

MUTATIONS DU GENE KRAS CHEZ LES PATIENTS DU SUD TUNISIEN ATTEINT DE CANCER COLORECTAL: SIGNIFICATION CLINIQUE

R. ABDELMAKSOU-DAMMAK¹, A. SAADALLAH-KALLEL¹, I. MILADI-ABDENNADHER¹, A. KHABIR²,
T. SALLEMI-BOUDAWARA² ET R. MOKDAD-GARGOURI¹

1 : Centre de Biotechnologie de Sfax, laboratoire de Biotechnologie Moléculaire des Eucaryotes, Sfax ;
université de Sfax, BP"K"3038, Sfax –Tunisie.

2 : Service d'Anatomopathologie, CHU Habib Bourguiba, Sfax.

Résumé

Les mutations du gène KRAS se produisent dans environ 50% des cancers colorectaux (CCR) et sont associées à une prolifération anarchique et à un échappement à l'apoptose. Dans cette étude, nous avons recherché des mutations au niveau de l'exon 2 du gène KRAS dans 37 tumeurs de patients atteints de CCR sporadique, originaires du sud tunisien, afin de chercher des corrélations entre l'état muté de KRAS et les paramètres clinicopathologiques de nos patients. En comparaison avec KRAS de type sauvage, les tumeurs avec KRAS muté avaient plus fréquemment une taille de la tumeur > 5 cm ($p = 0,036$), une invasion des ganglions lymphatiques ($p = 0,032$), un stade TNM avancé ($p = 0,009$) et une inflammation du stroma ($p = 0,009$). Nous suggérons que les mutations du gène KRAS sont donc corrélées à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'un cancer colorectal

Mots clés: cancer colorectal, KRAS, mauvais pronostic.

Summary

KRAS mutation occurs in 50% of colorectal cancers (CRC) and has been suggested to be associated with proliferation and decreased apoptosis. In this study, we analyzed the mutational state of KRAS in 37 CRCs and compared the clinicopathological features between KRAS-mutated and wild-type CRCs. KRAS-mutated CRCs had a tumor size > 5 cm ($p=0.036$), lymph node involvement ($p = 0.032$), advanced TNM stage ($p = 0.009$) and stromal inflammation ($p = 0.009$). We concluded that KRAS mutation are correlated with poor prognostic in colorectal cancer patients.

Key words: Colorectal cancer, KRAS, Poor prognostic.

INTRODUCTION

Le cancer colorectal (CCR) représente un problème majeur de santé publique, en particulier dans les pays développés [1]. Les mécanismes génétiques de la séquence adénome-carcinome dans ce cancer ont déjà été bien définis [2]. Bien qu'il ait été suggéré que dans la progression du CCR, l'accumulation de mutations multiples dans un grand nombre d'oncogènes et gènes suppresseurs de tumeur est plus pertinente que la séquence réelle des événements, il a également été rapporté que les mutations qui touchent un gène ou un autre ont des impacts différents sur la progression de la maladie [3]. La croissance et la progression de l'adénome est souvent accompagnée par des altérations dans le gène KRAS, suivie par la perte d'autres gènes suppresseurs de tumeur. Ces événements sont à la base de la transformation maligne dans les adénocarcinomes localement invasifs [3].

Le gène KRAS est un oncogène qui appartient à la famille des gènes ras (H-, Ki et N-ras). Il code pour une protéine avec un poids moléculaire de 21 KDa, située à l'intérieur de la membrane plasmique interne (liaison guanosine triphosphate/guanosine diphosphate) et qui module la prolifération et la différenciation cellulaire [4]. Les mutations oncogéniques de KRAS se produisent au début de la cancérogenèse colorectale et ont été identifiées dans 35-42% des CCRs et 50% des tumeurs de phénotype CIN [5-7]. Près de 97 % de ces mutations sont causées par 7 différentes substitutions de paires de bases de l'ADN dans les codons 12 et 13 de l'exon 2, résultant en une substitution d'acide aminé dans la protéine [8]. Ces mutations peuvent aussi toucher, mais moins fréquemment, le codon 61 [8].

Selon les études, la valeur pronostique des mutations KRAS dans l'évolution du CCR est actuellement incertaine et contradictoire [8-12]. Cependant, il est bien établi que les mutations du gène KRAS ont des conséquences biologiques et fonctionnelles qui pourraient influencer le choix du protocole thérapeutique dans le CCR [13].

En effet, la présence de ces mutations dans la tumeur est responsable de l'activation des protéines RAS et MAPK en aval de l'EGFR, provoquant l'activation constitutive des voies de signalisation dépendantes du récepteur EGFR [14]. Ainsi, la valeur prédictive et pronostique des mutations de KRAS semble importante uniquement chez les patients atteints de cancer colorectal métastatique traités avec un anticorps anti-EGFR [14].

L'objectif de la présente étude était d'étudier le statut mutationnel du gène KRAS, afin de savoir si les mutations sont en corrélation avec le comportement clinique et le pronostic des patients du Sud Tunisiens atteint de cancer colorectal sporadique.

MATERIEL ET METHODES

Caractéristiques des patients :

Un total de 37 adénocarcinomes primaires sporadiques ont été collectés entre Janvier 2003 et Décembre 2007, de patients ayant subi une résection chirurgicale radicale au service de chirurgie digestive du CHU Habib Bourguiba (Sfax, Tunisie). Aucun des patients n'a eu une chimiothérapie préopératoire ou postopératoire. Au moment de la chirurgie, l'âge des patients allait de 35 à 81 ans (moyenne 62,4 an) et le sex-ratio était de 1:1,17. Les sous-types histologiques ont été classés selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé. Les carcinomes ont été organisés selon le stade TNM.

Analyse des mutations :

L'extraction de l'ADN génomique a été réalisée par la méthode phénol/chloroforme [15], à partir de 23 échantillons congelés et 14 échantillons inclus dans la paraffine. La quantité d'ADN a été vérifiée par NanoDrop (Thermo Fisher Scientific) et stocké à -20 ° C pour une utilisation ultérieure.

L'exon 2 du gène KRAS a été amplifié en utilisant les amorces oligonucléotidiques spécifiques F «5'-GCCTGCTGAAAATGACTGAA-3'» et R «5'-AGAATGGTCCTGCACCAGTAA-3'».

Les réactions de PCR contenaient chacune 0,2 uM de chaque amorce, 200 uM de dNTP, 2 mM de MgCl₂, tampon 1XPCR, 1 unité de Taq DNA polymérase (Fermentas) et 100 ng d'ADN dans un volume total de 50 ul. Le programme de PCR était de 5min à 94°C ; 35 cycles de 30 s à 94 ° C, 30 s à 57°C et 30 s à 72 ° C, puis 7 min à 72 ° C. Le produit de PCR de 167 pb de KRAS a été purifié puis séquencé automatiquement dans les deux directions à l'aide du kit de séquençage « BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit » sur « ABI 3130 Genetic Analyser » (Applied Biosystems, CA, USA).

Analyse statistique :

La signification statistique de l'association entre le statut mutationnel de KRAS et les paramètres clinico-pathologiques a été évaluée par le test chi carré. La survie globale a été analysée par la méthode de Kaplan-Meier et les différences dans les courbes de survie ont été comparées par le test du log-rank. L'analyse a été réalisée en utilisant le logiciel SPSS version 20.0.

RESULTATS

Analyse des mutations de KRAS

Dans le présent travail, la recherche de mutations au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a été réalisée sur 37 échantillons tumoraux. 15,38% des échantillons investigués présentaient des mutations (6/37) (Tableau 1).

Le séquençage des produits de PCR a permis de détecter la présence de deux mutations à l'état hétérozygote: au niveau du codon 12: p. G12D (c.35G> A) et le codon 13: p.G13D (c.38G> A) (Figure 1).

Corrélations des mutations de KRAS avec les paramètres clinico-pathologiques

Nous avons trouvé une corrélation significative des mutations du gène KRAS avec différents paramètres clinico-pathologiques : la taille de la tumeur > 5 cm (p = 0,036), l'invasion des ganglions lymphatiques (p = 0,032), le stade TNM avancé (p = 0,009) et le grade élevé d'inflammation du stroma (0,009) (Tableau 2).

Corrélations des mutations de KRAS avec la survie globale des patients

En utilisant la méthode de Kaplan-Meier, nous avons analysé la relation entre la survie des patients et la présence de mutations dans le gène KRAS. Cependant, les données de survie étaient disponibles seulement pour 12 des 35 échantillons testés. Nous n'avons trouvé aucune corrélation entre les tumeurs avec KRAS muté et la survie globale des patients porteurs de ces mutations.

Tableau 1: Mutation identifiées dans KRAS et leurs fréquences dans le CCR

Mutation KRAS	Changement Nucléotidique	N	Fréquence dans CCR [20]
G12D	c.35G>A	3	33.5%
G13D	c.38G>A	3	18.94%

Figure 1: Chromatogrammes montrant les mutations des codons 12 et 13 identifiées dans le gène KRAS.

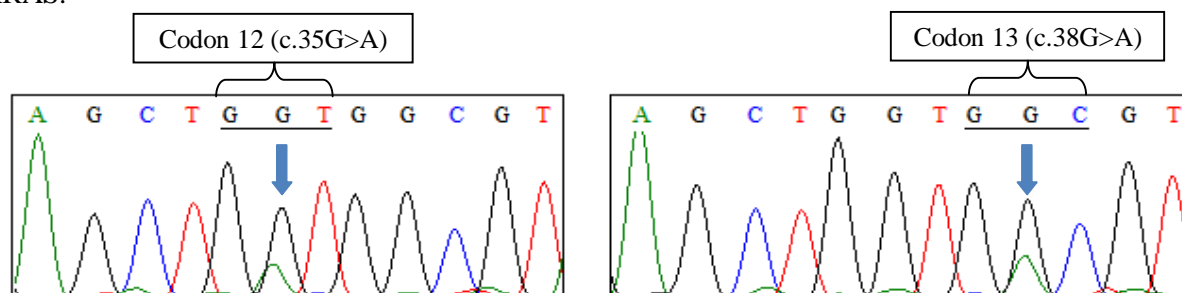


Tableau 2: Associations des mutations de KRAS avec les paramètres clinico-pathologiques des patients.

<i>Paramètres Clinico-pathologiques</i>	<i>Total</i>	<i>Statut Mutationnel</i>		<i>p-valeur</i>
		Mutant	Sauvage	
Patients	37	6	31	
Genre				0.498
Homme	20	4	16	
Femme	17	2	15	
Age (an)				0.959
≤60	12	2	10	
>60	25	4	21	
Taille Tumorale (cm)				0.036
<5	20	1	19	
≥5	16	5	11	
Stade TNM				0.009
I+II	15	1	14	
III	7	3	4	
IV	5	0	5	
Invasion lymphatique				0.032
N0	23	2	21	
N1	10	4	6	
Invasion Vasculaire				0.173
Absent	20	5	15	
Présent	6	0	6	
Inflammation du Stroma				0.009
Importante	5	3	2	
Moyenne	8	0	8	
Faible	5	0	5	
MSI				0.639
MS-Low/MS-Stable	13	3	10	
MSI-High	7	1	6	

Discussion

Les mutations du gène KRAS se produisent au début de la cancérogenèse colorectale et causes une expression dérégulée de plusieurs protéines oncogéniques [3]. La recherche de mutations au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2 du gène KRAS a montré la présence de deux mutations à l'état hétérozygote au niveau du codon 12 (G12D) et codon 13 (G13D). Pour ces mutations, il a déjà été établie que les traitements par l'Erlotinib / Géfitinib, qui sont EGFR-TKI (inhibiteur de la tyrosine kinase), ne sont pas efficaces pour le cancer colorectal métastatique [14]. Cependant, le traitement par des inhibiteurs de l'EGFR ne semble pas avoir la même valeur pronostique dans les cancers colorectaux métastatiques, selon le type de mutation identifié [16]. En effet, chez les patients porteurs de la mutation G13D, une thérapie avec le cetuximab (inhibiteur d'EGFR) combiné avec la chimiothérapie a donné une amélioration de la survie sans rechute et de la survie globale par rapport aux patients présentant d'autres mutations du gène KRAS, alors qu'aucune différence significative n'a été retrouvée pour les patients avec KRAS sauvage [17-19].

Par ailleurs, nous avons observé une association significative entre les mutations KRAS et diverses caractéristiques clinico-pathologiques. En fait, nous avons trouvé une corrélation significative des mutations KRAS avec la taille de la tumeur > 5 cm ($p = 0,036$), l'invasion des ganglions lymphatiques ($p = 0,032$), le stade TNM avancé ($p = 0,009$) et le grade d'inflammation développée du stroma ($0,009$), ce qui est cohérent avec le fait que le gène KRAS muté est un facteur de mauvais pronostic dans CCR. Ces résultats sont en ligne avec plusieurs études. En effet, Barault *et al.* ont montré que les mutations du gène KRAS sont en corrélation avec une faible survie dans une série de patients atteint de cancers du côlon [11]. De même, Conlin *et al.* ont observé que les patients qui présentent une mutation de KRAS ont un pronostic nettement plus grave que ceux sans mutations [12].

En conclusion, notre travail est une ébauche à l'étude de la relation entre les mutations de KRAS et leurs effets sur le mécanisme de la cancérogenèse, chez les patients du sud tunisien atteints de CCR. Cependant, nous devons confirmer nos résultats sur une population plus large.

REFERENCES

1. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin* 1999; 49: 33-64.
2. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
3. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 759-767.
4. Khosravi-far R, Der CJ. The ras signal transduction pathway. *Cancer Metastasis Rev* 1994; 13: 67-89.
5. Bos JL, Fearon ER, Hamilton ER, Verlaan-de Vries M, van Boom JH, van der Eb AJ *et al.* Prevalence of ras mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297.
6. Boughdady IS, Kislinda AR, Haboubi NY, Schofield PF. K-ras gene mutation in adenomas and carcinomas of the colon. *Surg Oncol* 1992; 1: 275-282.
7. Finkelstein SD, Sayeg R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993; 71: 3827-3838.
8. Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M, Yan P, Fiocca R, Klingbiel D *et al.* Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; 28(3): 466-74.
9. González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol* 2004; 27(1): 39-45.
10. Bazan V, Agnese V, Corsale S, Calò V, Valerio MR, Latteri MA *et al.* Specific TP53 and/or Ki-ras mutations as independent predictors of clinical outcome in sporadic colorectal adenocarcinomas: results of a 5-year Gruppo Oncologico dell'Italia Meridionale (GOIM) prospective study. *Ann Oncol* 2005; 16 (4): 50-55.
11. Barault L, Veyrie N, Jooste V, Lecorre D, Chapusot C, Ferraz JM *et al.* Mutations in the RAS-MAPK, PI(3)K (phosphatidylinositol-3-OH kinase) signaling network correlate with poor survival in a population-based series of colon cancers. *Int J Cancer* 2008; 122(10): 2255-9.
12. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolf CR, Steele RJ. The prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal carcinoma. *Gut* 2005; 54(9): 1283-6.
13. Yokota T. Are KRAS/BRAF mutations potent prognostic and/or predictive biomarkers in colorectal cancers? *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 163-71.
14. Rothenberg ML, LaFleur B, Levy DE, Washington MK, Morgan-Meadows SL, Ramanathan RK *et al.* Randomized phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 2005; 23(36): 9265-74.
15. Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning. A laboratory manual*, Cold Spring Harbor, NY; Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001; 6-4.

16. Mao C, Huang YF, Yang ZY, Zheng DY, Chen JZ, Tang JL. KRAS p.G13D mutation and codon 12 mutations are not created equal in predicting clinical outcomes of cetuximab in metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Cancer* 2013; 119(4): 714-21.
17. De Roock W, Jonker DJ, Di Nicolantonio F, Sartore-Bianchi A, Tu D, Siena S et al. Association of KRAS p.G13D mutation with outcome in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *JAMA* 2010; 304(16): 1812-20.
18. Bando H, Yoshino T, Shinozaki E, Shinozaki E, Nishina T, Kadowaki S et al. Clinical outcome of Japanese metastatic colorectal cancer patients harbouring the KRAS p.G13D mutation treated with cetuximab + irinotecan. *Jpn J Clin Oncol.* 2012; 42(12):1146-51.
19. Tejpar S, Bokemeyer C, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Van Cutsem E. Influence of KRAS G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol* 2012; 30(29): 3570-3577.
20. Faulkner NE, Da Silva MM, Heim RA, Horten BC, Rohlfs EM, Rosenblum LS et al. KRAS mutation analyses of more than 16,500 colorectal carcinomas. *Molecular Markers Abstract* 2010; 96.