



Année Universitaire : 2014-2015

Master Sciences et Techniques : Biotechnologie Microbienne
MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

Evaluation de deux gènes : HER2 et KRAS dans le cancer de l'estomac

Présenté par : Jean Paul NSHIZIRUNGU

Encadré par : Pr. Sanae BENNIS
Pr. Sanae GUISSI

Soutenu le 23 Juin 2015 devant le jury composé de :

- Pr. Sanae BENNIS (CHU Hassan II-Fès et FMP-Fès) : Encadrante
- Pr. Sanae GUISSI (FST-Fès) : Encadrante
- Pr. Ihsane MELLOUKI (CHU Hassan II-Fès et FMP-Fès) : Examinatrice
- Pr. Mohamed IRAQUI HOUSSAINI (FST-Fès) : Examinateur
- Pr. Ouldin KARIM (CHU Hassan II-Fès et FMP-Fès) : Examinateur

Lieu de stage : Laboratoire de génétique médicale et oncogénétique
CHU Hassan II- Fès

I) INTRODUCTION GENERALE

Le cancer gastrique est l'un des types les plus courants de tumeurs malignes, près de 930000 nouveaux cas de cancers gastriques (soit 8.4% de l'ensemble des cancers) sont diagnostiqués chaque année [1]. Le pronostic de ce cancer est sombre car il est lié à un diagnostic tardif et à un stade avancé de ce dernier [2] ; il représente la deuxième cause de décès lié au cancer dans le monde. La chirurgie constitue le seul traitement curatif des cancers gastriques, mais malheureusement, elle n'est pas toujours envisageable, et les thérapies actuellement utilisées présentent pas mal d'effets secondaires indésirables, d'où l'intérêt de la médecine personnalisée « traitements ciblés ».

La médecine personnalisée est une des voies les plus prometteuses en cancérologie. Elle consiste à traiter chaque patient de façon individualisée en fonction des spécificités génétiques et biologiques de sa tumeur. Le but de la médecine personnalisée est d'améliorer la performance des soins, d'éviter des traitements inutiles et d'améliorer la qualité de vie des patients. Les techniques actuelles permettent de déterminer de façon de plus en plus précise les caractéristiques de chaque tumeur afin de préciser le diagnostic, d'identifier les anomalies en cause et de les traiter, lorsque cela est possible, avec une thérapie ciblée. Elles permettent également d'obtenir des marqueurs d'efficacité des traitements et de connaître l'évolution probable de la maladie, comme l'apparition de métastases, pour adapter le suivi.

Le récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2 (HER2, connu aussi sous la nomination ErbB-2) est un récepteur transmembranaire de type tyrosine kinase de 185 kDa [3]. L'amplification et la surexpression de HER2 jouent un rôle important dans la prolifération, l'apoptose, l'adhérence, l'angiogenèse et l'agressivité de nombreuses tumeurs solides y compris le cancer gastrique [4]. Une surexpression et/ou une amplification de HER2 a été détectée dans 7- 34 % des adénocarcinomes gastriques [5,6]. De nombreuses études ont montré que les cancers gastriques surexprimant le marqueur HER2 étaient de plus mauvais pronostic [5,7], un statut HER2 positif est aussi un facteur prédictif de la réponse à l'herceptine (anticorps monoclonal humanisé dirigé contre le domaine extracellulaire de la protéine HER2, et utilisé comme traitement standard dans le traitement adjuvant).

Le gène KRAS situé sur le bras court du chromosome 12 (12p11.22) est un oncogène qui code pour une protéine de 21KD localisée sur la face interne de la membrane plasmique et possède une activité de GTPase. Cette protéine est une composante essentielle de la cascade de transduction du signal en aval du récepteur membranaire EGFR. KRAS est l'un des premiers oncogènes découverts. Des mutations de ce gène ont été détectées dans un grand nombre de cancers humains dont notamment celui de l'estomac. KRAS acquiert des mutations activatrices dans environ 6% des cancers de l'estomac. De nombreuses études ont montré que la présence d'une mutation du gène KRAS était associée à une absence de bénéfice clinique aux traitements anti-EGFR [8,9].

L'objectif de notre travail consiste à déterminer le statut des gènes HER2 et KRAS comme facteurs prédictifs permettant d'améliorer le pronostic des patients atteints du cancer de l'estomac de type adénocarcinome.

II) ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

II.1) GENERALITES SUR L'ORIGINE ET LE DEVELOPPEMENT DES CANCERS

II.1.1) DEFINITION D'UN CANCER:

Un cancer est une maladie caractérisée par une prolifération cellulaire anormalement importante au sein d'un tissu normal de l'organisme. Ces cellules dérivent toutes d'un même clone ou cellule initiatrice qui a acquis certaines caractéristiques lui permettant de se diviser indéfiniment. Au cours de l'évolution de la maladie, certaines cellules peuvent migrer de leur lieu de production et former des métastases [10,11,12]. L'apparition d'une cellule cancéreuse est liée à l'accumulation des anomalies dans son ADN, son comportement anormal est dû au dérèglement de certains de ses gènes. La cancérogénèse comprend trois étapes : l'initiation, la promotion et la progression. L'initiation se caractérise par des altérations génomiques (mutations, perte de gène, réarrangements chromosomiques...). Cette étape reste sous contrôle tant que les mécanismes de régulation de l'homéostasie cellulaire fonctionnent. La promotion est l'étape caractérisée par la survie et l'expansion clonale des cellules « initiées ». Cette prolifération cellulaire intervient lorsque les cellules sont plus sensibles aux signaux stimulateurs de la croissance. Au cours de la progression, la taille de la tumeur augmente substantiellement. Devenue autonome, la cellule cancéreuse peut aussi envahir d'autres tissus et former des métastases [11,12].

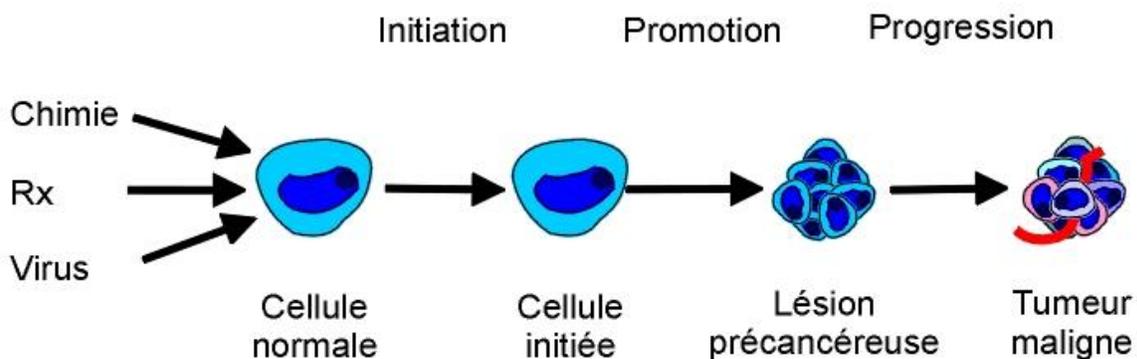


Fig 1: Représentation schématique des différentes étapes de la cancérogénèse

Cette transformation de la cellule normale en cellule cancéreuse est un processus long, qui peut durer des dizaines d'années. Au terme de cette transformation, la cellule cancéreuse a acquis un certain nombre de caractéristiques : son indépendance vis-à-vis des signaux qui régulent (favorisent ou freinent) habituellement sa croissance et sa division, sa capacité à échapper au processus de la mort cellulaire programmée et sa capacité à se diviser indéfiniment.

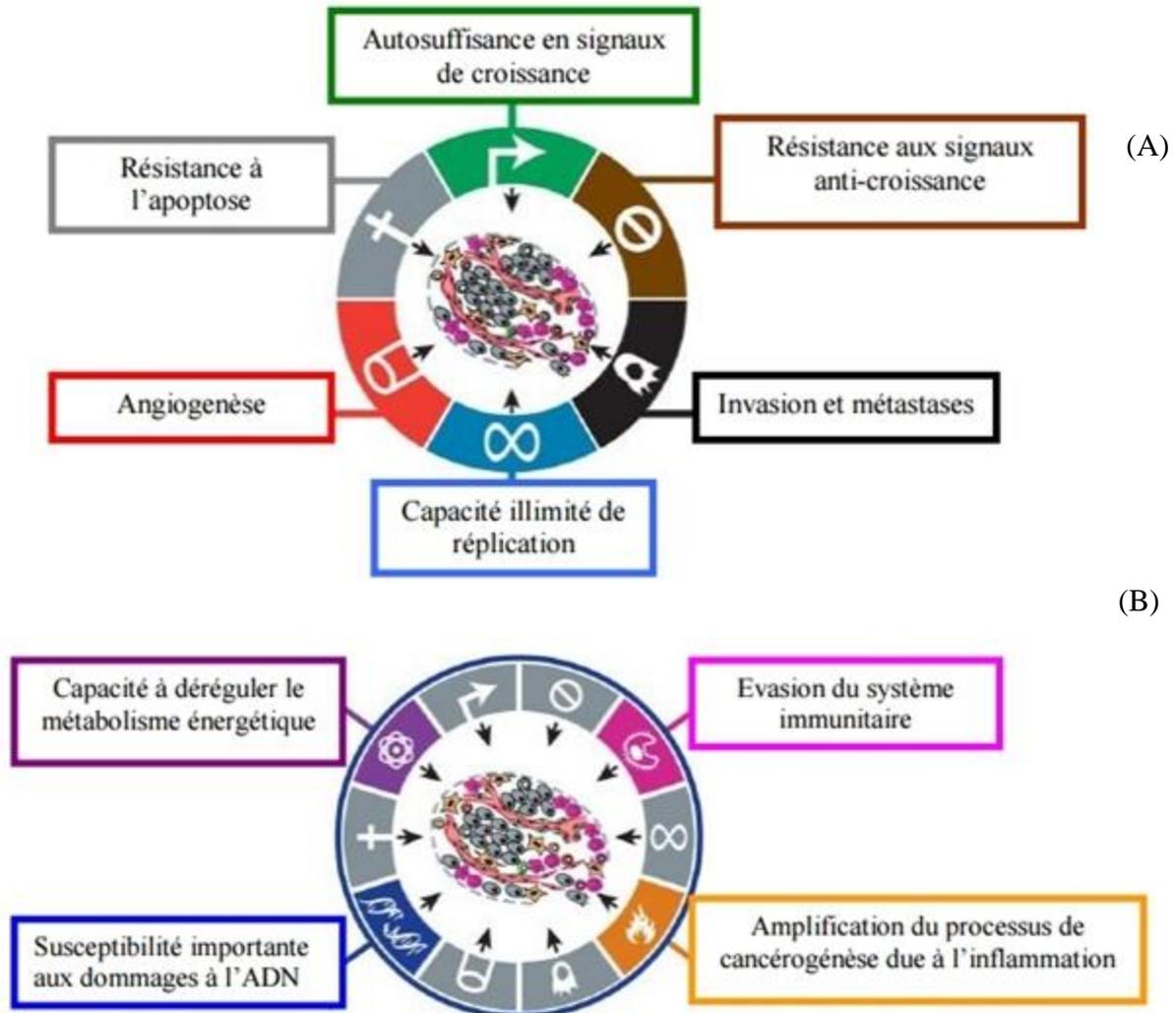


Fig 2: Les caractéristiques des cellules cancéreuses [13]

(A) Propriétés initiales de la cellule cancéreuse.

(B) Caractéristiques nouvelles de la cellule cancéreuse.

II.1.2) BASES MOLECULAIRES DES CANCERS

Les cancers sont des proliférations clonales pathologiques causées par de multiples événements moléculaires (altérations génétiques et épigénétiques) d'une cellule de l'organisme. Le processus de transformation d'une cellule normale en une cellule tumorale consiste en une accumulation successive et séquentielle de mutations et permet de définir des cancers comme étant des maladies génétiques. Il est ainsi possible de dénombrer au sein d'une cellule tumorale parfois plus d'une centaine de mutations [14].

Proto-oncogènes, gènes suppresseurs de tumeur et gènes de réparation

A ce jour, plus de 350 gènes impliqués dans le développement des cancers ont été identifiés [15] et ces gènes peuvent être schématiquement classés en trois grandes catégories : les proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation. La catégorie des proto-oncogènes a été la première à être identifiée. Il s'agit de gènes impliqués dans la transduction des différents signaux reçus par la cellule et qui ont pour rôle de réguler positivement la prolifération et le cycle cellulaire. Leur altération dans les cellules tumorales active les proto-oncogènes en oncogènes, les rendant hyperactifs, favorisant ainsi la croissance cellulaire et diminuant la mort cellulaire programmée.

Les proto-oncogènes sont répartis en 6 grandes classes en fonction des oncoprotéines pour lesquels ils codent :

- Les facteurs de croissance (assurent une boucle de régulation autocrine).
Exemples : proto-oncogènes codant pour les protéines de la famille FGF (Fibroblast Growth Factor).
- Les récepteurs transmembranaires de facteurs de croissance.
Exemple : le proto-oncogène erbB code pour le récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor).
- Les protéines G ou protéines membranaires liant le GTP.
Exemple : proto-oncogènes de la famille Ras.
- Les protéines tyrosines kinases membranaires.

- Les protéines kinases cytosoliques.
- Les protéines à activité nucléaire : contrôlent la transcription de gènes cibles en interagissant avec l'ADN.
Exemple : proto-oncogène *erbA* codant pour le récepteur aux hormones thyroïdiennes, les proto-oncogènes *fos*, *jun* et *c-myc*

En général, on considère qu'il existe trois grands types de modifications génétiques qui peuvent altérer un proto-oncogène: les mutations, les translocations et les amplifications géniques. Dans tous les cas, on obtient un produit hyperactif qui stimule la division cellulaire de sorte qu'elle échappe à la régulation normale.

- Les mutations sont des évènements ponctuels qui peuvent changer l'une des bases de l'ADN du gène. Cette modification change l'information génétique et la protéine synthétisée à partir de ce gène est modifiée. Un des proto-oncogènes mutés dans les cancers humains est le gène *H-ras*. Sous sa forme normale (non mutée), la protéine *H-ras* stimule la multiplication cellulaire uniquement lorsqu'elle reçoit un signal de prolifération. Sous sa forme mutée, le gène *H-ras* code une protéine qui stimule la multiplication cellulaire indépendamment de tout signal.
- Les amplifications géniques correspondent à l'augmentation du nombre de copies d'un proto-oncogène. Dans les cellules de neuroblastomes, on retrouve plusieurs centaines de copies du gène *N-myc* alors qu'il devrait n'y avoir que deux copies. Cette amplification aboutit à une surproduction de la protéine *myc* qui active continuellement la division cellulaire. De même l'amplification du gène *HER2* est fréquente dans les cancers du sein, et de l'estomac.
- Les translocations chromosomiques sont des modifications de notre génome qui correspondent à des remaniements importants de nos chromosomes. En général, dans les translocations réciproques, un fragment de l'un de nos chromosomes est transféré sur un autre chromosome et vice-versa. Cet évènement peut générer deux types de modifications.

Des modifications quantitatives car la translocation change complètement l'environnement génétique des gènes présents sur les fragments de chromosome et dérègle leur expression. Il peut y avoir aussi des modifications qualitatives car la translocation peut engendrer la synthèse de protéines ayant des fonctions aberrantes.

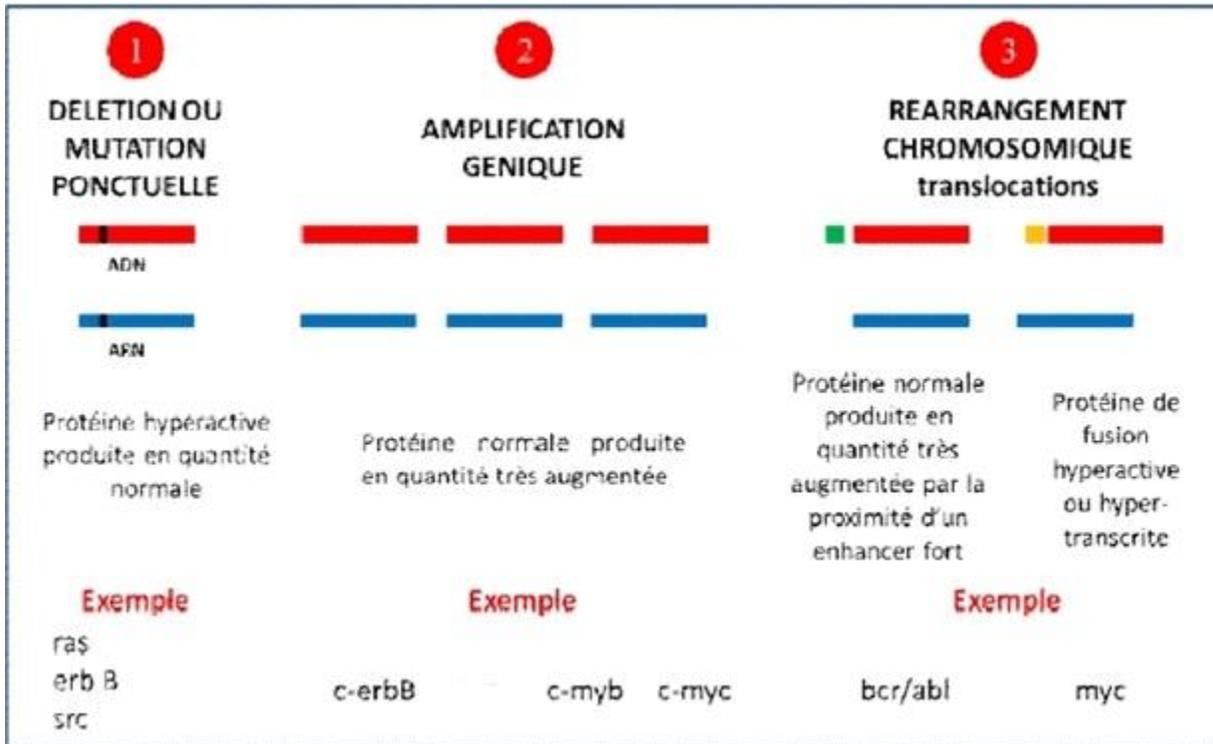


Fig 3: mécanismes d'activation des proto-oncogènes en oncogènes

La seconde catégorie correspond aux gènes suppresseurs de tumeurs qui possèdent des propriétés inverses aux proto-oncogènes puisqu'ils sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire et qu'ils favorisent l'apoptose.

La troisième catégorie correspond aux gènes impliqués dans la réparation de l'ADN. Ces gènes ont pour rôle de maintenir l'intégrité de l'ADN et de réparer les anomalies génétiques susceptibles d'activer les proto-oncogènes et d'inactiver les gènes suppresseurs de tumeurs. A l'inverse des proto-oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation sont inactivés dans les cellules tumorales [16,17]. Cette perte de fonction peut également faire intervenir différents mécanismes.

Il peut s'agir de délétions d'une région du chromosome contenant le gène suppresseur de tumeur, de mutations ponctuelles qui altèrent sa fonction, d'une interaction avec un oncogène viral ou encore d'altérations épigénétiques qui vont diminuer l'expression du gène (hyperméthylation du promoteur du gène *MLH1* dans les cancers du colon).

II.2) RAPPELS ANATOMIQUES DE L'ESTOMAC HUMAIN

L'estomac est la portion du tube digestif en forme de poche, située entre l'œsophage et le duodénum, il permet d'assurer la digestion par ses fonctions mécaniques (brassage) et chimiques en mélangeant les aliments aux sucs gastriques (eau, acide chlorhydrique, enzymes). Le produit de la transformation par l'estomac est une pâte, appelée chyme qui se déverse dans le duodénum par le pylore. C'est dans le duodénum que le chyme acide va être neutralisé par les bases produites de la bile et du suc pancréatique. Cette neutralisation produit des sels minéraux assimilables, dont certains passent dans l'organisme directement à travers la paroi du duodénum grâce à des hormones produites par les glandes surrénales, les minéralocorticoïdes. La durée de la digestion dans l'estomac varie environ entre 3 et 7 heures. Il se caractérise de face par une forme en « J » et présente une ouverture en haut, le cardia, qui permet la jonction avec l'œsophage. Il comprend le sphincter œsophagien inférieur et le pylore à sa sortie vers le duodénum en bas. On distingue deux courbures :

- La petite courbure (à droite) vascularisée par les artères et veines gastriques gauche et droite ;
- La grande courbure (à gauche) vascularisée par les artères et veines gastro-épiplœiques gauche et droite.

L'estomac est composé de trois parties, dont les muqueuses sécrètent toutes du mucus protecteur contre une auto-digestion, de haut en bas :

- Le fundus : hydratation du bol alimentaire ;
- Le corps: il comporte les cellules pariétales (cellules bordantes) qui synthétisent l'acide chlorhydrique (HCl), les cellules à mucus pour la protection de la paroi stomacale et les cellules principales qui sécrètent le pepsinogène (précurseur de la pepsine). Les cellules du corps sont sensibles à la gastrine (augmente les sécrétions) ;

- L'antre: paroi à prédominance motrice pour permettre un bon brassage des aliments, produit la gastrine.

L'estomac possède une paroi faite de quatre tuniques, représentées de l'intérieur vers l'extérieur par :

- La muqueuse : de 0,3-1mm d'épaisseur, elle est constituée d'un épithélium de surface cylindrique muco- sécrétant qui s'invagine en cryptes et de glandes spécialisées : cardiales; fundiques et antrales.
- La sous muqueuse : Elle est constituée d'un tissu conjonctif assez dense, riche en plasmocytes, en mastocytes, en lymphocytes isolés et en polynucléaires éosinophiles. Sa laxité permet la mobilisation de la muqueuse, mais constitue aussi une voie d'extension pour le processus d'envahissement cancéreux.
- La musculuse : L'estomac est le seul segment du tube digestif dont la musculuse est faite de trois couches de muscles lisses : une interne oblique, une moyenne circulaire et une externe longitudinale.
- La séreuse: C'est une tunique externe formée par l'épithélium de revêtement simple pavimenteux péritonéal. Il est séparé de la couche musculaire par du tissu conjonctif et un peu de tissu graisseux.

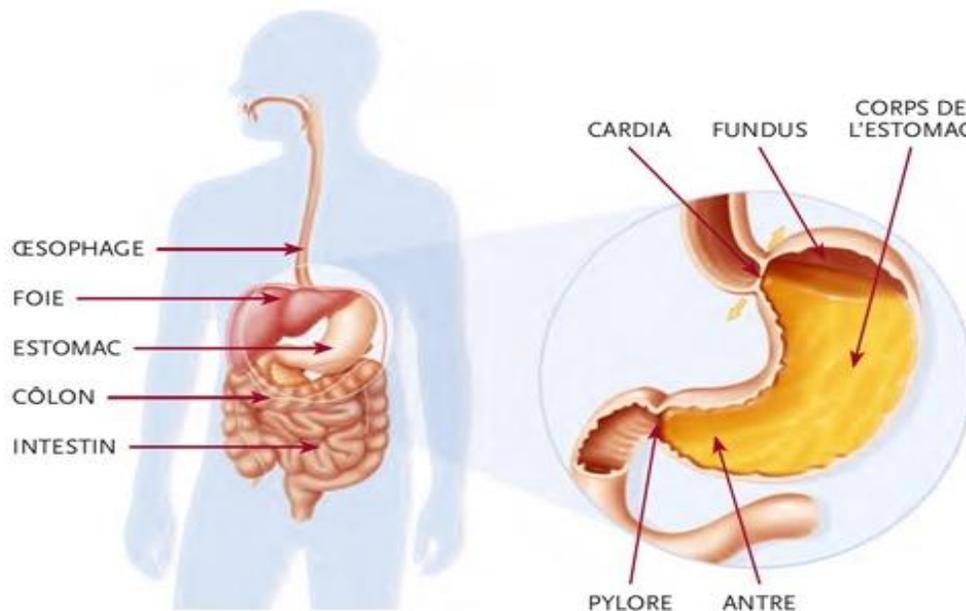


Fig 4: Anatomie de l'estomac humain

II.3) CANCER DE L'ESTOMAC

Le cancer de l'estomac est une forme de cancer se développant aux dépens des tissus de l'estomac. Il se développe à partir d'altérations cellulaires de la muqueuse gastrique et peut se développer à la surface de la muqueuse épithéliale ou en profondeur dans la paroi gastrique et la perforer.

II.3.1) EPIDEMIOLOGIE

L'incidence du cancer gastrique est en diminution depuis 50 ans dans les pays occidentaux. Cependant, bien que son incidence annuelle ait notablement décru, il demeure l'une des dix premières causes mondiales de mortalité liée au cancer, il représente la deuxième cause de mortalité par cancer dans le monde [18,19]. Cette diminution d'incidence globale du cancer gastrique reflète une nette diminution des cancers gastriques distaux. Par contre, nous assistons parallèlement à une nette augmentation des cancers proximaux du cardia [24], probablement en raison de l'augmentation de la prévalence de l'obésité favorisant les reflux gastro-œsophagiens. Il y a une grande disparité de prévalence géographique du cancer gastrique avec une nette prédominance dans l'Est Asiatique (surtout le Japon et la Chine), l'Amérique du Sud et l'Europe de l'Est et du Sud. L'Afrique est une région à faible risque du cancer gastrique [23]. On note aussi une disparité d'incidence par rapport au genre; le cancer de l'estomac touche plus fréquemment les hommes (ratio 2/1) [21]. Selon une étude réalisée en 2012 par Chbani L. et al., le cancer de l'estomac représente le deuxième cancer du tube digestif le plus fréquent dans la région de Fès-Boulemane (Maroc) [22]. Le cancer gastrique survient rarement avant l'âge de 40 ans, l'incidence augmente rapidement au-delà avec un pic pendant la septième décennie [23]. Plusieurs études épidémiologiques ont été menées afin d'identifier les différents facteurs de risque du cancer gastrique, montrant que c'est un cancer multifactoriel, et démontrant le rôle important de l'infection par *Helicobacter pylori* [23].

II.3.2) FACTEURS DE RISQUE

Des facteurs environnementaux, génétiques, et un certain nombre d'affections ont été incriminés dans le développement des cancers gastriques.

II.3.2.1) Facteurs environnementaux :

La responsabilité de facteurs environnementaux est suggérée par l'incidence variable du cancer gastrique à l'intérieur d'un même pays, et par des études chez les migrants révélant que dès la deuxième génération, le risque de cancer gastrique se rapproche de celui de la population d'accueil [14]. Parmi les facteurs environnementaux, les facteurs alimentaires jouent un rôle important dans la carcinogenèse gastrique. Une diète riche en sel provoque une gastrite atrophique et favorise la carcinogenèse gastrique [25,26]. Les nitrites ont été également incriminés. Ils proviennent essentiellement de l'alimentation, soit des procédés de fabrication (salaisons, fumaisons, conserves), soit en raison de la conversion de nitrate en nitrite par les bactéries (cette dernière réaction ne se produit pas à moins de 2°C) [20]. La diminution de la quantité de nitrites alimentaires dans les procédures de stockage des aliments peut expliquer la diminution de l'incidence du cancer de l'estomac dans les pays industrialisés [27,28].

II.3.2.2) Helicobacter pylori :

L'*Helicobacter pylori* a été découvert en 1982 par Marshall et Warren dans l'antre gastrique humain. C'est une bactérie à transmission oro-fécale. Elle a été reconnue par l'OMS comme carcinogène gastrique certain en 1994 [29]. Par la suite, différents travaux ont suggéré le rôle de cette bactérie dans de nombreuses maladies gastriques et duodénales (gastrite, maladie ulcéreuse, lymphome, cancer gastrique) [30]. Le taux de prévalence de l'infection à *Helicobacter pylori* est plus élevé d'autant que le niveau socio-économique est bas. Certaines souches d'*Helicobacter pylori* produisent des cytotoxines (CagA et VacA) qui sont les facteurs de sa virulence.

II.3.2.3) Les pathologies pré-cancéreuses :

Certaines pathologies telles que la gastrite chronique atrophique, l'ulcère chronique de l'estomac, la gastrite hypertrophique de Ménétrier ou maladie de Ménétrier, la maladie de Biermer (gastrite atrophique auto-immune) et les polypes adénomateux ont un risque significativement élevé de se dégénérer en un cancer gastrique.

La transformation des lésions de gastrite atrophique est en cause dans la majorité des cas. La réaction inflammatoire due à l'infection par l'HP est le point de départ commun à tous les processus de carcinogenèse gastrique. Ces lésions épithéliales gastriques sont dues aux métabolites réactifs de l'oxygène produits lors de la réaction inflammatoire (surtout le NO). Une gastrite atrophique apparaît, puis survient un passage à la métaplasie intestinale. Cela serait en rapport avec l'infection à HP et/ou une prédisposition génétique et/ou des facteurs d'environnement (Nitrosamines) [29, 30,31].

II.3.3) HISTOLOGIE

Plus de 90% des cancers de l'estomac sont des adénocarcinomes (ADK). Les autres types rares, de tumeur rencontrées, sont les tumeurs neuro-endocrines, les GIST et les lymphômes. De nombreuses classifications ont été proposées, basées soit sur les critères purement histologiques descriptifs, soient sur des critères de mode d'extension.

II.3.3.1) Classification de l'OMS

Elle tient compte de deux paramètres :

- Le type histologique : ADK tubuleux, papillaire, mucineux (ou colloïde muqueux), à cellules indépendantes (ou cellules en bague à chaton) ; les 4 autres types histologiques sont moins fréquents,
- Le degré de différenciation : bien, moyennement, peu différencié.

II.3.3.2) Classification de Lauren

Elle est moins précise que la classification OMS mais plus couramment utilisée. Elle distingue 3 types histologiques :

- Intestinal, majoritairement constitué par les ADK papillaires ou mucineux, moyennement à bien différenciés,
- Diffus, représenté par les ADK avec présence de cellules indépendantes, peu à non différencié,
- Mixte ou inclassable.

II.3.3.3) Une particularité : la linite gastrique

La linite est une entité particulière définie par l'association :

- d'un aspect macroscopique avec une paroi gastrique épaissie, rigidifiée, peu plissée, se laissant difficilement expandre par l'exsufflation,
- d'un aspect histologique de cellules indépendantes infiltrant volontiers la sous-muqueuse gastrique au sein d'un stroma fibreux.

II.3.3.4) Classification TNM

Les trois lettres symbolisent la propagation de la maladie cancéreuse sur le site de la tumeur primitive (T), dans les ganglions lymphatiques voisins (N pour *node* en anglais) et à distance pour d'éventuelles métastases (M).

T : Tumeur primitive

Tx : Renseignements insuffisants pour classer la tumeur primitive

T0 : Pas de signes de tumeur primitive

Tis : Carcinome *in situ* : tumeur intra-épithéliale sans invasion de la lamina propria, dysplasie de haut grade

T1 : **T1a** : Tumeur envahissant la lamina propria ou la musculaire T1 muqueuse

T1b : Tumeur envahissant la sous-muqueuse

T2 : Tumeur envahissant la musculature

T3 : Tumeur envahissant la sous-séreuse

T4 : **T4a** : Tumeur perforant la séreuse

T4b : Tumeur envahissant les structures adjacentes

N : Adénopathies régionales

Nx : Renseignements insuffisants pour classer les adénopathies

N0 : Pas de signe d'atteinte des ganglions lymphatiques régionaux

N1 : Envahissement de 1 à 2 ganglions lymphatiques régionaux

N2 : Envahissement de 3 à 6 ganglions lymphatiques régionaux

N3 : **N3a** : Envahissement de 7 à 15 ganglions lymphatiques régionaux

N3b : Envahissement de 16 ou plus ganglions lymphatiques régionaux

M : Métastases à distance

M0 : Pas de métastases à distance

M1 : Présence de métastase(s) à distance

II.3.4) DIAGNOSTIC

Le diagnostic du cancer de l'estomac est souvent tardif compte tenu de l'absence de symptômes et de la petite taille des lésions. La fibroscopie gastrique est l'examen indispensable au diagnostic de ce cancer. Une fois diagnostiqué, un scanner thoraco-abdomino-pelvien est réalisé dans le but d'établir le bilan d'extension de la tumeur.

II.3.4.1) La fibroscopie gastrique

La fibroscopie gastrique permet de faire des prélèvements biopsiques pour analyse anatomopathologique et de confirmer rapidement le diagnostic. Elle consiste à introduire un système optique fin et souple (l'endoscope) jusqu'à l'estomac, en passant par la bouche du patient. Le système optique est couplé à des instruments miniaturisés qui permettent de réaliser de petits prélèvements (biopsies), si une lésion suspecte est découverte. Suite à la fibroscopie, les biopsies sont analysées. Leur examen permet de savoir si les cellules composant la lésion détectée sont normales ou cancéreuses.

II.3.4.2) Tomodensitométrie (TDM)

Le scanner thoraco-abdomino-pelvien ou scanner TAP permet de réaliser en un seul examen le bilan d'extension et parfois d'opérabilité de la tumeur. Il permet de suspecter, en particulier, une atteinte ganglionnaire et/ou une métastase.

II.3.4.3) Examens optionnels

Une cœlioscopie exploratrice peut être proposée si la tumeur est volumineuse, avec suspicion de métastases hépatiques ou de carcinose péritonéale.

Dans les rares cas où les résultats du scanner ne suffisent pas pour statuer clairement sur la présence ou non de métastases, une IRM est prescrite en complément.

II.3.5) MODALITES THERAPEUTIQUES

II.3.5.1) La chirurgie

La chirurgie est le seul traitement éventuellement curatif du cancer de l'estomac. Celle-ci est réalisable chez moins de 50 % des patients. Le geste chirurgical dépend de la localisation de la tumeur et de son extension. La chirurgie est contre-indiquée si l'exérèse ne peut pas être complète ou si l'état de santé du patient ne permet pas de réaliser cette intervention avec un risque post-opératoire satisfaisant. La mortalité liée à la chirurgie curative est estimée à 7 %.

La résection chirurgicale de la tumeur peut être réalisée selon trois modalités:

- Lorsque la tumeur est très petite, peu profonde et sans extension aux ganglions ou à d'autres organes, une résection par endoscopie est possible. Le déroulement de l'opération est similaire à celui d'une endoscopie diagnostique, mais la sonde est couplée à de petits instruments chirurgicaux utilisés pour sectionner la tumeur et la retirer.

- Lorsque la tumeur est moins superficielle et située dans la partie inférieure de l'estomac (antre), une gastrectomie partielle est pratiquée : il s'agit d'une opération visant à retirer la partie atteinte de l'estomac, avec une marge de sécurité suffisante pour être sûr de retirer toutes les cellules cancéreuses.

- Lorsque la tumeur est située au niveau du corps de l'estomac ou du cardia, la gastrectomie doit être totale. Dans ce cas, l'estomac est retiré entièrement. L'extrémité de l'œsophage est alors raccordée à l'intestin : cette reconstruction est appelée anastomose œso-jéjunale.

II.3.5.2) La chimiothérapie

La chimiothérapie consiste à administrer des médicaments qui détruisent les cellules au moment de leur division. Elle tue préférentiellement les cellules cancéreuses car ces dernières se multiplient plus fréquemment que les autres cellules de l'organisme. Cependant, il n'est pas possible d'empêcher son action sur les cellules normales qui se divisent aussi : c'est ce qui explique les effets indésirables du traitement.

Dans les cancers de l'estomac opérables, une chimiothérapie peut être réalisée avant et après la chirurgie. Avant la chirurgie (chimiothérapie néo-adjuvante), elle permet de réduire la taille de la tumeur et de faciliter sa résection. Après la chirurgie (chimiothérapie adjuvante), elle permet d'optimiser l'efficacité de la chirurgie en réduisant le risque de récurrence. Dans le cadre de la prise en charge des tumeurs non opérables, ou des cancers gastriques au stade métastatique, la chimiothérapie est utilisée pour réduire la taille de la tumeur, les symptômes qu'elle entraîne et améliorer ainsi le pronostic.

II.3.5.3) La radiothérapie

La radiothérapie consiste à administrer des rayons de haute énergie au niveau du site de la tumeur afin de tuer les cellules cancéreuses. La radiothérapie seule n'a pas d'efficacité démontrée dans le traitement à visée curative du cancer de l'estomac, sauf en cas de maladie localisée (mais non extirpable chirurgicalement) [56]. Par contre, elle est parfois utilisée dans le traitement palliatif, soit en cas d'obstruction de l'orifice supérieur ou inférieur de l'estomac par la croissance tumorale, soit en cas de saignement gastrique, soit encore dans un but antalgique.

Elle est essentiellement utilisée lorsqu'un traitement complémentaire à la chirurgie est nécessaire: cette radiothérapie postopératoire (ou adjuvante) est le plus souvent utilisée en association à la chimiothérapie. Elle peut aussi être employée pour réduire les symptômes de la maladie dans les tumeurs très avancées ayant bénéficié ou non d'une chirurgie. Dans ce cas, elle est utilisée seule ou en association à la chimiothérapie.

II.3.5.4) Les thérapies ciblées

Lorsque le cancer gastrique est avancé et que des métastases se sont formées dans d'autres organes, certaines « thérapies ciblées » peuvent être proposées. À l'inverse de la chimiothérapie, elles agissent spécifiquement sur les cellules cancéreuses en ciblant une caractéristique propre à celles-ci. Ce type de traitement a une meilleure efficacité antitumorale, et moins d'effets secondaires. Le trastuzumab est la première thérapie ciblée efficace dans le traitement des cancers gastriques métastatiques. D'autres molécules de thérapie ciblée prometteuses sont actuellement en cours de développement. Par ailleurs, de nombreuses thérapies ciblées ont déjà été mises au point pour d'autres cancers. Dans certains cas, elles ciblent des caractéristiques moléculaires que l'on retrouve chez certains patients atteints d'un cancer de l'estomac.

Leur efficacité est donc évaluée dans le cadre d'un essai clinique chez les patients concernés. Ainsi, l'utilisation de médicaments ciblant les protéines VEGF (le bevacizumab), EGFR (le cetuximab, le panitumumab), c-met (l'AMG102), mTOR (l'everolimus) ou HER2 (le lapatinib) est étudiée.

II.4) GENE HER2 ET SIGNALISATION

HER-2 ou Human epidermal Growth Factor Receptor 2 est une glycoprotéine transmembranaire de 185 kda codée par l'oncogène c-erbB2-neu, localisé sur le chromosome 17 (17q21) [40]. Le récepteur HER2 fait partie de la famille des Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR ou ERBB), qui comporte 3 autres récepteurs-tyrosine kinase impliqués dans l'oncogenèse :

- HER-1 ou ERBB1, impliqué dans la voie des MAP kinases (Mitogen-activated protein kinase)
- HER-3 ou ERBB3, impliqué dans la voie PI3K (phosphatidyl-inositol 3-kinase) – AKT – mTOR (mammalian target of rapamycin)
- HER-4 ou ERBB4, dont les mécanismes restent incomplètement identifiés.

Elle est composée d'un domaine intra-cytoplasmique à activité tyrosine kinase, un domaine transmembranaire composé d'un segment lipophile qui permet l'ancrage du récepteur dans la membrane cellulaire et un domaine extracellulaire composé de quatre sous unités (I-IV) liant le ligand. La région extracellulaire de l'ERBB2 est différente des autres. L'ERBB2 a une conformation fixe qui ressemble à l'état activé par le ligand. En outre, cette structure rend la liaison au ligand impossible parce que l'emplacement n'est pas accessible pour l'interaction [32].

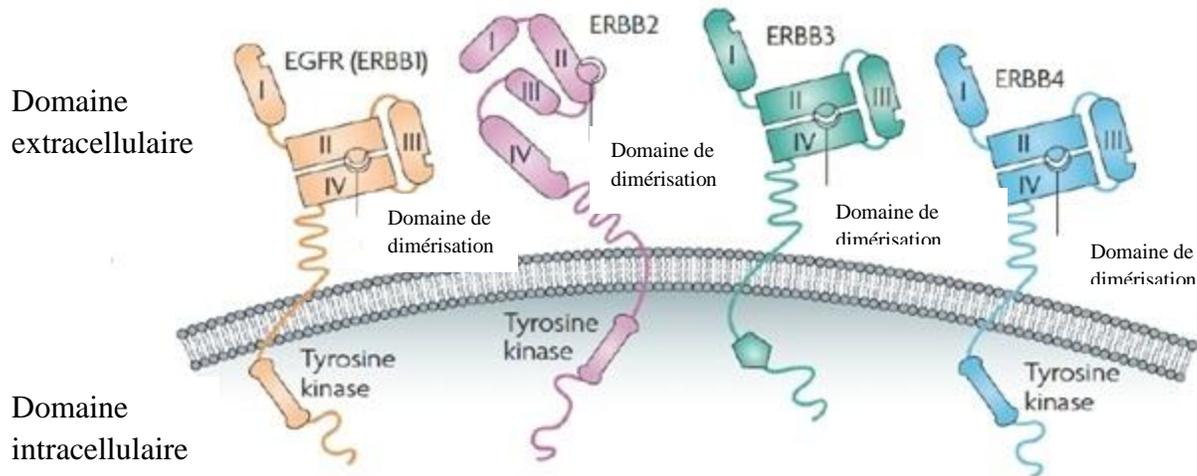


Fig 5: Famille des récepteurs ERBB [33].

Pour être actif, HER2 doit s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec les autres récepteurs de sa famille. Cette dimérisation est ligand dépendante ou indépendante. D'après Holbro et Hynes, la surexpression du récepteur HER2 permet l'homodimérisation de ce dernier conduisant ainsi son activation sans fixation de ligand [34]. Cette situation est notamment observée dans certains cancers [35]. D'autre part, Graus-Porta et collaborateurs ont montré que HER2 était le partenaire privilégié pour la formation des hétérodimères [36]. Ceci peut être expliqué par la conformation de son domaine extracellulaire qui est fixe et ressemble à celle de l'état activé par le ligand [37, 38]. Son activation peut être alors expliquée par le fait qu'il soit le partenaire de choix dans les hétérodimères, il est donc transactivé par le ligand reconnu par l'autre récepteur de l'hétérodimère.

La dimérisation permet à l'activité tyrosine kinase portée par chacune de deux chaînes intracellulaires de rencontrer la séquence cible adjacente. Cela permet une phosphorylation croisée intermoléculaire de plusieurs résidus tyrosine. Le dimère phosphorylé représente le récepteur activé. Il possède toute une série de résidus tyrosine phosphorylés qui ont la capacité de se lier à des protéines pour former des complexes de signalisation. Le résultat est le déclenchement de divers signaux de transduction intracellulaire, en particulier la voie de prolifération de la cascade des MAP kinases, qui passe par les protéines RAS et RAF, ainsi que la voie antiapoptotique de la PI3 kinase (phosphatidylinositol-3 kinase) qui passe par les kinases AKT et mTOR [39].

Cette activation entraîne une multitude d'actions variées sur le processus de cancérisation : augmentation de la division cellulaire, de l'angiogenèse, de la diffusion métastatique, inhibition de l'apoptose [40, 41].

Les récepteurs HER ont été les premiers récepteurs membranaires clairement impliqués dans la genèse de beaucoup de cancers notamment les tumeurs solides par différents mécanismes. Les altérations observées sont des mutations, des surexpressions avec ou sans amplification du gène ou une stimulation anormale par leur ligand [42]. L'implication de HER2 dans la cancérogénèse est le fait de sa surexpression souvent due à une amplification génique. Ainsi, une surexpression est retrouvée dans 7 à 34% des cancers de l'estomac [43].

II.5) DETERMINATION DU STATUT MUTATIONNEL DU GENE KRAS

Les protéines Ras sont membres de la superfamille des petites protéines G monomériques à activité guanosine triphosphate hydrolase (GTPase). Cette superfamille est constituée chez l'homme de 150 membres répartis dans 5 branches principales en fonction de leur similarité de séquence et de fonction : Ras, Rho, Rab, Ran et Arf [49,50]. Il existe 3 principales isoformes de Ras qui partagent 85% d'identité dans leur séquence en acides aminés : Harvey-Ras (H-Ras), Kirsten-Ras (K-Ras) et neuroblastoma-Ras (N-Ras).

Les protéines Ras fonctionnent comme des « switches » moléculaires régulés par leur liaison à la guanosine diphosphate (GDP) ou à la guanosine triphosphate (GTP) [51]. Ainsi, elles alternent entre une forme inactive liée au GDP et une forme active liée au GTP, cette dernière permettant la transduction du signal en interagissant avec des protéines situées en aval dans la voie de signalisation.

Les petites GTPases présentent une haute affinité de liaison pour le GDP et le GTP, mais possèdent de faibles activités intrinsèques pour l'échange GDP/GTP et l'hydrolyse du GTP. Le cycle GDP/GTP est donc contrôlé par 2 types de protéines régulatrices : les facteurs d'échange de nucléotides à guanine (Guanosine nucleotide exchange factors, GEFs), qui facilitent le remplacement du GDP par le GTP et stimulent la formation de la forme active de Ras liée au GTP. A l'inverse, les protéines activatrices de GTPases (GTPase activating proteins, GAPs) stimulent l'activité GTPasique de la protéine G et par là, favorise la forme inactive de la protéine.

Les deux états de liaison aux nucléotides (Ras-GDP ou Ras-GTP) entraînent des changements conformationnels. C'est principalement à travers ces changements conformationnels de Ras que les protéines régulatrices et les effecteurs « reconnaissent » le statut nucléotidique de la GTPase [51].

II.5.1) KRAS ET L'ONCOGENESE

Le gène KRAS situé sur le bras court du chromosome 12 (12p11.22) est un oncogène orthologue (similaire) du gène transformant isolé à partir du Kirsten Rat Sarcoma virus. Il code pour une protéine de 21KD localisée sur la face interne de la membrane plasmique et possède une activité de GTPase. Cette protéine est une composante essentielle de la cascade de transduction du signal en aval du récepteur membranaire EGFR. Il est muté dans 6% des cancers gastriques.

Tableau 1: Fréquences des mutations de RAS (KRAS, HRAS, NRAS) et BRAF dans différents types de cancers humains [52].

Type de Cancer	KRAS (%)	HRAS (%)	NRAS (%)	BRAF (%)
Colon	33	0	2	12
Col de l'Utérus	7	9	2	1
Endomètre	14	1	1	4
Estomac	6	4	2	1
Foie	5	0	3	1
Glande salivaire	0	15	0	0
Intestin grêle	20	0	0	5
Méninges	0	0	0	5
Ovaire	14	0	4	11
Pancréas	57	0	2	2
Peau	3	6	18	39
Péritoine	6	0	0	0
Poumon	17	0	1	2
Prostate	7	6	2	4
Sein	4	1	2	3
Système nerveux	1	0	17	57
Tissus mous	7	5	4	2
Thyroïde	2	4	7	38
Voies biliaires	31	0	1	11
Voies génitales	0	0	0	12
Voies urinaires	5	10	2	1

La majorité des mutations qui touchent le gène Kras sont des mutations activatrices qui conduisent à une activation constitutive de la voie EGFR (indépendante de la fixation du ligand à son récepteur) et ainsi lui confèrent le pouvoir transformant [53,54].

Outre ces mutations activatrices, il existe des mécanismes indirects d'activation du gène Kras, notamment une hyperactivation d'un récepteur situé en amont de cet oncogène (par exemple les récepteurs au facteur de croissance) ou encore une mutation inactivatrice d'un de ses régulateurs négatifs. La capacité de transformation par les protéines Ras dépend de ses interactions avec ses effecteurs en aval [55].

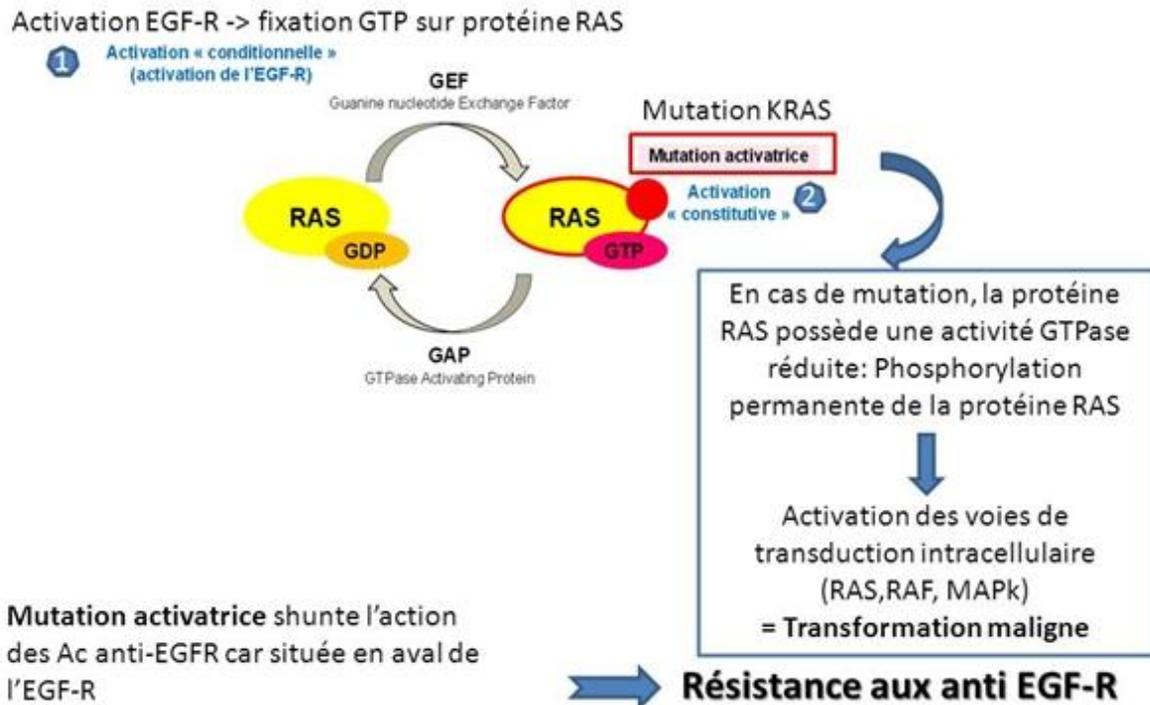


Fig 6: Mutation KRAS et résistance aux anti-EGFR

II.6) METHODES DE DETERMINATION DU STATUT HER2

Les deux méthodes recommandées actuellement sont l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation in situ (HIS) sur coupes fixées et incluses en paraffine. Ces deux techniques présentent une grande spécificité puisqu'elles permettent une visualisation directe du signal recherché au niveau des cellules carcinomateuses.

Les techniques d'HIS colorimétriques, chromogéniques ou argentiques (BrISH pour Brightfield in situ hybridation) permettent un bon contrôle morphologique du tissu [44]. Néanmoins, la technique d'HIS la plus évaluée par rapport à la réponse au trastuzumab reste la technique FISH [45]. La détection du marqueur HER2 est acceptable sur des spécimens chirurgicaux et biopsiques [46,47]. Une coupe représentative du cancer doit être utilisée dans le cas des spécimens chirurgicaux. Dans le cas de biopsies, cinq à huit biopsies sont recommandées de manière à garantir la représentativité de la tumeur [48].

II.6.1) IMMUNOHISTOCHIMIE

L'IHC consiste à mettre en évidence certaines protéines cellulaires, qu'elles soient cytoplasmiques, membranaires ou nucléaires, spécifiques pour un type ou une fonction cellulaire, à l'aide d'une réaction antigène – anticorps. Le complexe formé étant rendu visible, donc localisable, par un marqueur fluorescent ou enzymatique fixé directement ou indirectement sur l'anticorps.

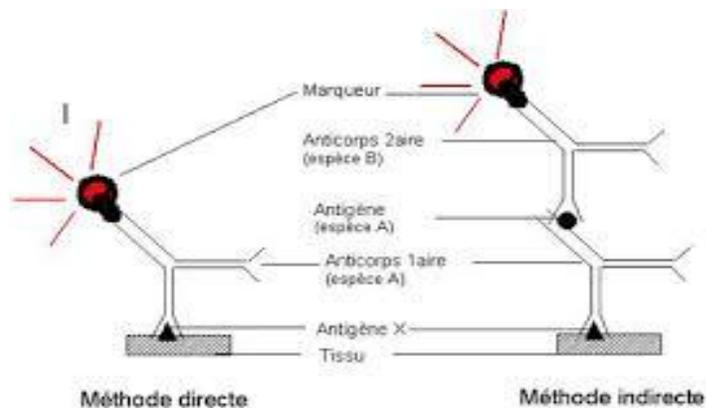


Fig 7: Principe de l'immunohistochimie

II.6.2) HYBRIDATION IN SITU FLUORESCENTE (FISH)

L'hybridation in situ fait appel à deux propriétés de la molécule d'ADN: d'une part la possibilité de la dénaturer et d'autre part, la complémentarité des bases des deux brins et leur tendance à se réassocier lorsqu'ils sont séparés. La dénaturation permet d'obtenir des molécules monocaténaïres ou simples brins qui auront tendance à se réassocier une fois replacées dans des conditions physiologiques.

Si des molécules d'ADN dénaturées sont placées dans un milieu contenant des molécules simple brin d'ADN ou d'ARN de séquence connue, celles-ci auront tendance à s'associer avec les portions des ADN dénaturés qui leur sont complémentaires.

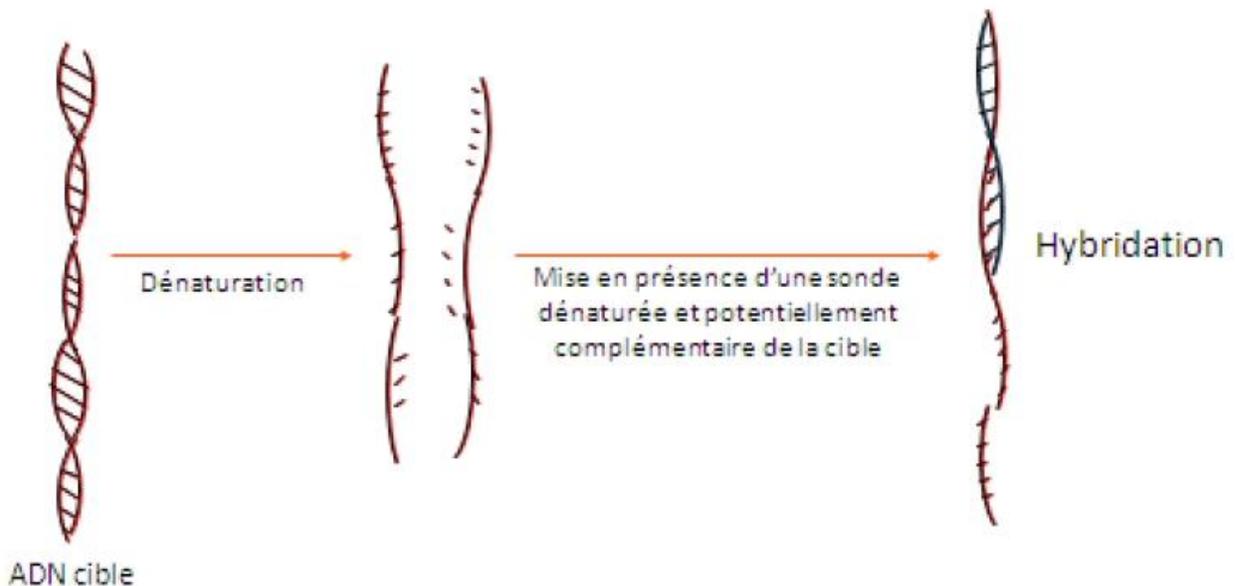


Fig 8: Principe de la FISH

L'hybridation in situ consiste à reconnaître sur matériel cellulaire, tissulaire ou chromosomique, une séquence d'acide nucléique spécifique (ADN ou ARN) en utilisant comme sonde une séquence de bases complémentaire marquée par un traceur radioactif (sonde chaude) ou un traceur non radioactif (sonde froide).

Les sondes utilisées pour la technique FISH, sont des fragments d'ADN simple brin, marqués par fluorescence. Il en existe quatre principaux types:

- Centromérique : permet de mettre en évidence les centromères des chromosomes. Sonde avec séquence répétée satellite.
- Chromosomique : permet de mettre en évidence les chromosomes individuellement par processus "peinture chromosomique".
- Locus/loci particuliers : permet de mettre en évidence un ou plusieurs gènes particuliers.
- Télomériques: ces sondes sont spécifiques des télomères, parties non codantes à l'extrémité des chromosomes. Elles sont utilisées pour l'étude des télomères.

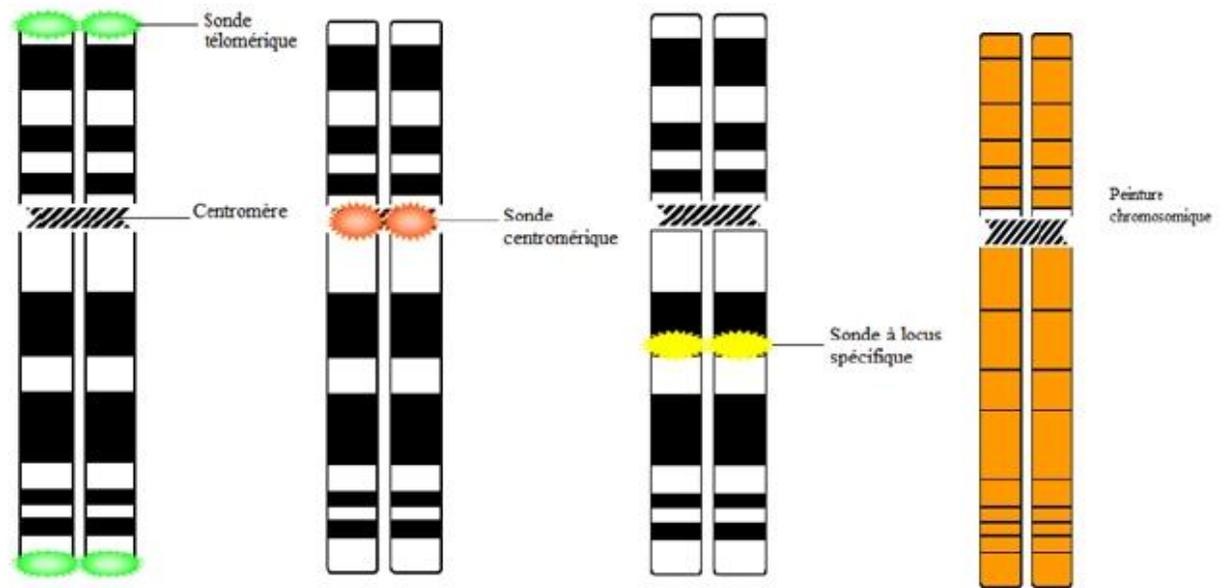


Fig 9: différents types de sondes utilisées en FISH

III) MATERIEL ET METHODES

III.1) ETUDE HISTOLOGIQUE

Le matériel biologique correspond à des biopsies prélevées chez les patients admis au service d'hépto-gastro-entérologie du CHU Hassan II-Fès pour la prise en charge d'un cancer gastrique de type adénocarcinome. Le choix des patients à inclure est fait sur la base des critères d'inclusion suivants :

- Patient adulte
- Présentant un cancer gastrique (type ADK)
- Métastatique ou non

Ces prélèvements sont destinés au laboratoire d'ANAPATHE pour un examen histologique. Ils passent par une série d'étapes avant qu'ils ne soient lus et interprétés par le médecin anatomopathologiste :

II.1.1) La fixation

Le but de la fixation est de conserver le prélèvement dans un état le plus proche possible de l'état in vivo par son action intrinsèque (empêcher l'hydrolyse et la digestion enzymatique des protéines) et extrinsèque (éviter la putréfaction des tissus par les microorganismes). Elle consiste à immobiliser les tissus in-situ, en particulier les antigènes, tout en préservant l'aspect structural du tissu.

Le laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Hassan II utilise comme fixateur le formol tamponné à 10%, le volume du fixateur doit représenter environ 10 fois le volume du prélèvement et la durée de la fixation dépend de la taille du prélèvement.

Un examen macroscopique est d'abord effectué, au cours duquel un descriptif détaillé de la biopsie ou de la pièce est établi (taille mesurée dans les 3 dimensions, couleur, forme, aspect à la coupe, pesée ...etc.). Les fragments sont ensuite inclus en paraffine.

III.1.2) L'inclusion

Pour que la lumière puisse passer à travers le tissu à examiner, celui-ci doit être très fin. Or les tissus sont mous, il faut donc leur donner une consistance solide pour pouvoir réaliser les coupes.

L'inclusion est précédée par une étape de circulation :

Au cours de cette étape on remplace progressivement le milieu aqueux tissulaire par le milieu d'inclusion (ou d'imprégnation). Le milieu d'inclusion utilisé au laboratoire d'anatomie pathologique du CHU Hassan II-Fès est la paraffine.

- **La déshydratation :**

C'est la première étape de la circulation, elle consiste à retirer l'eau du tissu et à la remplacer par l'agent déshydratant puisque le milieu d'inclusion utilisé (paraffine) est hydrophobe. La déshydratation est réalisée par passage du tissu dans des bains d'éthanol de degré croissant (70°, 80°, 90° puis 100°).

- **Eclaircissement :**

L'éthanol n'étant pas miscible avec la paraffine, il est nécessaire de le remplacer dans le tissu par un solvant miscible avec la paraffine. Il est remplacé par le toluène, un agent miscible à celui-ci et à la paraffine au cours de la procédure d'éclaircissement. Le toluène a un indice de réfraction proche de celui des protéines et le tissu devient transparent d'où le nom d'agent éclaircissant.

Après cette étape, le tissu est placé dans de la paraffine fondue (portée à 60°C) contenue dans de petits moules ; la chaleur provoque l'évaporation du toluène (et sa dissolution dans la paraffine) : les espaces ainsi libérés sont remplis par la paraffine. Après la solidification à température ambiante, on procède alors au démoulage : on obtient des fragments tissulaires inclus dans un bloc de paraffine.



Fig 10: Inclusion dans la paraffine

III.1.3) La réalisation des coupes ou microtomie

Le bloc solide de paraffine contenant le tissu est coupé grâce à un microtome, les coupes de 2 à 5 μm d'épaisseur sont étalées sur des lames.



Fig 11: Microtome

III.1 .4) La coloration

Il existe deux étapes préparatoires à la coloration : ce sont le déparaffinage et l'hydratation.

Le déparaffinage sert à enlever la paraffine du tissu afin de permettre la pénétration des colorants. Les lames sont incubées à 70°C pendant 20 à 25 min pour faire fondre la paraffine.

La pénétration des colorants utilisés, qui sont pour la plupart hydrophiles, ne peut se faire que si les tissus ont été imprégnés d'eau. L'hydratation a donc pour effet de retirer le toluène du tissu et de le remplacer par de l'eau. Cette étape est assurée par une succession de bains, d'abord dans un solvant permettant l'élimination de la paraffine résiduelle (toluène) puis dans des alcools de titre décroissant, de 100 % jusqu'à 70 %, avant un bain dans l'eau pure assurant la réhydratation finale. Après réhydratation, la coupe est colorée.

- La coloration H.P.S (hématoxyline, phloxine, safran) :

Réalisée sur lames, la coloration accentue les contrastes pour mieux reconnaître les différents éléments de la préparation. L'hématoxyline colore le noyau en violet, la phloxine colore le cytoplasme en rose, et le safran se charge de colorer les fibres de collagène en jaune.

III.1.5) Le montage

Le montage permet une protection mécanique des coupes, ainsi qu'une protection chimique des colorants. Des lamelles de verre sont collées par-dessus afin de préserver les préparations. Les lames ainsi montées sont prêtes à être analysées par un médecin anatomopathologiste. Ces lames montées peuvent être conservées pendant plusieurs dizaines, voire plusieurs centaines d'années.

Après cette étape, les lames sont lues et interprétées par un médecin anatomopathologiste.

III.2) DETERMINATION DU STATUT HER2

III.2.1) Hybridation in situ fluorescente (FISH)

III.2.1.1) Principe :

L'hybridation in situ fluorescente est une technique fondée sur la réassociation spécifique des acides nucléiques. Une sonde dénaturée (ADN simple brin marqué) en solution peut s'hybrider spécifiquement avec sa séquence cible grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques. Les hybridations aspécifiques et les molécules de sondes non hybridées sont éliminées par lavage, puis les hybrides spécifiques sont révélés. Enfin, l'observation s'effectue grâce à un microscope à fluorescence.

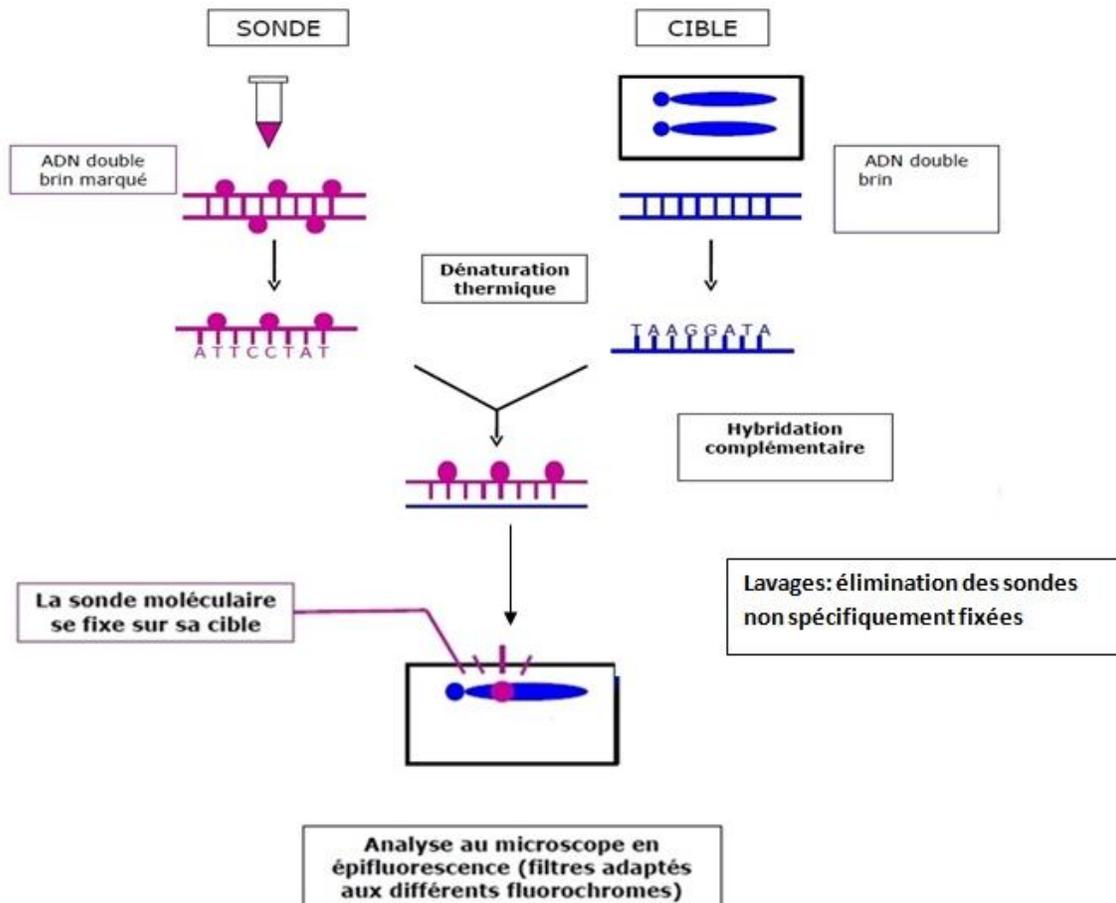


Fig 12: Etapes de la technique FISH

III.2.1.2) Préparation des lames pour la FISH

La veille de la technique, les lames à hybrider sont placées dans un incubateur à 56°C. Avant de démarrer toute technique, il faut penser à mettre au bain marie les solutions utilisées à chaud. Il ne faut pas démarrer les étapes tant que les solutions n'ont pas atteint la température requise.

- **Déparaffinage**

Lors de l'étape de déparaffinage, les lames sont immergées dans 2 bains de toluène absolu pendant 10 min chacun et ensuite dans 2 bains de l'éthanol absolu pendant 5 min chacun. Les lames sont ensuite séchées sur le THERMOBRITE réglé à 45°C (pendant 5min) ou à température ambiante.

- **Prétraitement**

Une solution de 20XSSC (sodium chloride, 0.3 M sodium citrate, pH5.3) est préparée à l'avance, en diluant 66g de 20XSSC dans 200ml d'H₂O déminéralisée sur agitateur magnétique. Le pH est ajusté à 5,3 avec de l'HCl concentré. Le volume est ajusté à 250 ml avec H₂O distillée puis la solution est filtrée (unité de filtration de porosité 0.45µm). Les lames sont immergées dans la solution de 1XSSC (dilution au 1/20 de la solution 20XSSC) à 80°C pendant 35 min, elles sont par la suite immergées dans l'H₂O distillée pendant 3 min.

- **Traitement à la pepsine**

Les lames sont placées sur le ThermoBrite à 37°C et la section est recouverte avec la pepsine diluée. L'incubation se fait pendant 20min. Après, les lames sont immergées dans l'H₂O distillée pendant 3 min et sont ensuite déshydratées dans un gradient d'éthanol 70, 85, 100% pendant 2 min chacun. Les lames sont séchées avant de procéder à l'étape d'hybridation.

- **Hybridation des échantillons**

A partir de cette étape, il est fortement conseillé de travailler en lumière réduite de manière à préserver les fluorochromes des sondes présentes sur les lames. La sonde est portée du congélateur à température ambiante. Elle est ensuite centrifugée, vortexée et à nouveau centrifugée. 10 μ l de sonde sont déposés sur la lamelle. La concentration de la sonde HER2 est de 10ng/ μ l.

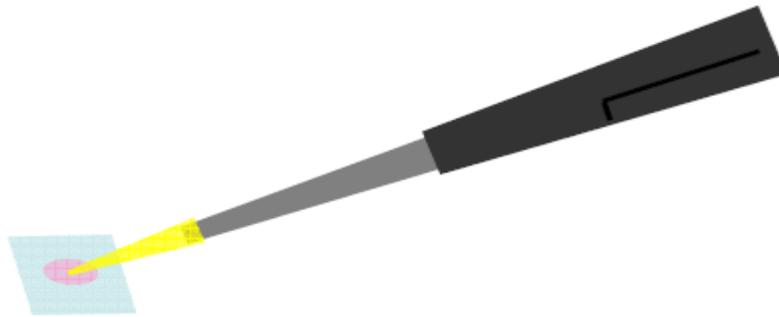


Fig 13: dépôt de sonde

La lame échantillon est immédiatement retournée sur la lamelle et ensuite scellée à l'aide de rubber cement.



Fig 14: Création de la chambre d'hybridation

La lame est placée dans le ThermoBrite et laissée incuber à 37°C pendant environ 5 min avant de lancer le programme de dénaturation/hybridation.

- Température de dénaturation 73°C/ temps de dénaturation 5min
- Température d'hybridation 37°C/ temps d'hybridation 20h

- **Lavages post-hybridation**

Le tampon de lavage post-hybridation (2XSSC/0.3% NP 40) est préparé à partir de la solution 20XSSC, en diluant 3ml de NP40 dans 100 ml de la solution 20XSSC. Le pH est ajusté à 7-7,5 avec du NaOH. L'eau distillée est ajoutée pour un volume final de 1litre. La solution est jetée après chaque utilisation. A la fin de l'hybridation, les lames sont sorties du ThermoBrite et ensuite le rubber cement est retiré sans retirer la lamelle.

La lame est placée dans la solution de lavage 2XSSC/0,3% NP40 à température ambiante. Il faut compter 30s à 1min le temps de traiter la totalité des lames. Les lamelles sont ensuite délicatement retirées et les lames sont transférées dans la solution 2XSSC/0,3% NP40 à 73°C, une agitation rapide est réalisée et le chronomètre réglé à 2min est lancé. Les lames sont retirées de la solution à 73°C et un rinçage rapide dans la solution à température ambiante est effectué. Les lames sont ensuite séchées à l'obscurité.

- **Contre-coloration des noyaux au DAPI**

10 à 20µl de DAPI (dépend de la taille du fragment traité) sont déposés sur une lamelle couvre-objet. La lame échantillon est ensuite retournée sur la lamelle. Les lames sont placées à 4°C pendant au moins 5min avant de procéder à la lecture sous microscope à fluorescence muni de filtres adaptés aux fluorochromes des sondes utilisées.

III.2.1.3) La sonde utilisée

- **PATHVYSION HER-2 DNA probe kit:** permet de détecter l'amplification du gène HER-2 par hybridation in situ, sur des échantillons de tissus fixés et inclus en paraffine.

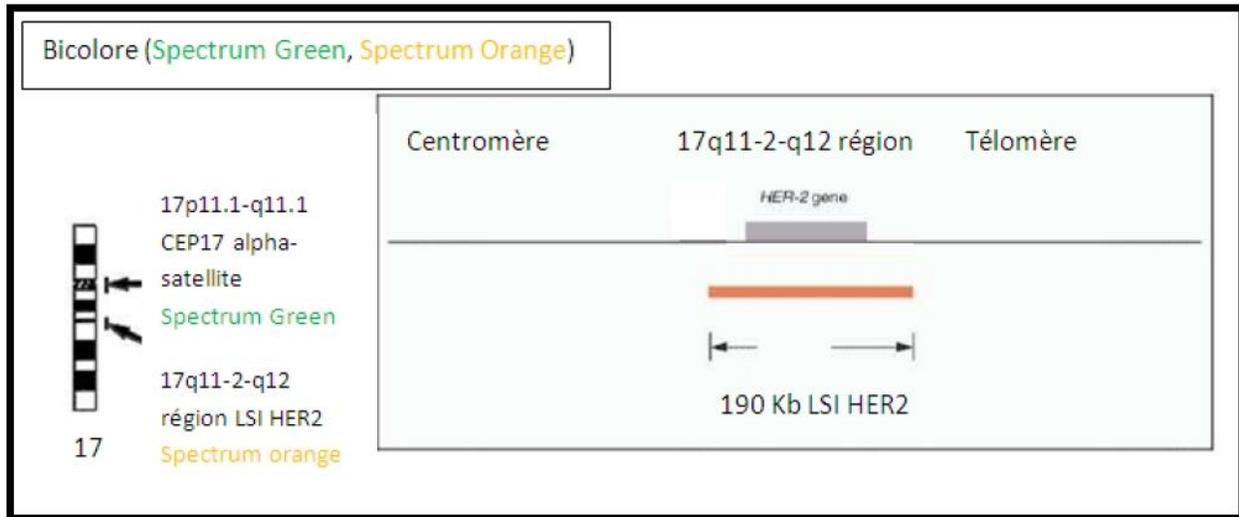


Fig 15: Sonde PathVysion HER-2 DNA

Ce kit est constitué de deux sondes différentes hybridant sur le chromosome 17 :

- La sonde LSI HER-2 marquée en SpectrumOrange est une sonde d'environ 190Kb hybridant au niveau du gène HER-2 dans la région 17q11.2. Cette sonde permet de détecter d'éventuelles amplifications au niveau de cette région.
- La sonde CEP17 marquée en SpectrumGreen est une sonde centromérique hybridant avec l'ADN de la région 17p11.1. Cette sonde est destinée à l'énumération du chromosome 17 dans la cellule. Elle va permettre de déterminer le nombre relatif de copies du gène HER-2 par rapport au nombre de copies du chromosome 17.

L'avantage de disposer de la sonde pour le centromère du chromosome 17 est qu'elle permet une évaluation des éventuelles variations du nombre de chromosomes (polysomies ou monosomies).

III.3) DETERMINATION DU STATUT MUTATIONNEL DU GENE KRAS

III.3.1) Extraction de l'ADN à partir d'échantillons tissulaires paraffinés

Pour la recherche des mutations du gène Kras, la première étape consiste en l'extraction de l'ADN utilisé ultérieurement comme matrice d'amplification pour les réactions PCR. L'ADN est extrait à l'aide d'un kit d'extraction « QIAamp DNA FFPE Tissue-QIAGEN ».

a) Protocole expérimental :

Pour l'extraction d'ADN, 10 coupes de tissus de 5 µm d'épaisseur ont été réalisées à partir d'un bloc de tissu tumoral et sont placées dans un tube de 1.5ml.

- **Déparaffinage**

Pour le déparaffinage, 1ml de toluène est ajouté à l'échantillon suivi d'une brève homogénéisation par vortex (10s) et d'une centrifugation à pleine vitesse (14000rpm) pendant 2 min à température ambiante. Le surnageant est retiré par pipetage et 1ml d'éthanol est ajouté au culot pour extraire de l'échantillon, le toluène résiduel. Une brève homogénéisation au vortex et une centrifugation pendant 2 min à température ambiante et à vitesse maximale sont réalisées. L'éthanol résiduel est enlevé par évaporation en incubant l'échantillon à 37°C pendant 15min.

- **Digestion enzymatique**

Le culot est remis en suspension dans 180 µl de tampon ATL qui lyse les membranes cellulaires. 20 µl de protéinase K sont également ajoutés, la protéinase K permet la lyse des protéines associées à l'ADN. Après l'homogénéisation du mélange au vortex, l'échantillon est incubé à 56°C pendant une nuit (ou jusqu'à ce que l'échantillon ait été complètement lysé).

NB : Le temps de lyse varie en fonction du type de tissu traité. Pour la plupart des tissus, la lyse est achevée en l'espace d'une heure. Si la lyse est inachevée après 1heure, comme l'indique la présence des substances insolubles, le temps de lyse peut être prolongé. Une lyse jusqu'au lendemain est possible et n'affecte pas la préparation.

- **Isolement de l'ADN**

Pour se débarrasser des ARN qui contaminent l'ADN génomique, 2 µl de RNase A (100mg/ml) sont ajoutés. L'incubation dure 2 min à température ambiante. 400 µl du mélange tampon AL/éthanol (1v/1v) est ajouté à l'échantillon, l'ensemble est mélangé soigneusement au vortex puis centrifugé brièvement. Le lysat est transféré dans une colonne QIAamp MinElute placée dans un tube de collecte. Après une centrifugation de 8000 rpm pendant 1min, le tube de collecte contenant l'écoulement est jeté puis la colonne QIAamp MinElute est placée dans un autre tube de collecte propre.

NB: si le lysat n'a pas complètement passé à travers la membrane après centrifugation, une nouvelle centrifugation à vitesse supérieure sera réalisée jusqu'à ce que la colonne QIAamp MinElute soit vide.

500 µl de chacun des deux tampons de lavage AW1 et AW2 sont ajoutés successivement au mélange. Après l'addition de chaque tampon, une Centrifugation à 8000 rpm pendant 1min est nécessaire pour le faire passer à travers la colonne QIAamp MinElute. Le tube contenant l'écoulement est jeté et la colonne est réinsérée dans un autre tube de collecte.

Pour sécher complètement la membrane, une centrifugation à pleine vitesse (14000rpm) pendant 3min est réalisée. L'élution de l'ADN est assurée par application de 50 µl d'une solution d'élution ATE au niveau de la colonne QIAamp MinElute. L'échantillon est ensuite incubé à 70°C pendant 30min. Une Centrifugation pendant 1 min à vitesse maximale (14000 rpm) est réalisée en dernier lieu pour passer le mélange à travers le filtre de la colonne.

b) Quantification de l'ADN extrait

Pour quantifier l'ADN extrait et déterminer sa pureté, l'absorbance est mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm qui est la zone d'absorbance maximale des acides nucléiques. Une seconde mesure à 280 nm permet de contrôler la pureté de l'extraction, à savoir la présence de protéines résiduelles dans la solution d'ADN.

Pour une solution d'ADN purifiée, le rapport DO_{260}/DO_{280} doit être compris entre 1,8 et 2. Si ce rapport est nettement inférieur à 1,8 alors des protéines contaminent probablement la solution. S'il est supérieur à 2, ce rapport indique une probable contamination par des ARN.

La quantification de l'ADN est réalisée à l'aide d'un appareil appelé « NANODROP ». Il suffit de déposer dans l'appareil 2 µl d'ADN extrait, pour déterminer sa concentration et obtenir le rapport A_{260}/A_{280} ainsi que la courbe qui renseigne sur sa pureté.



Fig 16: Spectrophotomètre NANODROP (UGMO-CHU Hassan II-Fès)

III.3.2) La PCR en temps réel

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérisation en chaîne) est une technique permettant d'obtenir, à partir d'un échantillon d'ADN, un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie. Chaque cycle de PCR est constitué de 3 étapes : **une dénaturation** de l'ADN par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, **une hybridation** des amorces aux extrémités de la séquence recherchée, puis **une élongation** grâce à l'action d'une ADN polymérase (Taq polymérase). Ce cycle est répété un grand nombre de fois (25 à 35 cycles) pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible.

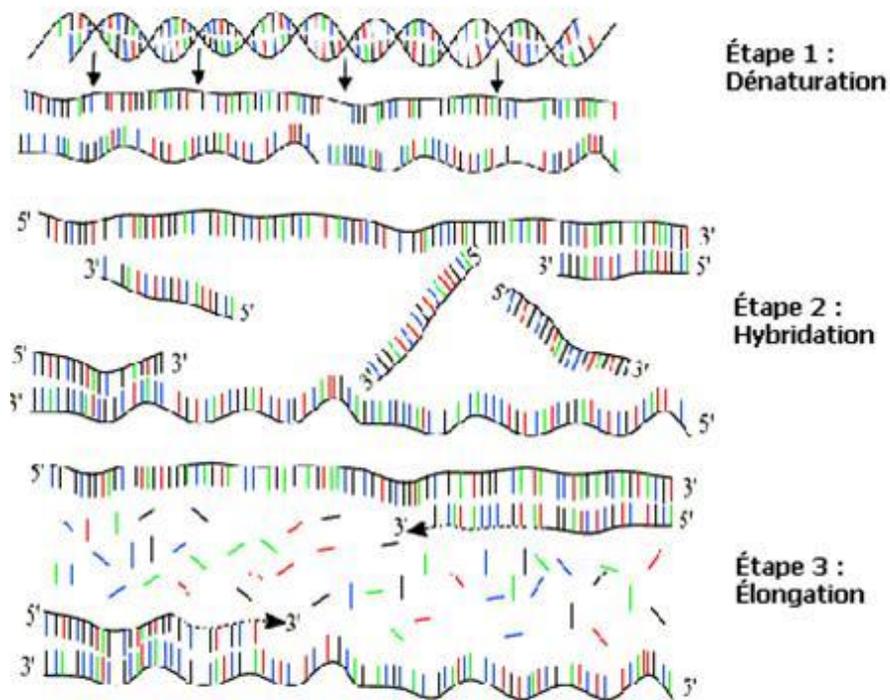


Fig 17: Principe de la PCR

La PCR en temps réel (ou qPCR pour quantitative PCR) utilise le principe de base de la PCR classique (amplification cyclique d'un fragment d'ADN, basée sur une réaction enzymologique) avec pour différence une amplification mesurée non pas en final mais tout au long de la réaction, donc en temps réel.

A chaque cycle d'amplification, la quantité d'ADN est mesurée grâce à un marqueur fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits. Ceci permet d'obtenir une cinétique de la réaction et donc la quantification de l'ADN alors que la PCR classique ne donne que la mesure finale.

a) Principe de la PCR en temps réel :

La PCR en temps réel combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. La réaction d'amplification de la séquence ADN cible suit les mêmes étapes qu'en PCR classique (dénaturation, hybridation, extension). L'augmentation du signal fluorescent est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés durant la réaction de PCR. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle. La première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible (template).

b) Protocole expérimental

Durant les manipulations, « theascreen KRAS PCR Kit » a été utilisé. Ce kit constitue un test de diagnostic in vitro conçu pour détecter 7 mutations somatiques dans les codons 12 et 13 de l'oncogène KRAS et fournir ainsi une évaluation qualitative de l'état mutationnel. La détection de ces mutations est possible grâce à une analyse de PCR en temps réel basée la technologie scorpions.

Tableau 2: Mutations KRAS détectées par le kit

Mutation	Changement de base	ID Cosmic
Gly12Ala	(<u>G</u> GT>G <u>C</u> T)	522
Gly12Asp	(<u>G</u> GT>G <u>A</u> T)	521
Gly12Arg	(<u>G</u> GT> <u>C</u> GT)	518
Gly12Cys	(<u>G</u> GT> <u>T</u> GT)	516
Gly12Ser	(<u>G</u> GT> <u>A</u> GT)	517
Gly12Val	(<u>G</u> GT>G <u>T</u> T)	520
Gly13Asp	(<u>G</u> GC>G <u>A</u> C)	532

- **Principes technologiques**

Le therascreen KRAS PCR Kit associe deux technologies, ARMS® et Scorpions®, pour détecter les mutations dans les analyses de PCR en temps réel.

- **Technologie ARMS®** (système de mutation réfractaire par amplification) :

La technologie ARMS® permet la détection des mutations ponctuelles déjà connues par amplification. Son principe est basé sur l'utilisation d'une amorce spécifique qui ne permet l'amplification de l'ADN que lorsque son nucléotide 3' terminal correspond à sa séquence cible (qui contient la mutation). La Taq ADN polymérase permet d'établir une distinction efficace entre un appariement et un mésappariement à l'extrémité 3' d'une amorce de PCR. Des séquences aux mutations spécifiques peuvent être sélectionnées pour être amplifiées. En effet :

- Lorsque l'amorce est entièrement appariée, l'efficacité de l'amplification est maximale.
- Lorsque la base 3' est mésappariée, seule une amplification entraînant un faible bruit de fond peut se produire.

- **Technologie Scorpions®** :

La détection de l'amplification s'effectue par le biais de la technologie Scorpions. Les Scorpions sont des molécules bi-fonctionnelles contenant une amorce de PCR qui comporte une liaison covalente avec une sonde. Le fluorophore de cette sonde interagit avec un quencher (fluorochrome suppresseur), lui aussi intégré à la sonde, ce qui diminue la fluorescence. Au cours d'une réaction par PCR, lorsque la sonde s'hybride à l'amplicon, le fluorophore et le quencher se séparent. La fluorescence du tube de réaction augmente.

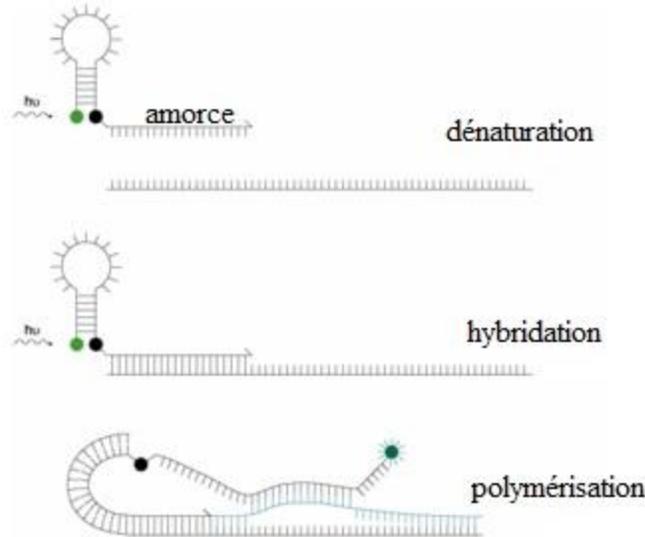


Fig 18: Principe des amorces scorpion

Le « theascreen KRAS PCR Kit » contient huit tests, un test témoin et sept tests de mutation.

- **Test témoin :** Le test témoin est utilisé afin d'évaluer l'ADN total d'un échantillon. Le test témoin amplifie une région de l'exon 4 du gène KRAS. Les amorces et la sonde ont été conçues de façon à éviter tout polymorphisme connu du gène KRAS.
- **Tests de mutation :** Chaque test de mutation contient une sonde Scorpion et une sonde ARMS afin de distinguer l'ADN de type sauvage de l'ADN mutant détecté par une analyse de PCR en temps réel.

L'ADN extrait a été dilué afin d'avoir une concentration de 20ng/μl.

Un mix master suivant a été préparé :

Tableau 3 : Préparation du mix master (pour 1 réaction) :

Test	Mélange réactionnel (μl)	Taq (μl)
Test témoin	7.8	0.2
Tests de mutation	7.8	0.2

Après avoir mélangé doucement l'ensemble en pipétant, 8 µl du master mix sont déposés aux puits de réaction. 2 µl d'ADN de l'échantillon ou du standard mélangé ou du contrôle négatif (NTC, no template control) sont ajoutés aux puits de réaction.

Tableau 4: disposition de la plaque du kit KRAS

Disposition avec 96 puits												
Test	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A Témoïn	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
B 12ALA	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
C 12ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
D 12ARG	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
E 12CYS	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
F 12SER	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
G 12VAL	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10
H 13ASP	Standard mélangé	NTC	Échantillon 1	Échantillon 2	Échantillon 3	Échantillon 4	Échantillon 5	Échantillon 6	Échantillon 7	Échantillon 8	Échantillon 9	Échantillon 10

Après cette étape, la plaque est placée dans un instrument ABI 7500 et le programme suivant est lancé :

Tableau 5: Paramètres des cycles de l'instrument ABI 7500

Température	Temps	Cycle
Etape 1		
95°C	4min	1
Etape 2		
95°C	30 sec	
60°C	1min	40



Fig 19: Thermocycleur PCR en temps réel (UGMO CHU Hassan II-Fès)

IV) RESULTATS ET DISCUSSION

IV.1) RESULTATS

IV.1.1) Etude descriptive

L'étude a porté sur 19 patients présentant un cancer gastrique de type adénocarcinome.

Tableau 6: Renseignements sur les sujets inclus dans l'étude

Patients	Sexe	Age	Milieu (urbain ou rural)
P1	F	60	U
P2	M	39	R
P3	F	60	R
P4	M	53	R
P5	M	82	R
P6	M	39	R
P7	M	55	R
P8	F	47	R
P9	M	45	R
P10	M	62	R
P11	F	65	U
P12	M	70	R
P13	M	55	U
P14	M	41	R
P15	M	39	R
P16	M	56	R
P17	F	53	U
P18	M	79	R
P19	F	46	R

L'incidence la plus élevée a été observée chez les hommes avec un sex-ratio de 2.1

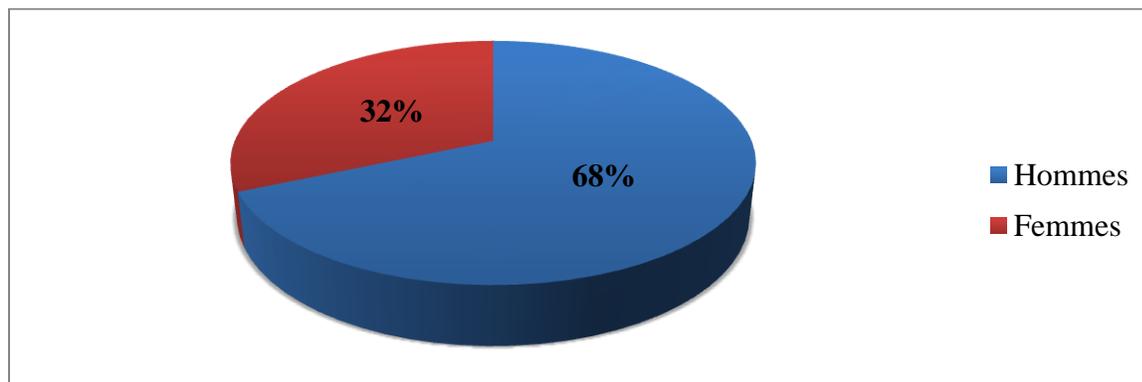


Fig 20: Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction du sexe

L'âge moyen des patients inclus dans cette étude est de 55 ans avec des extrêmes allant de 39 à 82 ans.

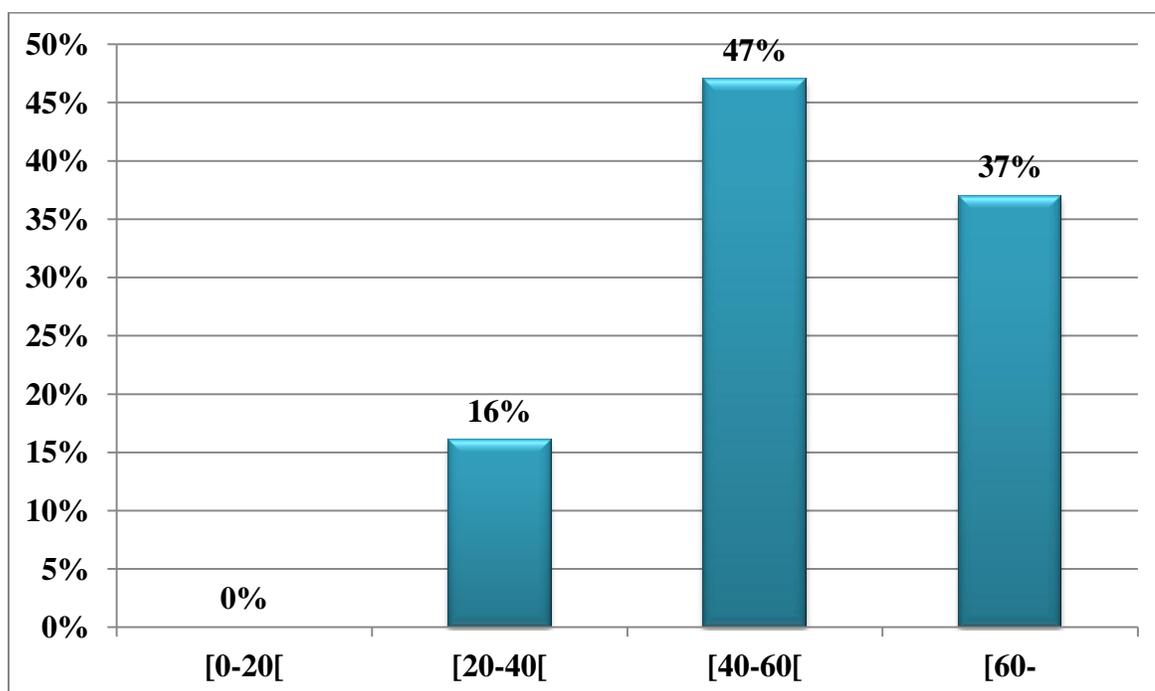


Fig 21: Répartition des sujets inclus dans l'étude en fonction de l'âge

La plupart des patients proviennent du milieu rural.

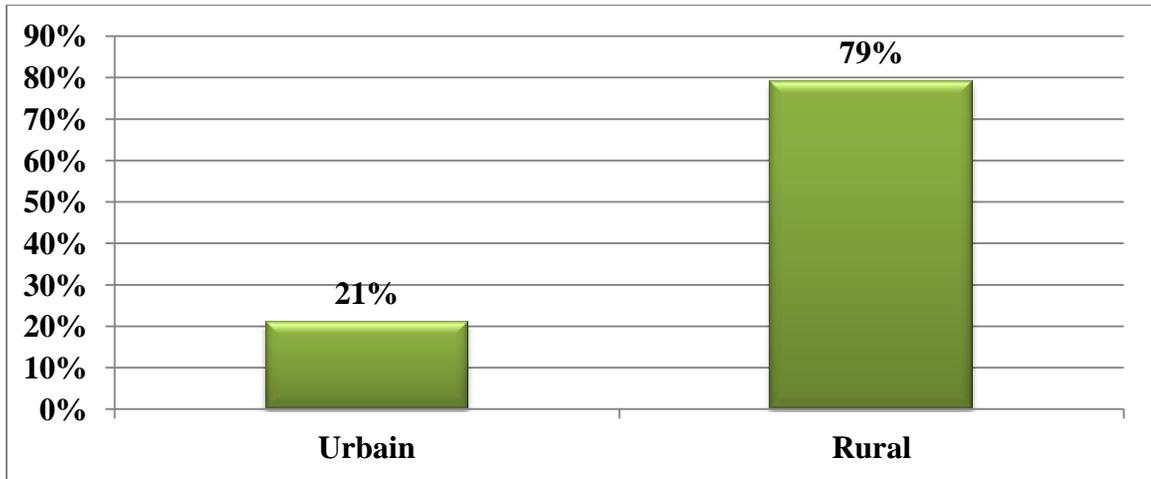


Fig 22: Répartition des sujets inclus dans l'étude selon le milieu d'origine

IV.1.2) DETERMINATION DU STATUT HER2

- Résultats de la technique FISH

Les résultats de FISH sont exprimés par un ratio entre le nombre de signaux HER2 (rouges) par rapport au nombre de signaux centromériques (verts). Le comptage est réalisé sur 20 noyaux. La définition de la positivité de la FISH est un rapport HER2/CEP17 supérieur ou égal à 2,2. Lorsque ce rapport est compris entre 1,8 et 2,2, il est suggéré de compter plus de noyaux (au moins 20 de plus) dans d'autres zones tumorales [57, 58, 59].

Tableau 7: Modalités de comptage des signaux pour l'évaluation du statut du gène HER2, selon les recommandations ASCO/CAP

Signaux HER2/CEP17	Statut HER2
< 1,8	Non amplifié
1,8 – 2,2	Ambigu
>2,2	Amplifié

Pour l'interprétation, il est important de repérer les zones invasives et de réaliser les comptes de signaux à ce niveau. Comme les tumeurs gastriques peuvent être très hétérogènes, il convient de balayer toute la coupe à la recherche des zones amplifiées.

Avant de procéder au comptage des signaux, il est fortement recommandé de suivre scrupuleusement ce guide de comptage afin d'assurer la fiabilité des résultats obtenus

Tableau 8: Guide de comptage des signaux

1	Ne pas compter. Les noyaux se chevauchent, toutes les zones des noyaux ne sont pas visibles	
2	Deux signaux verts, ne pas évaluer les noyaux avec des signaux d'une seule couleur	
3	Compter comme 3 signaux verts et 12 signaux rouges (estimation d'agrégat)	
4	Compter comme 1 signal vert et 1 signal rouge. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal	
5	Ne pas compter (noyaux surdigérés ou sous-digérés). Signaux manquants dans le centre des noyaux (noyaux en forme d'anneau).	
6	Compter comme 2 signaux verts et 3 signaux rouges. Deux signaux de la même dimension et séparés d'une distance égale ou inférieure à leur diamètre comptent pour un seul signal	
7	Compter comme 1 signal vert et 5 signaux rouges	
8	Compter comme 3 signaux verts (1 vert flou) et 3 signaux rouges	
9	Agrégat de signaux rouges cachant les signaux verts, vérifier les signaux verts à l'aide d'un filtre FITC spécifique ou ne pas compter.	

Selon les critères du système de score proposé par Hofmann, 4 cas (21%) sont classés comme FISH+ (présence d'une amplification); 11 cas (58%) sont classés comme FISH- (absence d'amplification) et 4 cas présentent des problèmes de fixation (absence d'hybridation)

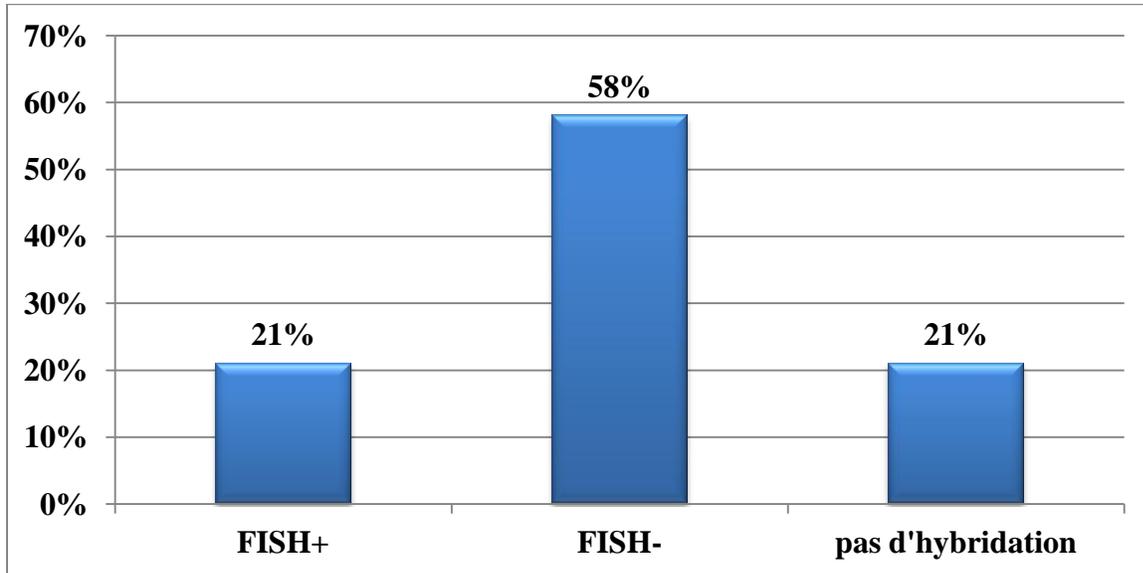


Fig 23: Résultats de la technique FISH

Les 4cas présentant une amplification du gène HER2 correspondent aux patients : P5, P8, P9 et P14. 75% sont des hommes et 25% sont des femmes.

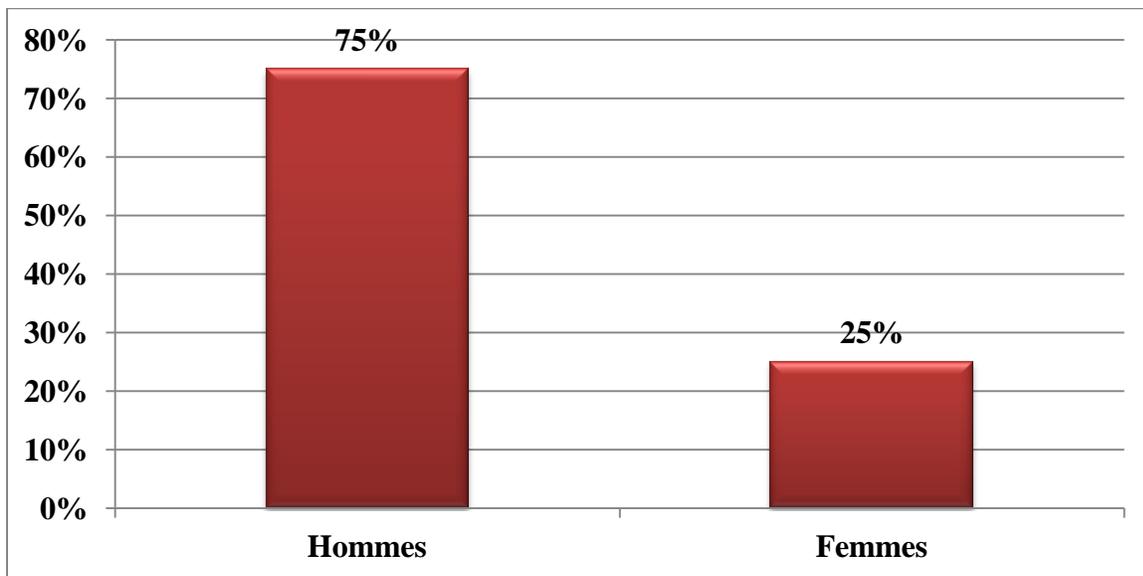
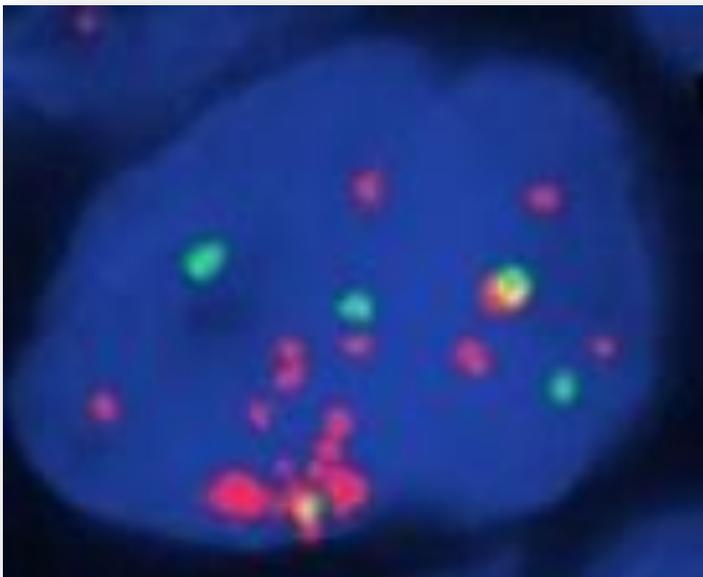


Fig 24: Répartition des cas amplifiés selon le sexe



Cas de cellule normale, le rapport
HER2/Chr17=1 : absence de
l'amplification du gène HER2.

Fig 25: Image de FISH d'une cellule normale



Cas d'amplification
du gène HER2

Figure 26: Image de FISH montrant une amplification du gène HER2

IV.1.3) DETERMINATION DU STATUT MUTATIONNEL DU GENE KRAS

IV.1.3.1) Extraction de l'ADN

L'extraction d'ADN a été réalisée à partir des échantillons tissulaires fixés au formol, inclus en paraffine (FFPE) à l'aide d'un kit d'extraction « QIAamp DNA FFPE Tissue-QIAGEN ». Le rapport de l'absorbance DO_{260}/DO_{280} , est compris pour la plupart des échantillons entre les valeurs 1,8 et 2, ce qui laisse conclure que ces extraits ne sont pas contaminés et peuvent être qualifiés de purs.

IV.1.3.2) PCR en temps réel

Le résultat de PCR en temps réel est représenté graphiquement sous forme de courbes sigmoïdes. Ce dernier doit être analysé soigneusement pour conclure de la présence ou de l'absence d'une mutation. L'analyse des données a été réalisée par la méthode de ΔCt .

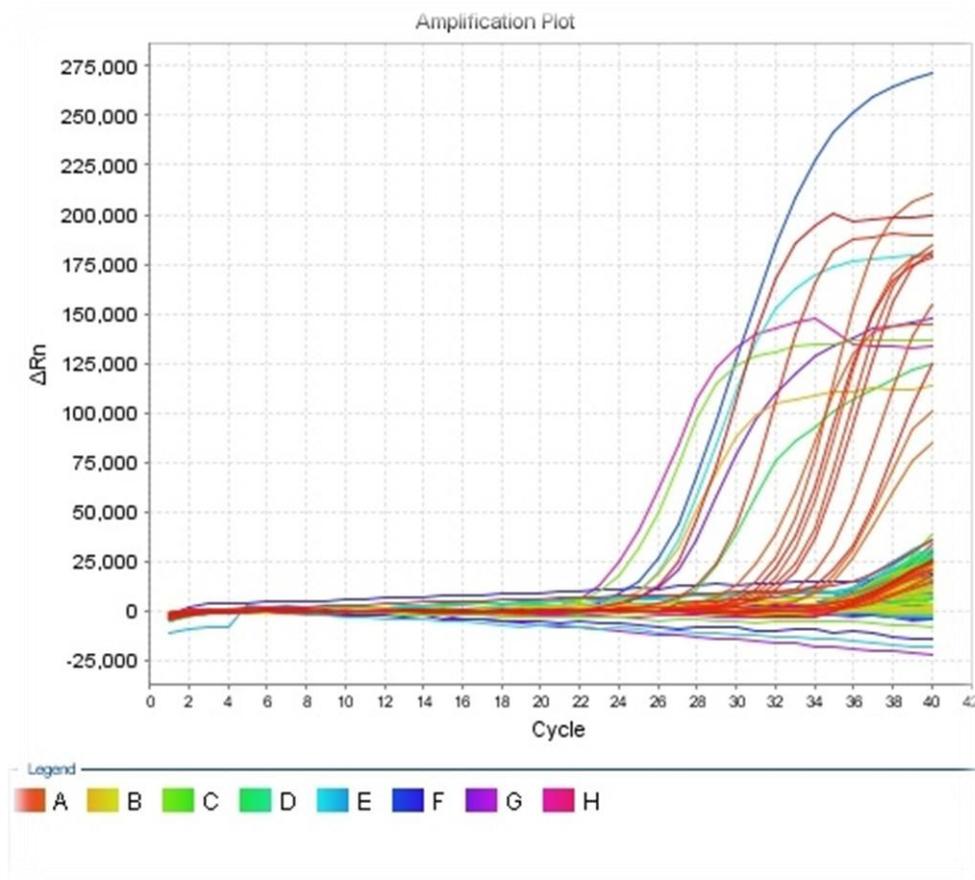


Fig 27: Résultat de PCR en temps réel réalisée dans notre étude.

- **Analyse des données : méthode ΔCt**

Les analyses scorpions en temps réel utilisent le nombre de cycles PCR nécessaires pour détecter un signal fluorescent supérieur à un signal de bruit de fond, afin de quantifier les molécules cibles présentes au début de la réaction. Le point auquel le signal est détecté au-dessus de la fluorescence de bruit de fond est désigné par le terme de « seuil de cycle » (Ct pour cycle threshold).

Avant de procéder à l'analyse des données des échantillons, il est impératif de choisir les cas évaluables en suivant trois astuces :

1) Evaluation des témoins de plaque (standard mélangé et NTC) :

- Il faut évaluer les valeurs de Ct de NTC pour vérifier qu'aucune contamination ne donne une amplification positive dans le canal FAM (un Ct inférieur à 40 indique une contamination) ou un échec de réaction de témoin exogène dans le canal JOE (absence de Ct indique un échec de témoin exogène).
- Le standard mélangé devrait donner un Ct de test témoin (canal FAM) de 26-29.
- Il faut calculer les valeurs ΔCt de standard mélangé : ces valeurs doivent correspondre à celles figurant dans le tableau ci-dessous, mais des variations de ± 2 peuvent survenir à cause de paramètres de seuil différents selon les instruments.

Tableau 9: Valeurs ΔCt de standard mélangé avec l'instrument ABI 7500

tests	ΔCt du standard mélangé	Limites acceptables pour le standard mélangé
12ALA	-0.70	-2.70 à 1.30
12ASP	-1.40	-3.04 à 0.96
12ARG	-0.02	-2.02 à 1.98
12CYS	-0.98	-2.98 à 1.02
12SER	0.02	-1.98 à 2.02
12VAL	-0.19	-2.19 à 1.81
13ASP	-1.12	-3.12 à 0.88

Les données ne doivent pas être utilisées en cas d'échec d'un de ces deux témoins (standard mélangé ou NTC).

2) Evaluation des valeurs Ct de test témoin:

- La valeur Ct témoin doit être ≥ 24 pour éviter toute surcharge du test.
- Ct témoin < 29 : le therascreen KRAS PCR Kit peut détecter 1% de mutation dans ces échantillons.
- Dans les échantillons où le Ct témoin est ≥ 29 , le kit ne détectera pas de valeur aussi faible que 1% de mutation, mais pourra détecter des mutations de niveau plus élevé.
- Ct témoin ≥ 35 : seules quelques copies amplifiables d'ADN sont présentes dans l'échantillon, les mutations ne sont susceptibles d'être détectées que si la plupart des copies en comportent.
- Ct témoin ≥ 38 : l'ADN pose une limite et les données ne doivent pas être utilisées.

3) Calcul des valeurs ΔCt de l'échantillon :

Les valeurs de ΔCt de l'échantillons sont calculées sur la base de la différence entre le Ct de test de mutation et le Ct de test témoin du même échantillon.

- Si la valeur ΔCt de l'échantillon est supérieure à la valeur ΔCt de 1% de ce test (comme indiqué dans le tableau 13), l'échantillon d'ADN est classé comme présentant une mutation négative ou en-dessous des limites du therascreen KRAS PCR Kit.
- Si le ΔCt de l'échantillon est inférieur à la valeur ΔCt de 1%, l'échantillon d'ADN est classé comme présentant une mutation positive.
- Les valeurs de Ct de mutation ≥ 38 doivent être considérées comme négatives ou en-dessous des limites du kit.

Tableau 10: Points seuils de 1% avec l'instrument ABI 7500

Tests	ΔC_t de 1% de l'échantillon
12ALA	6.5
12ASP	8
12ARG	8
12CYS	7
12SER	9
12VAL	6.5
13ASP	9

Après avoir suivi scrupuleusement toutes ces consignes, l'analyse a abouti aux résultats suivants: 3 patients sur 19 présentent une mutation du gène KRAS soit 15%.

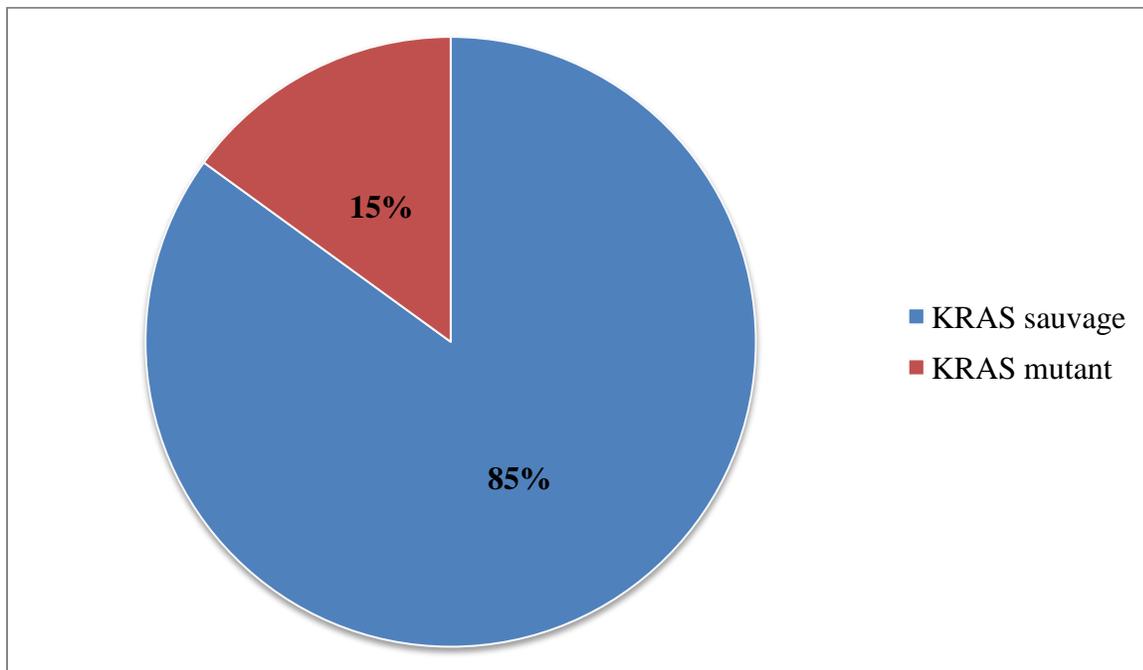


Fig 28: Proportion de la mutation KRAS obtenue dans notre étude

Les 3 patients présentant une mutation KRAS correspondent aux P1, P2 et P18.

Tableau 11: Mutations détectées dans notre étude

Mutation	Changement de base	ID Cosmic
Gly12Cys	(<u>G</u> GT> <u>T</u> GT)	516
Gly12Ser	(<u>G</u> GT> <u>A</u> GT)	517
Gly12Arg	(<u>G</u> GT> <u>C</u> GT)	518

Toutes les mutations ont été retrouvées au niveau du codon 12 du gène KRAS.

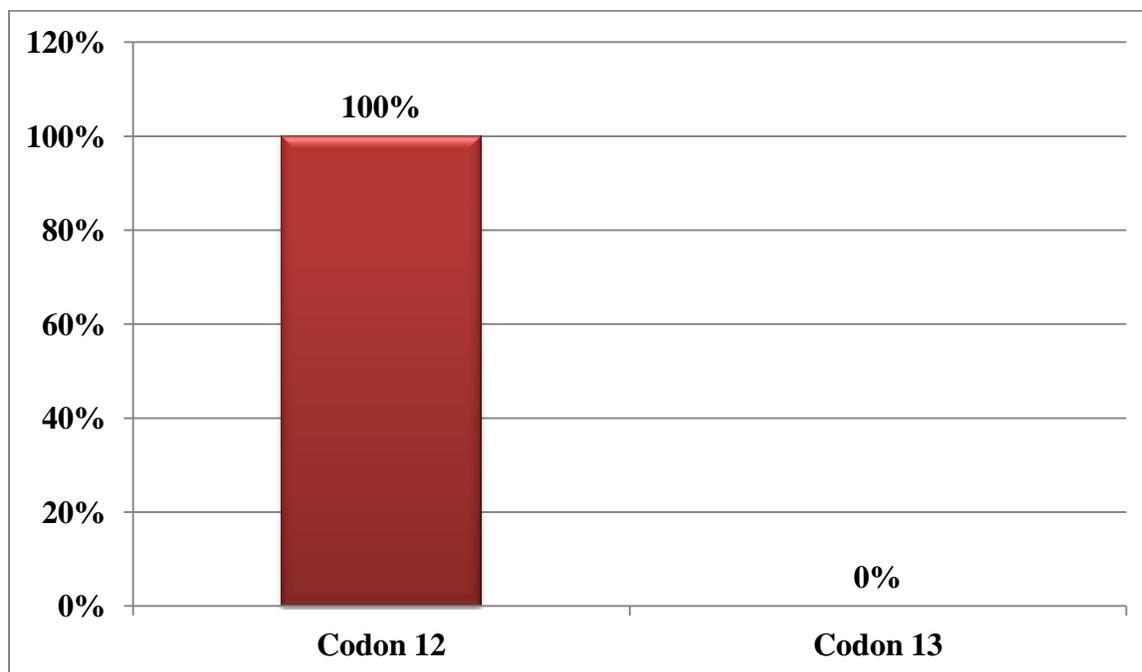


Fig 29: Emplacement des mutations retrouvées dans notre étude

IV.2) DISCUSSION

Les résultats obtenus dans notre étude descriptive sont en accord avec ceux de la littérature. En effet, l'âge moyen de nos patients et la prédominance masculine concordent avec les données qui ressortent dans d'autres études.

Le cancer de l'estomac est rare avant l'âge de 50 ans. Le risque augmente avec l'âge et plus rapidement chez l'homme que chez la femme [76]. L'âge moyen de survenue de ce cancer est de 60 ans. Une étude réalisée au Maroc sur une série de 1770 cas de cancer gastrique, colligés entre 1980 et 2000 [77], a noté une moyenne d'âge de 51 ans chez l'homme et 48 ans chez la femme. Le sexe ratio est de 2 à 3. Dans notre série, la prédominance du sexe masculin a été mise en évidence avec 13 hommes (68,4%) et 6 femmes (31,6%) soit un sexe ratio de 2,1. L'âge moyen des patients se situe aux alentours de 55 ans dans plusieurs séries y compris notre étude où l'âge moyen est de 55 ans avec des extrêmes allant de 39 ans à 82 ans.

Tableau 12: âge et sexe (donnée de différentes séries nationales)

Auteur	Période	Nombre de cas	Sex-ratio	Age moyen
Mellouki [23]	2001-2011	170	2,5	58
Touhami [69]	1998-2002	167	2	54
Naim [70]	2006-2007	144	1,9	56
Elouarda [71]	1985-1991	100	2,5	53
Benhammane [72]	2001-2006	113	1,8	57,65
Benelkaiat [73]	1997-2008	1752	2,67	59
El omrani [74]	2002-2005	90	-	54
Benali [75]	1976-1987	232	2,5	54
Notre série	2014-2015	19	2,1	55

La plupart de nos patients (79%) proviennent des régions rurales ; ceci suggère l'importance des facteurs environnementaux, notamment alimentaires dans la carcinogenèse gastrique [25 ; 26]. Cette différence d'incidence du cancer gastrique entre le milieu rural et le milieu urbain, peut être projetée à celle existant entre les pays développés et les pays sous-développés.

Ainsi, plusieurs études ont montré que la consommation excessive de sel et d'aliments riches en sel est un facteur de risque du cancer de l'estomac. Une méta-analyse de sept études prospectives portant sur 270 000 personnes a montré une relation entre la consommation de sel alimentaire et le risque de cancer gastrique. Le risque était accru de 68% en cas de consommation élevée par rapport à une faible consommation [68]. Le sel agirait en favorisant l'inflammation de la muqueuse gastrique et en augmentant la prolifération cellulaire.

D'autres études ont montré que la consommation de fruits et de légumes a un effet protecteur et qu'elle permet de réduire le risque de cancer gastrique d'environ 40% pour les fruits et 25% pour les légumes [68].

Par ailleurs, les deux méthodes recommandées actuellement pour la détermination du statut HER2 sont l'immunohistochimie (IHC) et l'hybridation in situ (HIS). L'IHC est réalisée en premier lieu, seul les cas douteux (IHC2+) sont vérifiés par HIS. La technique d'IHC n'a pas été réalisée dans notre étude par manque d'anticorps.

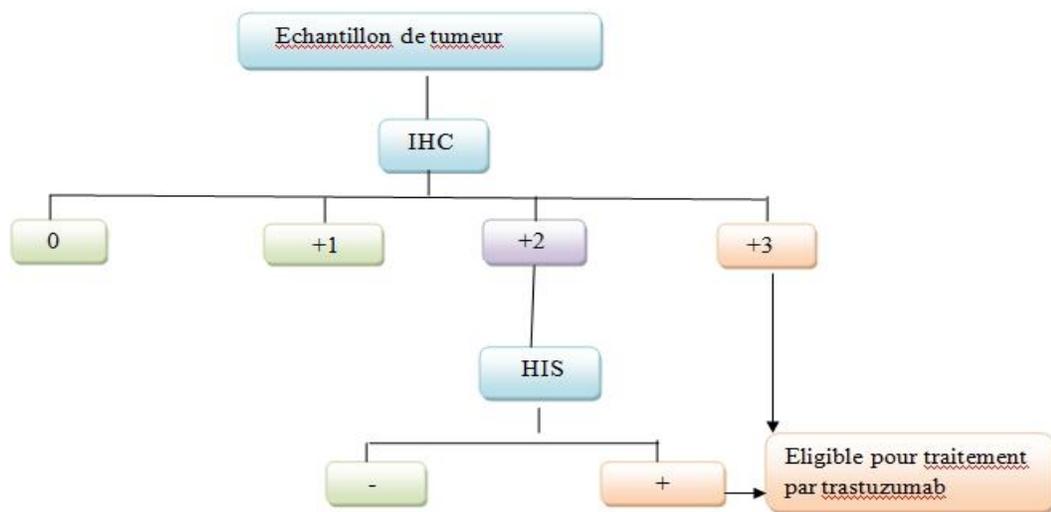


Fig 29: Algorithme de choix des tests HER2 dans le cancer gastrique

Une amplification est un processus génétique bien caractérisé aboutissant à la multiplication sélective du nombre d'exemplaires d'un gène (ou d'un groupe limité de gènes adjacents, définissant un « amplicon »), indépendamment des gènes situés plus à distance sur le chromosome.

Ce phénomène est connu comme participant à l'oncogenèse dans plusieurs types tumoraux, notamment celui de l'estomac. L'amplification génique a pour conséquence, en règle, l'hyperexpression du ou des gène(s) amplifié(s), et, lorsqu'il s'agit d'un oncogène comme HER2, elle donne un avantage sélectif prolifératif aux cellules qui en sont porteuses.

Le taux d'amplification du gène HER2 dans notre étude (21%) est supérieur de celui noté par Chao He et ses collaborateurs (15.74%) [61] ; mais il est inférieur à celui décrit par Yano et ses collaborateurs (27.1%) [59].

La variabilité de ces résultats peut être liée à des variations techniques dépendant de la manipulation et du traitement de tissu (fixation, épaisseur des coupes, prétraitements,...) et à des difficultés d'interprétation (difficulté de repérage de zones invasives, superpositions nucléaires fréquentes dans les adénocarcinomes bien différenciés, difficultés d'interprétation des polysomies).

Quatre lames (21%) n'ont pas donné une hybridation. Ce résultat peut être dû à une altération des gènes suite à une mauvaise fixation. Ce pourcentage non négligeable montre que la nécessité de conditions expérimentales optimales est un pré-requis indispensable à l'obtention des résultats fiables. Les recommandations internationales (ASCO/CAP, UK, Canada) préconisent une fixation au formol 10% tamponné, de 24-48 heures pour les pièces opératoires, et de six à huit heures pour les biopsies [62, 63]. Le temps de fixation à pression atmosphérique est au moins d'une heure par millimètre de tissu [64].

D'après les résultats de cette étude, on peut dire que la technique FISH est réservée à des centres spécialisés, car l'analyse des signaux nucléaires d'une hybridation est longue et minutieuse et demande une expertise. Concernant les manipulations, il est recommandé de suivre les procédés de détection du marqueur HER2 spécifiés par le fabricant du kit utilisé. Dans le but d'avoir des résultats reproductibles, il est recommandé d'adopter un protocole standard d'analyse de laboratoire.

Vu le mauvais pronostic du cancer de l'estomac, la détermination du statut HER2 est devenue indispensable pour sélectionner les patients candidats à un traitement par le trastuzumab. En effet, seul les patients dont la tumeur surexprimée le récepteur HER2 sont éligibles au traitement par le trastuzumab.

Le trastuzumab se lie avec une grande affinité et spécificité au sous-domaine IV, une région juxtamembranaire du domaine extracellulaire de HER2. La liaison du trastuzumab à HER2 inhibe l'activation des voies de signalisation HER2 indépendamment d'un ligand. Cette liaison empêche le clivage protéolytique de son domaine extracellulaire, un mécanisme d'activation de HER2. De plus, le trastuzumab est un puissant médiateur de la cytotoxicité cellulaire anticorps-dépendante (ADCC).

Le trastuzumab peut aussi agir par réduction du nombre de récepteurs disponibles par activation de l'endocytose ou la diminution des facteurs angiogéniques.

Le taux de mutation KRAS dans notre série (15%) est élevé par rapport à celui cité dans la littérature.

Tableau 13: Taux de mutation KRAS

Auteur	Nombre de cas	Taux de mutation KRAS
Van Grieken et al. [65]	712	4,2%
Zhao W., et al. [66]	94	8,5%
Notre série	19	15%

Jusque là, peu d'études ont été réalisées pour la détermination des mutations KRAS dans le cancer gastrique. La plupart des études réalisées sur KRAS ont porté sur l'état mutationnel des codons 12 et 13, en utilisant des méthodes différentes.

Des mutations du gène KRAS sont fréquemment observées dans les cancers. Elles entraînent une activation constitutive de la voie de signalisation EGFR. Ces protéines étant situées en aval de la voie de signalisation de l'EGFR, des mutations sont associées à une inefficacité des traitements anti-EGFR. Il est maintenant établi que seuls les patients ayant une tumeur avec RAS non-mutés peuvent bénéficier d'un traitement anti-EGFR.

Le cetuximab et panitumumab sont deux anticorps dirigés contre l'EGF (Epithelial Growth Factor). Leur activité semble restreinte à l'absence de mutation tumorale du gène KRAS, au moins dans leur utilisation dans le cancer colorectal. Ils ne sont pas encore disponibles pour traiter les cancers gastriques, mais ils font l'objet de plusieurs essais thérapeutiques pour le cancer gastrique [78- 87).

V) CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Vu le mauvais pronostic du cancer de l'estomac, la recherche des facteurs pronostiques et/ou prédictifs est devenue indispensable pour sélectionner les patients candidats à une thérapie ciblée. Dans notre étude, nous avons un taux d'amplification du gène HER2 de 21%, une valeur qui reste dans la fourchette rapportée par la littérature.

L'utilisation systématique de la technique FISH n'est pas recommandée car la présence d'une amplification du gène sans surexpression de la protéine HER2 n'est pas un critère d'éligibilité au traitement par trastuzumab, d'où la nécessité de faire une étude immunohistochimique pour étudier l'expression de la protéine HER2.

Notre série se caractérise par un taux de mutation du gène KRAS supérieur à celui de la plupart des séries de la littérature. La poursuite de cette étude par un échantillon plus large est nécessaire afin de mieux comprendre les particularités de ce cancer dans notre contexte.

Les mutations les plus fréquentes du gène KRAS sont rapportées au niveau des codons 12 et 13 de l'exon 2, mais d'autres exons (exon3 et exon4) peuvent aussi porter des mutations, ceci suggère l'importance de poursuivre cette étude en recherchant des mutations au niveau de ces exons.

Enfin, les techniques de mise en évidence de ces facteurs pronostiques et/ou prédictifs doivent être parfaitement fiables, pour éviter de « sur-traiter » des patients et éviter des toxicités inutiles.

VI) REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] Guimbaud R., Bonnet D., Valentin T., Couteau C., Rivera P., Deslandres M., 2011. Prise en charge de l'adénocarcinome métastatique de l'estomac. *Post'U.*, 175-184.
- [2] Kamangar F., Dores GM., Anderson WF., 2006. Patterns of cancer incidence, mortality and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol.*, 24:2137-50.
- [3] Tai W., Mahato R., Cheng K., 2010. The role of HER2 in cancer therapy and targeted drug delivery. *J control Release* 146:264-275 [PMID:20385184 DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.04.009]
- [4] Kaur A., Dasanu CA., 2011. Targeting the HER2 pathway for the therapy of lower esophageal and gastric adenocarcinoma. *Expert Opin Pharmacother* 12: 2493-2503 [PMID:21967344 DOI: 10.1517/14656566.2011.605354].
- [5] Gravalos C., Jimeno A., 2008. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Ann Oncol.*, 19:1523-1529.
- [6] Terashima M., Kitada K., Ochiai A., Ichikawa W., Kurahashi I., Sakuramoto S., et al., 2012. Impact of expression of human epidermal growth factor receptors EGFR and ERBB2 on survival in stage II/III gastric cancer. *Clin Cancer Res.*, 18: 5992- 6000.
- [7] Yonemura Y., Ninomiya I., Yamaguchi A., Fushida S., Kimura H., Ohoyama S., Miyakazi I., Endou Y., Tanaka M., Sasaki T., 1991. Evaluation of immunoreactivity for erb-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res.*, 51:1034-1038.
- [8] Karapetis C.S., et al., 2008. KRAS mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *New England J. Med.*, 359, 17: 1757-1765.
- [9] Douillard JY., Oliner KS., Siena S. et al., 2013. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *N Engl J Med.*, 12;369(11):1023-34
- [10] Guo M., Hay B., 1999. Cell proliferation and apoptosis *Curr Opin Cell Biol.*, 11: 745-752
- [11] Soussi T., Beroud C., 2001. Assessing TP53 status in human tumours to evaluate clinical outcome. *Nat Rev Cancer.* 1: 233-240. 11902578

- [12] Rakoff-Nahoum S., 2006. Why Cancer and Inflammation? *Yale J Biol Med.*, 79(3-4):123–130.
- [13] Hanahan D. et Weiberg RA., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* Volume 144, Issue 5, 4 Pages 646–674
- [14] Greenman C., Stephens P., Smith R., Dalgliesh GL., Hunter C., Bignell G. et al., 2007. Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature*. 8;446(7132):153-8.
- [15] Futreal PA., Coin L., Marshall M., Down T., Hubbard T., Wooster R., et al., 2004. A census of human cancer genes. *Nat. Rev. Cancer*. 4(3):177-83.
- [16] Poehlmann A., Roessner A., 2010. Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathology – Research and Practice*, Vol., 206, Issue 9.
- [17] Hanahan D. et Weiberg RA., 2011. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* Volume 144, Issue 5, 4, Pages 646–674
- [18] Schlansky B., Sonnenberg A., 2011. Epidemiology of Noncardia Gastric Adenocarcinoma in the United States. *Am J Gastroenterol.*, 106(11):1978–1985.
- [19] Parkin DM., Bray FI., Devesa SS., 2001. Cancer burden in the year 2000: the global picture. *Eur J Cancer*. 37(Suppl 8):S4–S66.
- [20] Aparicio T., Yacoub M., Karila-Cohen P., René E., 2004. Adénocarcinome gastrique : notions fondamentales, diagnostic et traitement. *Encyclopédie Médico-chir.*, 9-027-A-10.
- [21] Parkin DM., Bray F., Ferlay J., Pisani P., 2005. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.*, 55 : 74-108
- [22] Chbani L., Hafid I., Berraho M., Mesbahi O., Nejjarı C. et Amarti A., 2013. Aspects épidémiologiques et anatomopathologiques des cancers dans la région de Fès-Boulemane (Maroc). *Eastern Mediterranean Health Journal* , EMHJ., Vol. 19 No. 3
- [23] Mellouki I, Nawal L., Bahija B., Nouredine A., Adil I., 2014. Epidémiologie du cancer gastrique: expérience d'un centre hospitalier marocain. *The Pan African Medical Journal.*, 17:42.

- [24] Pera M., Cameron AJ., Trastek V., et al., 1993. Increasing incidence of adenocarcinoma of the esophagus and esophagus junction. *Gastroenterology*,104:510
- [25] Wang X., Terry PD., Yan H., 2009. Review of salt consumption and stomach cancer risk: Epidemiological and Biological evidence. *World Gastroenterol.*, 15(18):2204-13.
- [26] Tsugane S., Sasazuki S., 2007. Diet and the risk of gastric cancer: review of epidemiological evidence [archive], *Gastric Cancer*, 10:75-83
- [27] Gill S., Shah A., Le N., Cook EF., Yosida EM., 2003. Asian Ethnicity Related Differences in Gastric Cancer Presentation and Outcome Among Patients Treated at a Canadian Cancer Center. *J clin oncol.*, 21(11): 2070-76.
- [28] Layke JC., Lopez PP., 2004. Gastric cancer: Diagnosis and Treatment Options. *Am Fam Physician*, 69(5):1133-40.
- [29] Delchier J C., 2004. Les lésions précancéreuses gastriques: quelle prévention? *Gastroenterol Clin Biol.*, 28 (5):172-177.
- [30] Correa P., Piazuelo MB., 2008. Natural history of *Helicobacter pylori* infection. *Dig Liver Is* 40(7):490-6.
- [31] Chatelon J., Elnaggar A., Assi F., Njike M., Haddad SI ALI R., 2007. Médecine interne: hépato-gastro-entérologie. In AXEL BALLIAN ed. *Tumeurs de l'estomac*.4e Edition.Paris: VERAZOBRES-GREGO, pp113-126.
- [32] Nancy E., Hynes N., Heidi A., Lane, 2005. ERBB Receptors and Cancer: The Complexity of targeted Inhibitors. *Nat Rev Cancer*. 5(5):341-354.
- [33] Baselga J., Swain SM., 2009. Novel anticancer targets: revisiting ERBB2 and discovering ERBB3. *Nat Rev Cancer*. 9:463-475.
- [34] Holbro T., Hynes N., 2004. Erb-B receptors : directing key signaling networks throughout life. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 44:195-217.
- [35] Yarden Y., Sliwkowski MX., 2001. Untangling the Erb-B signaling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, 2:127-37.

- [36] Graus-Porta D., Beerli RR. Et Hynes NE., 1995 Single-chain antibody-mediated intracellular retention of ErbB-2 impairs Neu differentiation factor and epidermal growth factor signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 15 1182–1191.
- [37] Bulgess A.W., Cho H.S., Elginbrot C., Ferguson K.M., Carett J., Leahy D.J., 2003. An open and shut case. Recent insights into the activation on of EGF/ERBB receptors. *Mol Cell.*, 12: 541-52.
- [38] Garrett T. P., McKern N.M., Lou M., Elleman T.C., Adams T.E., Lovrecz G.O., Kofler M., Jorissen R.N., Nice E.C., Burgess A.W. et al., 2003. The crystal structure of a truncated ErbB2 ectodomain reveals an active conformation, poised to interact with other ErbB receptors. *Mol. Cell.*, 11, 495-505
- [39] Grant S., Qiao L., Dent P., 2002. Roles of ERBB family receptor tyrosine kinases and owtream signalin pathways, in the control of cell growth and survival. *Front Biosci.*, 7: 376-89.
- [40] Marmor MD., Skaria KB., Yarden Y., 2004. Signal transduction and oncogenesis by ErbB/HER receptors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 58: 903-13.
- [41] Pines G., Kostler WJ. et Yarden Y., 2010. Oncogenic mutant forms of EGFR: lessons in signal transduction and targets for cancer therapy. *FEBS Lett.*, 584: 2699-2706.
- [42] Gschwind A., Fischer OM., Ullrich A., 2004. The discovery of receptor tyrosine kinase: targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 4: 361-70.
- [43] Janjigian YY., Werner D., Pauligk C., Steinmetz K., Kelsen DP., Jäger E., et al., 2012. Prognosis of metastatic gastric and gastroesophageal junction cancer by HER2 status: a European and USA International collaborative analysis. *Ann Oncol.*, 23:2656-2662.
- [44] Penault-Llorca F., Bilous M., Dowsett M., Hanna W., Osamura RY., Ruschoff J., et al., 2009. Emerging technologies for assessing HER2 amplification. *Am J Clin Pathol.*, 132:539-48.
- [45] Cayre A., Mishellany F., Lagarde N., Penault-Llorca F., 2007. Comparison of different commercial kits for HER2 testing in breast cancer: looking for the accurate cutoff for amplification. *Breast cancer Res*, 9(5):R64.

- [46] Moelans et al., 2011. HER2/neu testing and therapy in gastroesophageal adenocarcinoma. *Path Res Int* vol., p10.
- [47] Albarello L., Pecciarini L., Doglioni C., 2011. HER2 testing in gastric cancer. *Adv Anat Pathol.*, 18:53-59.
- [48] Thésaurus national de cancérologie digestive. <http://www.tncd.org/>
- [49] Wennerberg K., Rossman KL., Der CJ., 2005. The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sci.*, 1; 118(Pt 5):843-6.
- [50] Vigil D., Cherfils J., Rossman KL., Der CJ., 2010. Ras superfamily GEFs and GAPs: validated and tractable targets for cancer therapy? *Nat Rev Cancer.*, 10(12):842-57.
- [51] Mitin N., Rossman KL., Der CJ., 2005. Signaling interplay in Ras superfamily function. *Curr Biol.*, 15:R563-74.
- [52] Cagnol S., Boucher MJ., Carrier JC., Rivard N., 2012. REVUE, Activation aberrante de la signalisation KRAS/BRAF/MAP Kinase dans les cancers pancréatiques et colorectaux . *Médecine Sciences Amérique.*
- [53] Bos JL., 1989. Ras oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res.*, 1;49(17):4682-9.
- [54] Herrmann C., 2003. Ras-effector interactions: after one decade. *Curr Opin Struct Biol.*, 13(1):122-9.
- [55] Ji Luo., Michael J., 2009. Emanuele, Danan Li, Chad J. Creighton, Michael R. Schlabach, Thomas F. Westbrook, Kwok-kin Wong, and Stephen J. Elledge. A genome-wide RNAi screen identifies multiple synthetic lethal interactions with the Ras oncogene. *Cell.*, 29; 137(5): 835–848.
- [56] Henning GT., Schild SE., Stafford SL. et al., 2000. Results of irradiation or chemoirradiation for primary unresectable, locally recurrent, or grossly incomplete resection of gastric adenocarcinoma [archive], *Int J Radiat Oncol Biol Phys.*, 46:109-118.
- [57] Marx AH., Tharun L., Muth J., Dancau AM., Simon R., Yekebas E., et al., 2009. HER2 amplification is highly homogeneous in gastric cancer. *Hum Pathol.*, 40:769-777.

- [58] Hofmann M., Stoss O., Shi D., Buttner R., et al., 2008. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology*, 52:797-805.
- [59] Yano T., Doi T., Ohtsu A., Boku N., et al., 2006. Comparison of HER2 gene amplification assessed by fluorescence in situ hybridization and HER2 protein expression assessed by immunohistochemistry in gastric cancer. *Oncol Rep.*, 15:65-71.
- [60] Aesun S., Jeongseon K., Sohee P., 2011. Gastric Cancer Epidemiology in Korea. *J Gastric Cancer*, 11(3):135–140.
- [61] Chao H., Xue-Yi B., et al.; 2013. Correlation of human epidermal growth factor receptor 2 expression with clinicopathological characteristics and prognosis in gastric cancer. *World journal of gastroenterology*,19(14):2171-2178
- [62] Penault-Llorca F., Vincent-Salomon A., Bellocq JP., Mathieu MC., Mac Grogan, Treilleux I, et al., 2010. Mise à jour des recommandations du GEFPICS pour l'évaluation du statut HER2 dans les cancers du sein en France. *Ann Pthol.*, 30: 357-73.
- [63] Woff AC., Hammond ME., Schwartz JN., Hagerty KL., Allred DC., Cote RJ., et al., 2007. American Society of Clinical Oncology, College of American Pathologists, American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guidelines recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.*, 25:118-45.
- [64] Srinivasan M., Sedmak D., Jewell S., 2002. Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol.*, 161:1961-71.
- [65] Van Grieken NCT., Aoyama T., Chambers PA., Bottomley D., et al., 2013. KRAS and BRAF mutations are rare and related to DNA mismatch repair deficiency in gastric cancer from the East and the West: Results from a large international multicentre study. *British journal of cancer*, 108, 1495-1501.
- [66] Zhao W., Tsun LC., Kent-man C., Annie S., et al., 2003. Mutations of BRAF and KRAS in gastric cancer and their association with microsatellite instability. *Int. J. Cancer* , 108: 167- 169.

- [67] Naoki T., Yasuhide Y., Hirokazu T., et al., 2014. Clinicopathological features and prognostic roles of KRAS, BRAF, PIK3CA and NRAS mutations in advanced gastric cancer. BMC Research Notes, 7:271.
- [68] Robaszkiewicz M., 2012. Facteurs de risque et prévention du cancer gastrique. Acta Endoscopica, Volume 42, Issue 5, pp 232-236.
- [69] Ilham T., 2006. Chimiothérapie dans le cancer de l'estomac Expérience du COIR : aspects thérapeutiques des adénocarcinomes gastriques. Thèse méd. Casablanca N°29.
- [70] Naim A., 2010. Aspects épidémiologiques, cliniques et thérapeutiques des cancers gastriques : à propos de 144 cas du centre de radiothérapie et d'oncologie Ibn Rochd de Casablanca. CHU Ibn Rochd, Casablanca, Maroc. Posters, Cancer Radiothérapie 14.
- [71] Elouarda M., 1993. Adénocarcinomes gastriques: étude épidémiologique, diagnostique et thérapeutique. Thèse méd. Rabat No: 148.
- [72] Benhammane H., 2008. Profil épidémiologique du cancer gastrique (à propos de 113 cas) Service de Gastroentérologie, CHU Hassan II, Fès– Faculté de médecine et de pharmacie de Fès- Thèse N° 73/08.
- [73] Benelkhaiat R., 2010. Les cancers digestifs dans la région de Marrakech, J. Afr. Cancer 2:160- 165.
- [74] El Omrani A., 2006. Profil épidémioclinique et évolutif des cancers de l'estomac. Expérience du service d'oncologie hématologie de Marrakech. Posters, Cancer Radiothérapie
- [75] Benali A., 1989. Cancer de l'estomac Aspect épidémiologique, diagnostique et thérapeutique, Faculté de médecine de de pharmacie de Rabat, Thèse N°112.
- [76] FAIVRE J., BENHAMICHE A.M., 1997. Epidémiologie et étiologie des tumeurs gastriques malignes. Rev. Prat. (Paris).
- [77] GUERBAOUI M., 2000. Le cancer au Maroc ; épidémiologie descriptive. Ed personnelle.

- [78] Pinto C., Di Fabio F., Siena S., Cascinu S., Rojas Llimpe F., Ceccarelli C., et al., 2007. Phase II study of cetuximab in combination with FOLFIRI in patients with untreated advanced gastric or gastroesophageal junction adenocarcinoma (FOLCETUX study). *Ann Oncol* 18: 510–517.
- [79] Pinto C., Di Fabio F., Barone C., Siena S., Falcone A., Cascinu S., et al., 2009. Phase II study of cetuximab in combination with cisplatin and docetaxel in patients with untreated advanced gastric or gastro-oesophageal junction adenocarcinoma (DOCETUX study). *Br J Cancer* 101: 1261–126
- [80] Woell E., Greil R., Eisterer W., Fridrik M., Grunberger B., Zabenigg A., et al., 2008. Oxaliplatin, irinotecan, and cetuximab in advanced gastric cancer. First efficacy results of a multicenter phase II trial (AGMT Gastric-2). *J Clin Oncol* 26(662 Suppl.): abstract 15587.
- [81] Han S., Oh D., Im S., Park S., Lee K., Song H., et al., 2009. Phase II study and biomarker analysis of cetuximab combined with modified FOLFOX6 in advanced gastric cancer. *Br J Cancer* 100: 298–304.
- [82] Kanzler S., Trarbach T., Seufferlein T., Kubicka S., Lordick F., Geissler M., et al. German Arbeitsgemeinschaft Internistische ,2009. Cetuximab with irinotecan/folinic acid/5-FU as first-line treatment in advanced gastric cancer: a nonrandomized multicenter AIO phase II study. *J Clin Oncol* 27(15 Suppl.): abstract 4534.
- [83] Kim C., Lee J., Ryu M., Chang H., Kim T., Lim H., et al., 2009. A prospective phase II study of cetuximab in combination with XELOX (capecitabine and oxaliplatin) in patients with metastatic and/or recurrent advanced gastric cancer. *Invest New Drugs* 29: 366–373
- [84] Lordick F., Lubber B., Lorenzen S., Hegewisch-Becker S., Folprecht G., Woll E., et al., 2010. Cetuximab plus oxaliplatin/leucovorin/5-fluorouracil in first-line metastatic gastric cancer: a phase II study of the Arbeitsgemeinschaft Internistische Onkologie (AIO). *Br J Cancer* 102: 500–505.

[85] Moehler M., Mueller A., Trarbach T., Lordick F., Seufferlein T., Kubicka S., et al. 2010. Cetuximab with irinotecan, folinic acid and 5-fluorouracil as first-line treatment in advanced gastroesophageal cancer: a prospective multi-center biomarker-oriented phase II study. *Ann Oncol* 22: 1358–1366.

[86] Chau I., Okines A., Gonzalez de Castro D., Saffery C., Barbachano Y., Wotherspoon A., et al., 2011. REAL3: a multicenter randomized phase II/III trial of epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine (EOC) versus modified (m) EOC plus panitumumab (P) in advanced oesophagogastric (OG) cancer – response rate (RR), toxicity, and molecular analysis from phase II. *J Clin Oncol* 29(Suppl.): abstract 4131.

[87] Waddell T., Chau I., Barbachano Y., de Castro D., Wotherspoon A., Saffery C., et al., 2012. A randomized multicenter trial of epirubicin, oxaliplatin, and capecitabine (EOC) plus panitumumab in advanced esophagogastric cancer (REAL3). *J Clin Oncol* 30(Suppl.): LBA4000