

LE STATUT KRAS DANS LES CANCERS COLORECTAUX MÉTASTATIQUES

HAMDOUCHE S^(1,3), KETIT S^(1,4), BENAHSENE K⁽¹⁾, BENSALEM A⁽²⁾,
BEDDAR L^(1,3).

1) Service d'Anatomie et de Cytologie Pathologique, Faculté de
Médecine, Université Constantine 3.

2) Oncologie médicale, Hôpital Didouche Mourad.

3) Laboratoire de Recherche «Génétique et Biologie Moléculaire».

4) Laboratoire de Recherche « Médecine Préventive des Affections
Chroniques ».

E-mail: Hamdouche S: azsouadh@yahoo.fr

Ketit S: ketit19@yahoo.fr

RÉSUMÉ:

Dans les cancers colorectaux métastatiques (CCRm), le gène Kirsten Ratsarcoma Virus (KRAS) est fréquemment muté, rendant les malades inéligibles au traitement anti Récepteur du Facteur de Croissance Epidermique (EGFR) qui permet d'obtenir dans certains cas des survies prolongées. La plupart des mutations se trouvent dans l'exon 2 du gène KRAS, le plus souvent au niveau des codons 12 et 13. L'objectif de notre étude a été de rechercher la mutation du gène KRAS chez tous les malades atteints d'un CCRm afin d'identifier ceux qui peuvent bénéficier du traitement anti-EGFR. L'étude rétrospective transversale descriptive a porté sur 46 cas de CCRm, colligés au service d'anatomie pathologique du CHU de Constantine durant la période janvier 2009-décembre 2013. Il ressort de cette étude que 39,13% des CCRm ont présenté une mutation du gène KRAS. Cette mutation a porté surtout sur les codons 12 et 13 de l'exon 2, représentée par la substitution de la Glycine par la Valine au niveau du codon 12 (G12V), et de la Glycine par l'Aspartate au niveau du codon 13 (G13D) et qu'il n'existe aucune corrélation entre les mutations du gène KRAS et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients, tels que, l'âge, le sexe, la localisation et la différenciation de la tumeur. Le gène KRAS a été muté dans environ 40% des cas, conférant à la tumeur une résistance aux thérapies ciblées.

Mots clés : Cancer colorectal métastatique, Mutation du gène KRAS, Anti EGFR

ABSTRACT: KRAS STATUS IN COLORECTAL METASTATIC CANCER.

In colorectal metastatic cancer (CCRm), the Kirsten Ratsarcoma Virus gene (KRAS) is frequently mutated making patients ineligible to anti epidermal growth factor receptor (EGFR) treatment, which allows to obtain, in some cases, prolonged life survival. Most of the mutations are in exon 2 of the KRAS gene, most often at the level of the codons 12 and 13. The aim of our study was to research for the KRAS gene mutation in all patients with a CCRm in order to identify those who can benefit from anti-EGFR treatment. The descriptive cross-sectional retrospective study covered 46 cases of metastatic colorectal cancer, collected in the ward of pathological anatomy of the CHU of Constantine during the period January 2009-December 2013. It is clear from this study that 39, 13% of CCRm, present a mutation in the KRAS gene. This mutation mainly related to codons 12 and 13 of exon 2 represented by the substitution of glycine by valine at codon 12 level (G12V), and glycine by the aspartate at the codon 13 level (G13D) and that there was no correlation between mutations in the KRAS gene and clinico-pathological characteristics of patients such as age, sex, location and differentiation of tumor. The KRAS gene has been mutated in about 40% of cases, giving the tumor resistance to targeted therapies.

Key words: Metastatic colorectal cancer, KRAS gene mutation, Anti EGFR.

INTRODUCTION

Les avancées récentes dans notre compréhension de la cancérogenèse colorectale ont donné lieu au développement de thérapies « ciblées », en particulier les anticorps anti-EGFR, qui sont désormais utilisés dans le traitement des CCR métastatiques (CCRm). Ces thérapies « ciblées », adaptées à chaque malade et qui se basent sur les caractéristiques génétiques de la tumeur, permettent d'obtenir dans certains cas, des survies prolongées. Cependant, ces nouvelles thérapies ciblées ne sont pas efficaces chez tous les malades, de plus, ils sont coûteux et potentiellement toxiques, ce qui rend nécessaire la détermination de facteurs prédictifs de réponse [1].

Dans les CCR, le gène KRAS est fréquemment muté (35 à 45% des cas) rendant les malades inéligibles au traitement anti EGFR; la plupart des mutations (40%) se trouvent dans l'exon 2 du gène KRAS, le plus souvent au niveau des codons 12 (82%) et 13 (17%) [1,2]. Elles sont retrouvées aussi bien dans la tumeur primitive que dans les métastases avec une excellente corrélation [3].

L'objectif de notre étude a été de rechercher la mutation du gène KRAS sur les codons 12 et 13 de l'exon 2, chez tous les patients qui ont présenté un CCRm diagnostiqué au sein du laboratoire d'anatomie pathologique du CHU de Constantine sur une période de 05 ans (janvier 2009-décembre 2013) et de confronter nos résultats aux diverses études internationales.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

1. Matériel

Nous avons inclus dans notre étude 46 cas de CCRm. Les prélèvements opératoires nous ont été adressés essentiellement par les différents services de chirurgie générale et par le service des urgences chirurgicales.

Pour la recherche de la mutation du gène KRAS, nous avons choisi des blocs de paraffine renfermant 75% de matériel tumoral.

2. Méthodes

Il s'agit d'une étude rétrospective transversale descriptive, qui a porté sur 46 cas de CCRm, colligés au service d'anatomie pathologique du CHU de Constantine, durant la période janvier 2009-décembre 2013.

Les renseignements ont été recueillis pour chaque malade, sur une fiche de renseignements où sont mentionnés : le nom, le prénom, l'âge et le sexe du malade, la date et le type d'intervention chirurgicale, ainsi que le siège de la tumeur.

Les blocs de paraffine ont été adressés au laboratoire BIOMNIS de génétique et de biologie moléculaire, la méthode utilisée par ce laboratoire est celle de la PCR-HRM et séquençage de Sanger en temps réel, qui est une technique innovante sensible spécifique et rapide.

La recherche de la mutation du gène KRAS a été étudiée en fonction de sa fréquence dans les CCRm mais également en fonction du sexe et de l'âge du patient, du codon muté, des séquences nucléotidiques mutés, du siège, du type et de la différenciation tumorale.

Méthode statistique : nos données ont été analysées grâce au logiciel EPI info 7, les valeurs quantitatives ont été exprimées en pourcentage.

RÉSULTATS

1. La fréquence de la mutation du gène KRAS

Sur les 46 cas de CCRm de notre série, 18 patients ont présenté une mutation du gène KRAS soit 39,13%.

2. La fréquence de la mutation en fonction du sexe

La fréquence de mutation est représentée sur le tableau I:

Tableau I. Fréquence des mutations KRAS en fonction du sexe.

Sexe	n	KRAS muté n	%	KRAS sauvage n	%
Homme	27	12	44,44	15	55,55
Femme	19	06	31,57	13	68,42
Total	46	18	39,13	28	60,86

n : Nombre % : Pourcentage.

3. La fréquence de la mutation en fonction de l'âge

L'âge des hommes qui ont présenté une mutation du gène KRAS, varie entre 41 et 78 ans avec un âge moyen de 62,75 ans alors que celui des femmes varie entre 56 et 75 ans avec un âge moyen de 65 ans.

4. La fréquence de la mutation en fonction du codon

La mutation a porté deux fois plus sur le codon 12 (66,66%) que sur le codon 13 (33,33%).

5. La fréquence de la mutation en fonction des séquences nucléotidiques mutées

Les mutations correspondent à la substitution d'un acide aminé de la protéine codée par un autre. Les plus observées dans notre étude sont : au niveau du codon 12, la substitution de la glycine par la valine (G12V) de la glycine par l'aspartate (G12D) et de la glycine par la cystéine (G12C) ; et au niveau du codon 13 la substitution de la glycine par l'aspartate (G13D) (tableau II).

Tableau II. Fréquence des séquences nucléotidiques mutées.

Codon	Type de mutation	Nombre de cas	%
12	G12V	05	27,77
12	G12A	01	05,55
12	G12C	03	16,66
12	G12D	03	16,66
13	G13D	05	27,77
13	G13C	01	05,55
Total		18	100%

% : Pourcentage.

6. La fréquence de la mutation du gène KRAS en fonction du siège

La fréquence de la mutation du gène KRAS a été plus élevée dans le côlon droit que dans le côlon gauche: 60% contre 23,07% (tableau III).

7. La fréquence de la mutation en fonction de la différenciation tumorale

Les 46 cas de CCRm ont tous été des adénocarcinomes, mais à différents degrés de différenciation, ils se répartissent comme suit (tableau IV).

Tableau III. Fréquence des mutations du gène KRAS en fonction du siège.

Siege	n	KRAS muté n %	KRAS sauvage n %
Côlon droit	15	09 60,00	06 40,00
Côlon gauche	13	03 23,07	10 76,92
CRS*	07	02 28,57	05 71,42
Rectum	11	04 36,36	07 63,63
Total	46	18 39,13	28 60,86

n : Nombre; % : Pourcentage; CRS: Charnière rectosigmoïdienne.

Tableau IV. Fréquence des mutations du gène KRAS en fonction de la différenciation tumorale.

Différenciation	n	KRAS muté n %	KRAS sauvage n %
Bien	25	12 48,00	13 52,00
Moyennement	19	06 31,57	13 68,42
Peu	02	00 00,00	02 100
Total	46	18 39,13	28 60,86

n : Nombre; % : Pourcentage.

DISCUSSION

Au terme de ce travail qui a porté sur 46 cas de CCRm, nos résultats ont été confrontés à la fois aux différentes données de la littérature et aux diverses études internationales.

1. La fréquence de la mutation du gène KRAS dans les CCRm

Selon le tableau V, qui affiche les résultats de plusieurs auteurs portant sur la fréquence de la mutation du gène KRAS dans les CCRm, on note que le taux retrouvé dans notre série est supérieur à celui de Marchoudi [4] mais se situe entre celui de l'Al-Allaoui [5] et celui de Zekri [6].

Tableau V. Fréquence de la mutation du gène KRAS selon différentes séries arabes.

	Nombre de patients	Fréquence de la mutation KRAS en %
Marchoudi (Maroc) [4]	92	23,91
Al-Allaoui (Irak) [5]	50	48,00
Zekri (Arabie saoudite) [6]	46	32,00
Notre série	46	39,13

% : Pourcentage.

Une enquête faite par Ciardiello en 2010 [7], dans plusieurs pays (tableau VI), révèle que le taux de mutation du gène KRAS varie entre 17 et 63% en fonction des populations. Le taux retrouvé dans notre étude est assez proche de celui du bassin méditerranéen même si la taille de notre échantillon reste modeste; il apparaît clairement que les variations dans la fréquence des mutations dans les différentes régions du monde sont influencées par le style de vie culturelle et ethnique.

2. La mutation du gène KRAS et codon

Selon le codon muté, on a remarqué que nos résultats concor-

Tableau VI. Fréquence du taux de mutation du gène KRAS selon différents pays [7].

	Test avec résultats	KRAS sauvage n %	KRAS muté n %
France	335	229 68	106 32
Allemagne	278	202 73	76 27
Italie	286	176 62	110 38
Espagne	314	159 51	155 49
Australie	114	73 64	41 36
Belgique	122	82 67	40 33
Portugal	96	63 66	33 34
Suisse	64	43 67	21 33
Amérique latine	632	377 60	255 40
Argentine	130	95 73	35 27
Brésil	263	149 57	114 43
Mexique	128	48 37	80 63
Venezuela	111	85 77	26 23
Asie	259	203 78	56 22
Chine	119	87 73	32 27
Taiwan	140	116 83	24 17
Algérie (notre série)	46	28 61	18 39

n : Nombre; % : Pourcentage.

dent avec ceux des études saoudienne, brésilienne et chinoise [8,9,10] qui retrouvent une nette prédominance de l'atteinte du codon 12 (tableau VII).

Cela indique, que le site de mutation sur les codons n'est influencé ni par le site géographique ni par l'origine ethnique des populations.

Tableau VII. Répartition de la mutation du gène KRAS sur les codons 12 et 13 selon différentes séries.

Séries	Codon 12 %	Codon 13 %
Abubaker (A Saoudite) [8]	81,20	18,80
Zalis (Brésil) [9]	87,00	13,00
Shen (Chine) [10]	68,30	29,30
Notre série	66,66	33,33

%: Pourcentage.

3. La fréquence de la mutation du gène KRAS selon la séquence des acides aminés modifiés

Dans toutes les études qui figurent sur le tableau VIII y compris la nôtre, les mutations les plus fréquentes sont représentées au niveau du codon 12, par la substitution de la Glycine par l'aspartate (p.G12D) et de la glycine par la valine (p.G12V); au niveau du codon 13, par la substitution de la glycine par l'aspartate (p.G13D). D'autres mutations moins fréquentes sont retrouvées, telles la substitution de la Glycine par la sérine (p.G12S) ou l'alanine (p.G12A) au niveau du codon 12 comme cela a été rapporté dans la littérature [13,14].

Tableau VIII. Fréquence et type de mutation du gène KRAS qui affectent les codons 12 et 13 de l'exon 2 selon différentes séries.

Gène et type de mutation	Al-Allawi [5] (Irak) %	Selcukbiricik [13] (Turquie) %	Herreros [14] (Espagne) %	Notre série %
G12D	24,10	14,00	16,67	16,66
G12V	31,00	10,50	13,44	27,77
G12C	10,30	04,10	04,30	16,66
G12A	17,20	02,90	03,23	05,55
G12S	06,90	01,70	01,08	-
G12R	-	01,70	00,54	-
G13D	10,30	09,30	08,60	27,77
G13C	-	-	-	05,55

% : Pourcentage.

4. La fréquence de la mutation en fonction du sexe, de l'âge moyen, du siège et de la différenciation tumorale

Durant ces dernières années, plusieurs études, parmi elles celles de Zekri [6] et de Baskin [15], ont abordé les caractéristiques clinico-pathologiques du CCRm tels que, l'âge, le sexe, la localisation et la différenciation de la tumeur, dans le but de trouver une corrélation entre ces caractéristiques et les mutations du gène KRAS. En comparant les résultats des auteurs (tableau VIX), aucune conclusion significative ne peut être fournie, quant à une quelconque corrélation entre les mutations du gène KRAS et les caractéristiques clinico-pathologiques des patients tels que, l'âge, le sexe, la localisation et la différenciation de la tumeur comme rapportés dans la littérature [8,10,16].

Les différences de fréquence qui existent dans ces études, s'expliquent par les méthodes appliquées de la PCR, la qualité de l'ADN, le nombre réduit de patients examinés et le caractère hétérogène du KRAS dans une même tumeur.

Tableau VIX. Fréquence de la mutation du gène KRAS selon le sexe, l'âge moyen, le siège et la différenciation tumorale.

caractéristiques	Baskin [15] (Turquie)	Zekri [6] (A.Saoudite)	Notre série
Sexe %			
- Homme	26,20%	43%	44,44%
- Femme	38,50%	13%	31,57%
Âge moyen	59,27ans	61ans	63,87ans
Site tumoral %			
- Côlon droit	30,80%	47%	60,00%
- Côlon gauche		00%	23,07%
- CRS*		35%	28,57%
- Rectum	31,20%	13%	36,36%
Différenciation tumorale %			
- Bien différenciée	37,50%	00%	48,00%
- Moyennement	35,50%	100%	31,57%
- Peu	25,50%	00%	00,00%

CRS : charnière rectosigmoïdienne.

CONCLUSION

Dans notre série, 39,13% des CCRm, ont présenté une mutation du gène KRAS, rendant les patients inéligibles aux traitements anti-EGFR. Cette mutation a porté surtout sur les codons 12 et 13 de l'exon 2, représentée par la substitution de la Glycine par la Valine au niveau du codon 12 (G12V), et de la Glycine par l'Aspartate au niveau du codon 13 (G13D).

Depuis 2008, la recherche des mutations du gène KRAS au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2, définies comme facteur prédictif de résistance aux anti-EGFR, est devenue un prérequis indispensable avant la prescription des anti-EGFR.

En 2013, le ciblage thérapeutique des anti-EGFR dans le CCRm a connu une nouvelle avancée significative avec la validation de l'impact prédictif d'autres mutations, situées sur les gènes KRAS (codons 61, 117 et 146) retrouvées chez environ 10 % des patients et NRAS (codons 12, 13, 61, 117 et 146) retrouvées chez environ 6 %, étaient également prédictives de la non-efficacité du traitement. Ces résultats ont débouché sur une modification de l'AMM restreignant l'indication aux CCR dits « RAS super-sauvages », c'est-à-dire sans mutation KRAS ni NRAS sur l'ensemble des codons précités.

À plus long terme, le rôle du pathologiste devrait s'accroître dans le cadre d'un traitement à la carte du CCR, ceci souligne l'importance cruciale que vont prendre les techniques moléculaires dans un avenir proche [17] et la nécessité pour les pathologistes de s'approprier ces techniques dans leur pratique courante.

DATE D'ENVOI DE L'ARTICLE : 11/04/2019.

DATE D'ACCEPTATION : 27/10/2019.

DATE DE PUBLICATION : 15/03/2020.

REFERENCES

1. Tan C, Du X. KRAS mutation testing in metastatic colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2012; 18:5171-80.
2. Laurenty AP., Selves J., Guimbaud R. & Vidéo P.D. Biomarqueurs des cancers colorectaux utiles en pratique clinique. Hépatogastro Oncol. Dig. 2015. 22, 217-227.
3. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, & al. High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. Oncologist. 2008; 13:1270-1275.
4. Marchoudi N, Amrani H, Jouali F, Fekkak J, Rhaissi H. Distribution of KRAS and BRAF mutations in Moroccan patients with advanced colorectal cancer. Pathologie Biologie. 2013; 61: 273-276.
5. Al-Allawi NA, Ismael AT, Ahmed NY, & al. The frequency and spectrum of K-ras mutations among Iraqi patients with sporadic colorectal carcinoma. Indian J Cancer. 2012; 49:163-8.
6. Zekri J, Rizvi A, Al Maghrabi J, & al. K-ras in Colorectal Cancer Tumors From Saudi Patients: Frequency, Clinico-pathological Association and Clinical Outcome. The Open Colorectal Cancer Journal. 2012; 5: 22-27.
7. Ciardiello F, Tejpar S, Normanno N, Mercadante D, Teague T,

Wohlschlegel B, & al. Uptake of KRAS mutation testing in patients with metastatic colorectal cancer in Europe, Latin America and Asia. *Targ Oncol.* 2011; 6: 133-145.

8. Abubaker J, Bavi P, Al Haqawi W, & al. Prognostic significance of alterations in KRAS isoforms KRAS-4A/4B and KRAS mutations in colorectal carcinoma. *J Pathol.* 2009; 219(4): 435-45.

9. Zalis MG, Vieira FM, Zalberg Renault I, & al. KRAS mutation profile in colorectal cancer patients in Brazil: A cohort of 989 individuals. *J Clin Oncol.* 2009; 27(Suppl): e15017.

10. Shen H, Yuan Y, Hu HG, & al. Clinical significance of K-ras and BRAF mutations in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol.* 2011; 17(6): 809-16.

11. Neumann J, & al. Frequency and type of KRAS mutations in routine diagnostic analysis of metastatic colorectal cancer. *Pathol Res Pract.* 2009; 205(12):858-62.

12. Andreyev H J, & al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the «RASCAL II» Study. *Br J Cancer.* 2001; 85(5):692-6.

13. Selcukbiricik F, Erdamar S, Ozkurt CU, & al. The role of K-RAS and B-RAF mutations as biomarkers in metastatic colorectal cancer. *J Buon.* 2013; 18: 116-23.

14. Herreros Villanueva M, Rodrigo M, Claver M, & al. KRAS, BRAF, EGFR and HER2 gene status in a Spanish population of colorectal cancer. *Mol Biol Rep.* 2011; 38: 1315-20.

15. Baskin Y, Calibasi G, Amirfallah A, Dagdeviren Y.K, Canda A.E, Sarioglu S, & al. KRAS and BRAF mutation frequencies in a series of Turkish colorectal cancer patients. *Translational Cancer Research.* 2014; 3 (2): 160-166.

16. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, & al. Clinicopathological and protein characterization of BRAF and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer.* 2010; 15; 127(2): 367-80.

17. Phelip JM, Tougeron D, Léonard D & al. Metastatic colorectal cancer (mCRC): French intergroup clinical practice guidelines for diagnosis, treatments and follow-up. *Dig liver Dis.* 2019 Oct; 51(10):1357-1363.