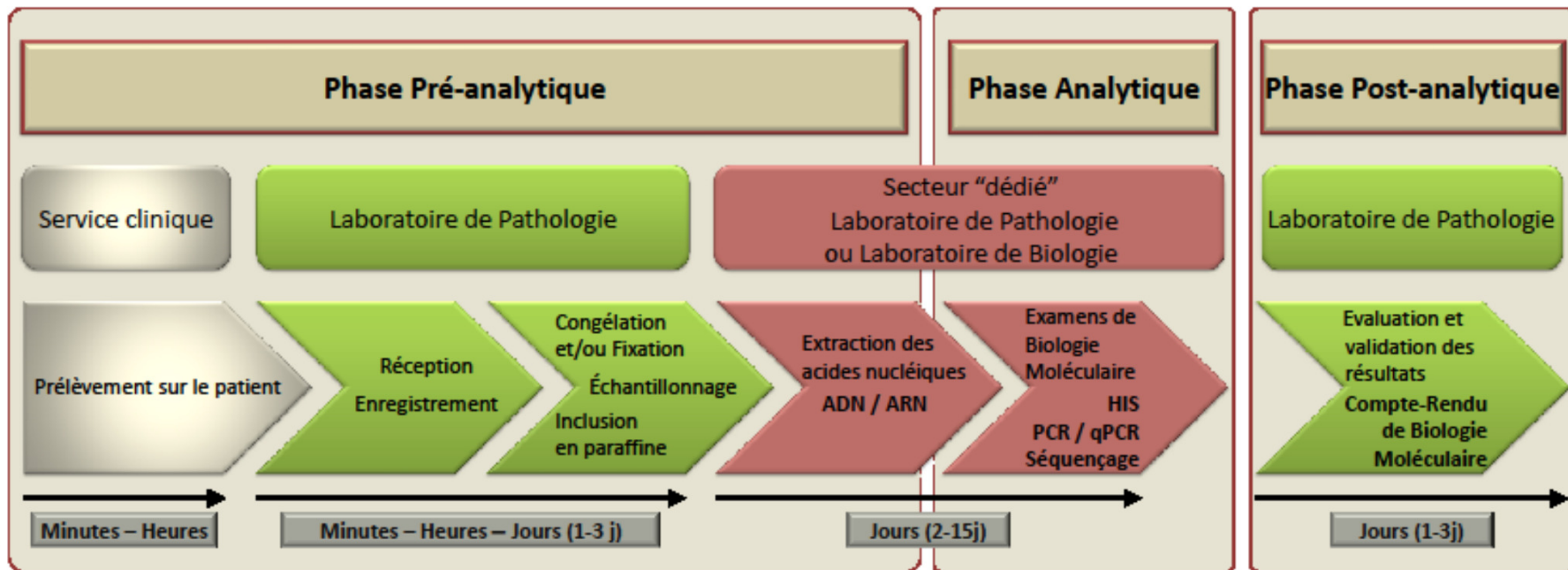
La corrélation entre la présence des mutations *KRAS* et la non-réponse aux **thérapies ciblant EGFR** constitue une opportunité thérapeutique:

- **Augmenter la probabilité de réponse** en identifiant les patients répondeurs (*KRAS* sauvage)
- **Éviter les toxicités d'un traitement inutile** aux patients qui ne répondraient pas aux anticorps anti-EGFR (*KRAS* muté)

➤ **Médecine personnalisée**

Les étapes de l'analyse mutationnelle

- Extraction de l'ADN tumoral
- Amplification de l'ADN tumoral extrait par une technique de PCR (Polymerase chain reaction)
- Détection de la mutation (techniques de biologie moléculaire):
 - Séquençage direct
 - Pyroséquençage
 - Digestion enzymatique (polymorphisme de longueur des fragments de restriction-RFLP)
 - SnapShot, etc...



Conclusions



- ✓ Les mutations activatrices de *KRAS* prédisent la résistance aux anticorps monoclonaux ciblant le REGF
- ✓ Les patients porteurs de tumeurs mutées pour *KRAS* ne bénéficient pas de traitement à base d'anticorps monoclonaux ciblant le REGF
- ✓ La prescription et le remboursement de ces anticorps dans le traitement des carcinomes colorectaux (panitumumab, cetuximab) est soumise à la recherche de ces mutations sur la tumeur primitive ou la métastase
- ✓ Laboratoire de Pathologie Moléculaire → Diagnostic anatomopathologique et moléculaire en routine des cancers colorectaux

Mots-clés



- **Cancer colorectal**
- **Médecine personnalisée**
- **Thérapie ciblée anti-*EGFR***
- **Mutations KRAS**
- **Pyroséquençage**

<http://info.cancerresearchuk.org/cancerandresearch>

www.newscientist.com/topic/cancer

www.nature.com/milestones/milecancer

www.insidecancer.org